

P-ISSN 1859-4794 * E-ISSN 2615-9929

TẬP 65, SỐ 2, THÁNG 2 NĂM 2023
VOLUME 65, NUMBER 2, FEBRUARY 2023

TẠP CHÍ KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST



HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Chủ tịch

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Thành viên

Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng, Việt Nam

Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam, Việt Nam

Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam, Việt Nam

Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân, Việt Nam

Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trương Nam Hải - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mở - Địa chất, Việt Nam

Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải, Việt Nam

Phạm Gia Khánh - Hội Ghép tạng Việt Nam, Việt Nam

Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Bành Tiến Long - Đại học Bách khoa Hà Nội, Việt Nam

Lê Quan Nghiêm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trần Hữu Phúc - Hội đồng Giáo sư Nhà nước, Việt Nam

Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Tổng biên tập

Nguyễn Thị Hương Giang - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ban biên tập

Phạm Thị Minh Nguyệt - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Phí Công Thường - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Vũ Văn Hưng - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ninh Văn Diện - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Bắc - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Tăng Xuân Bình - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Đoàn Đức Khải - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Trương Thị Thảo Dương - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

EDITORIAL BOARD

Chairman

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Members

Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering, Vietnam

Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam

Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology, Vietnam

Tran Tho Dat - National Economics University, Vietnam

Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Vu Minh Giang - VNU, Hanoi, Vietnam

Truong Nam Hai - Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology, Vietnam

Pham Huy Khang - University of Transport and Communications, Vietnam

Pham Gia Khanh - Vietnam Society of Organ Transplantation, Vietnam

Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam

Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi, Vietnam

Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology, Vietnam

Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

Mai Trong Nham - VNU, Hanoi, Vietnam

Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship, Vietnam

Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University, Vietnam

Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam

Editor-in-Chief

Nguyen Thi Huong Giang - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Managing Editors

Pham Thi Minh Nguyet - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Phi Cong Thuong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Vu Van Hung - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Ninh Van Dien - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Bac - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Tang Xuan Binh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Doan Duc Khai - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Truong Thi Thao Duong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội - Việt Nam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Số 50/GP-BTTTT ngày 01/02/2023

Giá: 18000^d

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi - Vietnam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

E-journal: b.vjst.vn

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

No. 50/GP-BTTTT 1st February 2023

Bước đầu xây dựng quy trình tetra-primer ARMS PCR phát hiện điểm đa hình đơn nucleotide *exo-E415G* của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* ở khu vực Tây Nguyên, Việt Nam

Lê Văn Khánh, Trần Thu Huyền, Hoàng Văn Tổng*

Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y, 222 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/5/2022; ngày chuyển phản biện 20/5/2022; ngày nhận phản biện 2/6/2022; ngày chấp nhận đăng 7/6/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm thiết lập quy trình phát hiện đa hình đơn nucleotide (SNP) *exo-E415G* trên ký sinh trùng (KST) sốt rét *Plasmodium falciparum* kháng artemisinin bằng kỹ thuật tetra-primer ARMS PCR và bước đầu xác định tỷ lệ đột biến *exo-E415G* ở bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin ở khu vực Tây Nguyên. Quy trình xác định điểm SNP *exo-E415G* được tối ưu trên mẫu DNA của chủng chuẩn 3D7, sàng lọc đột biến trên 123 mẫu máu toàn phần từ bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin được thu thập tại 3 tỉnh (Gia Lai, Đắk Nông, Đắk Lắk) thuộc khu vực Tây Nguyên, Việt Nam. Một đoạn gen kích thước 749 bp chứa vị trí SNP *exo-E415G* được khuếch đại bằng cặp mồi E415G-Fc và E415G-Rc. Mỗi đặc hiệu cho alen bình thường (alen A) và alen đột biến (alen G) khuếch đại các đoạn có kích thước lần lượt là 316 và 474 bp. Khi so sánh với phương pháp giải trình tự Sanger thì cho kết quả tương đồng là 100%. Áp dụng quy trình vừa được thiết lập để khảo sát SNP *exo-E415G* ở KST *P. falciparum* kháng artemisinin cho tỷ lệ đột biến là 78% (96/123). Nghiên cứu đã thiết lập được quy trình đơn giản và chính xác để xác định SNP *exo-E415G*. Tần suất đột biến *exo-E415G* của KST *P. falciparum* ở các bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin tại khu vực Tây Nguyên là 78%.

Từ khóa: *exo-E415G*, kháng artemisinin, sốt rét, tetra-primer ARMS PCR.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Sốt rét là một bệnh KST truyền nhiễm phổ biến và nguy hiểm gây ra tỷ lệ tử vong cao trên toàn thế giới. Trong năm 2019, ước tính có 229 triệu người mắc sốt rét ở 90 quốc gia và 409.000 ca tử vong vì sốt rét, nguyên nhân chủ yếu là do các loài KST *P. falciparum* [1]. Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), liệu pháp kết hợp artemisinin (ACTs) là phác đồ ưu tiên điều trị sốt rét do nhiễm KST *P. falciparum*, góp phần làm giảm đáng kể tỷ lệ tử vong do sốt rét. Tuy nhiên, kháng thuốc sốt rét là một trở ngại đối với các chương trình phòng chống và loại trừ sốt rét trên toàn cầu. Ở khu vực Đông Nam Á, KST đã kháng với hầu hết mọi loại thuốc sốt rét hiện có, bao gồm cả liệu pháp ACTs [2, 3]. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, kháng thuốc có liên quan chặt chẽ đến SNP *exo-E415G* trên nhiễm sắc thể số 13 (PF3D7_1362500) của KST *P. falciparum* [4-7]. *Exo-E415G* là đột biến làm thay đổi nucleotide adenin (A) thành guanin (G) trong gen mã hóa cho một exonuclease dẫn đến thay đổi axit glutamic (E) thành glycine (G) tại vị trí 415. *Exo-E415G* được coi là dấu hiệu làm giảm nhạy với artemisinin và dẫn đến tăng tỷ lệ thất bại điều trị đối với ACTs - liệu pháp điều trị ưu tiên của Việt Nam.

Việc theo dõi các chỉ thị phân tử nói chung và SNP *Exo-E415G* nói riêng có vai trò quan trọng trong giám sát,

điều trị sốt rét. Cho đến nay đã có nhiều phương pháp để xác định điểm SNP như giải trình tự gen, realtime-PCR, ARMS PCR, PCR-RFLP... Tuy nhiên, giải trình tự gen, realtime-PCR có hạn chế là cần trang thiết bị hiện đại, chi phí cao và nhân viên phải được đào tạo chuyên môn kỹ thuật tốt. Chính vì vậy để khắc phục những hạn chế đó, chúng tôi đã tiến hành thiết lập một phương pháp đơn giản, chi phí thấp và độ chính xác cao để xác định SNP *exo-E415G* bằng kỹ thuật tetra-primer ARMS PCR, sử dụng 4 mồi trong một phản ứng [8].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Chủng chuẩn 3D7 được cung cấp bởi Viện Y học Nhiệt đới Tuebingen (Đức). Các mẫu DNA đã biết kiểu gen đồng hợp thường AA (D6.1) và đồng hợp đột biến GG (D6.2) được sử dụng để chuẩn hóa phản ứng tetra-primer ARMS PCR. 123 mẫu máu tổng số thu thập từ bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin ở 3 tỉnh Gia Lai, Đắk Nông và Đắk Lắk thuộc khu vực Tây Nguyên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách DNA: DNA được tách chiết bằng bộ kit GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher

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

Establishment of tetra-primer ARMS-PCR technique for detecting *exo-E415G* SNP in *Plasmodium falciparum* isolates from Central Highlands of Vietnam

Van Khanh Le, Thu Huyen Tran, Van Tong Hoang*

Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical University,
222 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 17 May 2022; revised 2 June 2022; accepted 7 June 2022

Abstract:

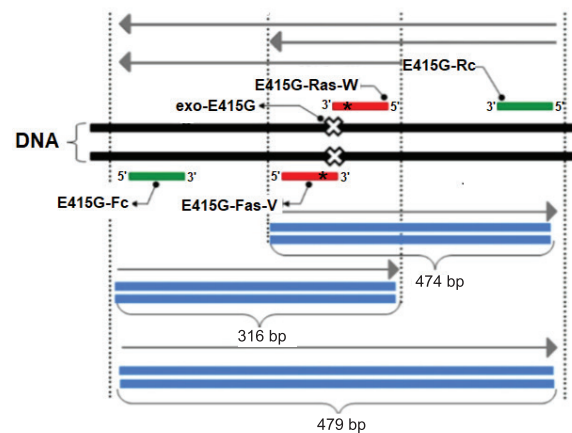
This study aims to establish a procedure based on tetra-primer ARMS PCR technique to detect the single nucleotide polymorphism (SNP) *exo-E415G* in malaria patients who experienced treatment failure with artemisinin. DNA sample from *P. falciparum* 3D7 isolate was used to optimise the procedure based on tetra-primer ARMS PCR technique to detect *exo-E415G* SNP. The method was then applied to screen for *exo-E415G* SNP on 123 blood samples from patients who experienced treatment failure with artemisinin in 3 provinces (Gia Lai, Dak Nong, Dak Lak) from Central Highlands of Vietnam. A DNA fragment (749 bp) containing the *exo-E415G* SNP was amplified using primer pairs E415G-Fc and E415G-Rc. Specific primers for the wildtype alen (A alen) and the mutant alen (G alen) amplified fragments with the length of 316 and 474 bp, respectively. The genotyping results were consistent with Sanger sequencing. The tetra-primer ARMS PCR technique was used for genotyping *exo-E415G* SNP on 123 patients who failed with artemisinin treatment, the frequency of *exo-E415G* alen was observed at 78% (96/123). In conclusion, the simple tetra-primer ARMS PCR technique was established to detect the SNP *Exo-E415G*. The prevalence of the mutant alen *Exo-E415G* was 78% in the Central Highlands of Vietnam.

Keywords: artemisinin resistance, *exo-E415G*, malaria, tetra-primer ARMS PCR.

Classification number: 3.1

Scientific, Mỹ). Quy trình tách chiết theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất, các mẫu DNA sau đó được định lượng và đánh giá độ sạch bằng quang phổ kế và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng cho phản ứng PCR.

Thiết kế mẫu: Xác định SNP *exo-E415G* thuộc exon 2 trên nhiễm sắc thể số 13 của bộ gen KST *P. falciparum* (PF3D7_1362500). Sau khi đã có trình tự gen tham chiếu, sử dụng phần mềm primer blast để thiết kế cặp mồi đặc hiệu cho gen nội chuẩn có kích thước là 749 bp chứa điểm đột biến. Tiếp theo tiến hành xây dựng mồi đặc hiệu cho alen đột biến và alen thường, các mồi này chỉ khác nhau nucleotide cuối cùng ở đầu 3' của mồi. Tuy nhiên, để tăng tính đặc hiệu cho mồi trong phản ứng tetra-primer ARMS PCR, chúng tôi cải tiến 2 mồi đặc hiệu alen bằng cách thêm một nucleotide không liên kết tạo ra thêm một mismatch ở nucleotide số 2 tại đầu 3'. Dựa vào độ khuếch đại của các mồi thường và mồi đột biến sẽ cho phép xác định mẫu bệnh phẩm có mang alen đột biến hay không. Sơ đồ vị trí các mồi trong phản ứng tetra-primer ARMS PCR để phát hiện điểm SNP *exo-E415G* như hình 1. Trình tự của 4 mồi là 5'-GGA ATG TGC TTT AAC GAA TGG-3' (E415G-Fc); 5'-GGT GTT CCT TCC TCT TTT CTT G-3' (E415G-Rc); 5'-CCC AAT GAT TGT TTA CTT CG-T-3' (E415G-Ras-W); 5'-TAT GGT TAT AAC GAT AAA AC-G-3' (E415G-Fas-V). Nucleotide đặc hiệu cho alen ở tận cùng đầu 3' của mồi được in đậm, gạch chân; nucleotide số 2 ở đầu 3' được thiết kế không bắt cặp được ký hiệu (*). Trình tự mồi được đặt tổng hợp tại Công ty Integrated DNA Technologies, Inc. (Singapore).



Hình 1. Sơ đồ vị trí các mồi trong phản ứng tetra-primer ARMS PCR. Hai mồi màu xanh (mồi ngoài) khuếch đại gen nội chuẩn, mồi màu đỏ E415G-Ras-W (mồi trong) khuếch đại alen thường, mồi màu đỏ E415G-Fas-V (mồi trong) khuếch đại alen đột biến. Dấu "X" minh họa vị trí xảy ra đột biến; dấu "*": minh họa mismatch ở nucleotide số 2 tính từ đầu 3' của mồi.

Kích thước các băng xuất hiện khi điện di sản phẩm phản ứng PCR sẽ cho biết kiểu gen của KST. Kiểu gen đồng hợp alen thường (AA) có các băng kích thước là 749 và 316 bp. Kiểu gen dị hợp (AG) cho ra 3 băng kích thước là 749, 474

và 316 bp. Kiểu gen đồng hợp alen đột biến (GG) xuất hiện các băng kích thước là 749 và 474 bp.

Thực hiện phản ứng tetra-primer ARMS PCR: Thành phần phản ứng gồm: GoTaq Green Mastermix (2X) (Thermo Fisher, Mỹ): 12,5 μ l; cặp mồi E415G-Fc và E415G-Ras-W (10 μ M): 0,3 μ l; cặp mồi E415G-Fas-V và E415G-Rc (10 nmol/ μ l): 1 μ l; nước deion: 7,9 μ l; mẫu (30 ng/ μ l): 2 μ l; tổng thể tích 25 μ l. Chu trình nhiệt phản ứng: 95°C trong 5 phút; tiếp theo 40 chu kỳ: 95°C trong 45 giây, 54°C trong 45 giây, 72°C trong 35 giây; cuối cùng 72°C trong 5 phút.

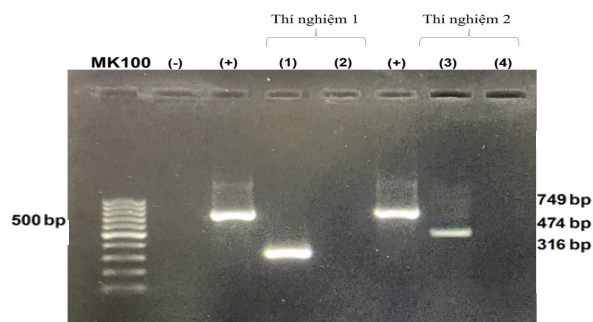
Điện di DNA trên gel agarose: Sau khi DNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sẽ được tra vào giếng trên gel agarose 1,5% và đặt trong bể chứa dung dịch đệm TBE 0,5X. Bể chứa được đặt vào dòng điện một chiều với hiệu điện thế 120 V trong 30 phút. Sau khi kết thúc điện di, bản gel được lấy ra ngâm dưới Ethidium bromide và soi dưới ánh sáng tia tử ngoại của máy soi gel UVP.

Giải trình tự Sanger: Sản phẩm nhân gen được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, Mỹ), giải trình tự tự động ABI 3100 Avant, được thực hiện bởi Công ty Thương mại Apical Scientific Laboratory (Malaysia).

3. Kết quả

3.1. Kết quả tối ưu điều kiện PCR đơn mồi

Trước khi chuẩn hóa quy trình cho phản ứng tetra-primer ARMS PCR cần chuẩn hóa điều kiện PCR: nồng độ mồi, nhiệt độ gắn mồi cho từng cặp mồi đồng thời kiểm tra mỗi cặp mồi thiết kế có khuếch đại đặc hiệu bằng lên đúng kích thước như tính toán hay không. Chúng tôi sử dụng các mẫu DNA chuẩn đã biết trước kiểu gen để tiến hành chạy gradient nhiệt độ gắn mồi cho từng cặp mồi với dải nhiệt độ 52,1-62,1°C. Kết quả cho nhiệt độ gắn mồi là 54°C làm nhiệt độ gắn mồi cho phản ứng tetra-primer ARMS PCR. Chúng tôi tiếp tục tiến hành kiểm tra tính đặc hiệu của mồi alen đột biến và mồi alen thường có đặc hiệu cho từng alen tại nhiệt độ gắn mồi 54°C (hình 2).

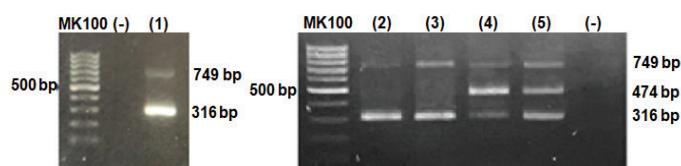


Hình 2. Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của mồi cho alen đột biến và alen thường. (-): đối chứng âm; (+): mẫu gen nội chuẩn làm chứng dương; MK100: thang chuẩn DNA 100 bp; (1, 4): DNA mẫu đồng hợp alen thường AA; (2, 3): DNA mẫu đồng hợp tử alen đột biến GG.

Quan sát kết quả hình 2, thí nghiệm 1 sử dụng mồi đặc hiệu cho alen thường thì chỉ có giếng số (1) của mẫu đồng hợp alen thường AA là lên băng 316 bp, giếng số (2) của mẫu đồng hợp tử alen đột biến GG không xuất hiện băng; thí nghiệm 2 sử dụng mồi cho alen đột biến thì giếng (3) của phản ứng sử dụng DNA mẫu GG lên băng 474 bp còn giếng số (4) của phản ứng sử dụng DNA có kiểu gen AA thì không có băng. Chứng (+) là các phản ứng khuếch đại đoạn gen nội chuẩn đều lên băng 749 bp, như vậy, DNA của các mẫu đều không có vấn đề; chứng (-) không xuất hiện băng đảm bảo phản ứng PCR thực hiện đúng kỹ thuật. Có thể thấy, đối với phản ứng đơn mồi đặc hiệu cho alen đột biến và alen thường tại nhiệt độ gắn mồi 54°C là rất tốt, không xảy ra tình trạng mồi đột biến lại được khuếch đại ở mẫu đồng hợp alen thường AA và ngược lại.

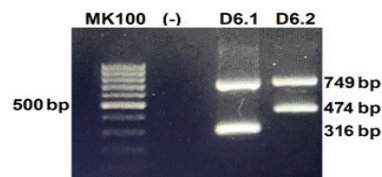
3.2. Kết quả tối ưu phản ứng tetra-primer ARMS PCR

Phản ứng tetra-primer ARMS PCR dùng cả 4 mồi trong 1 phản ứng do vậy sẽ có hiện tượng cạnh tranh giữa các mồi. Chính vì vậy, việc xác định tỷ lệ nồng độ các mồi trong phản ứng là điều vô cùng quan trọng. Tiếp theo, phản ứng tetra-primer ARMS PCR được tiến hành tối ưu nồng độ mồi tại nhiệt độ gắn mồi đã chọn là 54°C.



Hình 3. Kết quả tối ưu nồng độ mồi trên mẫu dị hợp tử (AG) bằng phản ứng tetra-primer ARMS PCR. (-): đối chứng âm; MK100: thang chuẩn DNA 100 bp. Nồng độ các mồi E415G-Fc, E415G-Ras-W, E415G-Fas-V, E415G-Rc lần lượt tại các giếng (1): 0,4 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M; (2): 0,16 μ M, 0,16 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M; (3): 0,2 μ M, 0,2 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M; (4): 0,08 μ M, 0,08 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M; (5): 0,12 μ M, 0,12 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M.

Kết quả điện di trên gel cho thấy, tại nồng độ mồi 0,4 μ M E415G-Fas-V, 0,4 μ M E415G-Rc, 0,12 μ M E415G-Fc, 0,12 μ M E415G-Ras-W xuất hiện cả 3 băng đích là 749, 474 và 316 bp đều sáng rõ, không xuất hiện băng phụ phù hợp với kiểu gen dị hợp tử của mẫu DNA khuôn đưa vào. Do đó, nồng độ các mồi này được sử dụng để chạy với các mẫu chuẩn đồng hợp thường AA (D6.1) và đồng hợp đột biến GG (D6.2) để kiểm tra độ đặc hiệu alen trong phản ứng tetra-primer ARMS PCR được kết quả như hình 4.



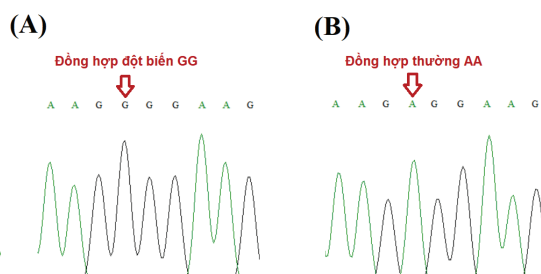
Hình 4. Kết quả phản ứng tetra-primer ARMS PCR với nồng độ mồi: 0,4 μ M E415G-Fas-V, 0,4 μ M E415G-Rc, 0,12 μ M E415G-Fc, 0,12 μ M E415G-Ras-W trên 2 mẫu chuẩn đồng hợp thường AA (D6.1) và đồng hợp đột biến GG (D6.2).

Kết quả điện di hình 4 cho thấy, tại mẫu đồng hợp alen thường (D6.1) xuất hiện 2 băng 749 bp cho gen nội chuẩn và 316 bp cho alen thường; mẫu đồng hợp đột biến (D6.2) cũng xuất hiện 2 băng 749 bp cho gen nội chuẩn và 474 bp cho alen đột biến. Như vậy, cả 2 mẫu đều lên các băng đúng kích thước như đã thiết kế ban đầu, các băng sáng rõ, đặc hiệu cho alen và không xuất hiện băng phụ. Sau khi chuẩn hóa các điều kiện, quy trình xác định SNP *exo-E415G* bằng kỹ thuật tetra-primer ARMS PCR đã được thiết lập thành công. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phản ứng tetra-primer ARMS PCR phát hiện SNP *exo-E415G*.

Thành phần	Thể tích (μl)	Nồng độ
Gotaq Green Mastermix (2X)	12,5	
E415G-Fc (10 μM)	0,3	0,12 μM
E415G-Ras-W (10 μM)	0,3	0,12 μM
E415G-Fas-V (10 μM)	1	0,4 μM
E415G-Rc (10 μM)	1	0,4 μM
H ₂ O	7,9	
DNA (30 ng/μl)	2	2,4 ng/μl
Tổng số	25	
Chu trình: 95°C-5 phút, (95°C-45 giây, 54°C-45 giây, 72°C-35 giây) x 40, 72°C-5 phút		

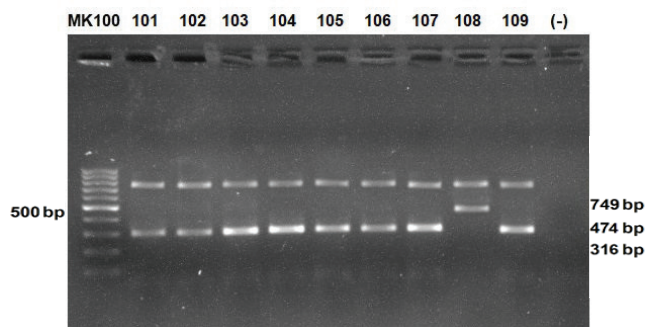
Trong số 123 mẫu bệnh phẩm, 16 mẫu được kiểm tra xác định kiểu gen *exo-E415G* bằng phương pháp Sanger. Kết quả cho thấy, 2 phương pháp có độ tương đồng 100%; trong 16 mẫu có 3/16 mẫu có kiểu gen AA; 13/16 mẫu có kiểu gen GG, không có mẫu mang kiểu gen dị hợp AG (hình 5).



Hình 5. Kết quả giải trình tự khẳng định tính chính xác của phản ứng tetra-primer ARMS PCR. (A) Mẫu đồng hợp alen đột biến; (B) Mẫu đồng hợp alen thường.

3.3. Kết quả khảo sát tỷ lệ đột biến *exo-E415G* tại khu vực Tây Nguyên

Sau khi đã tối ưu thành công quy trình phản ứng tetra-primer ARMS PCR xác định SNP *exo-E415G*, chúng tôi tiến hành kiểm tra trên toàn bộ 123 mẫu bệnh thất bại điều trị với artemisinin tại 3 tỉnh (Gia Lai, Đắk Nông, Đắk Lắk) thuộc khu vực Tây Nguyên. Kết quả cụ thể thu được như ở hình 6 và bảng 2.



Hình 6. Kết quả khảo sát đột biến *exo-E415G* bằng phản ứng tetra-primer ARMS PCR trên một số mẫu. (-): đối chứng âm; MK100: thang chuẩn ADN 100 bp; 101-109: các mẫu ADN được tách từ mẫu máu toàn phần.

Bảng 2. Kết quả khảo sát đột biến *exo-E415G* khu vực Tây Nguyên.

Kiểu gen	Tỷ lệ mẫu			Tổng số
	Gia Lai	Đắk Nông	Đắk Lắk	
AA	14/48 (29%)	8/40 (20%)	5/35 (14%)	27/123 (22%)
AG	0/48 (0%)	0/40 (0%)	0/35 (0%)	0/123 (0%)
GG	34/48 (71%)	32/40 (80%)	30/35 (86%)	96/123 (78%)

Tỷ lệ mẫu mang đột biến *exo-E415G* tại khu vực Tây Nguyên là 78% (96/123) trong đó, tỉnh Đắk Lắk có tỷ lệ đột biến cao nhất lên đến 86% (30/35), tỉnh Gia Lai có tỷ lệ đột biến thấp nhất là 71% (34/48).

4. Bàn luận

Ngày nay với sự phát triển của công nghệ giải trình tự gen cùng với nghiên cứu tương quan toàn bộ nhiễm sắc thể (GWAS), chúng ta có thể xác định các dấu hiệu phân tử tiềm ẩn khả năng kháng thuốc như các SNP trong quần thể KST. Những báo cáo đầu tiên về KST *P. falciparum* kháng thuốc ở bệnh nhân thất bại điều trị bằng ACTs có liên quan đến SNP *exo-E415G*. Hiện tại đã có nhiều phương pháp được phát triển để xác định SNP, tuy nhiên các phương pháp này có giá thành cao, đòi hỏi trang thiết bị hiện đại, nhân viên được đào tạo kỹ thuật tốt. Để khắc phục hạn chế đó ở các phòng thí nghiệm chưa có trang thiết bị đầy đủ, cần triển khai một phương pháp đơn giản, tiết kiệm chi phí nhưng vẫn đảm bảo độ chính xác để xác định SNP *exo-E415G*. Các phần mềm tin sinh học được sử dụng để thiết kế mồi và thiết lập, tối ưu quy trình phản ứng tetra-primer ARMS PCR cho xác định SNP *exo-E415G*. Kết quả nghiên cứu này cho thấy độ tương đồng 100% khi đối chiếu so sánh với phương pháp giải trình tự gen.

Đột biến *exo-E415G* nằm trên gen mã hóa cho exonuclease, là các enzym phân cắt nucleotide từ đầu 3' hoặc 5' của ADN. Hoạt động exonuclease không chỉ trong quá trình sao chép ADN mà còn được cho là cần thiết trong sửa chữa kết nối không tương đồng. Các giả thuyết cũng được đưa ra rằng, đột biến *exo-E415G* làm ảnh hưởng đến khả năng đọc sửa của

exonuclease dẫn đến tăng hoặc giảm các đột biến trong KST làm hình thành các kiểu hình kháng thuốc. Tuy đột biến *exo-E415G* không làm thay đổi tính nhạy cảm với piperazine [9], các nghiên cứu gần đây cũng cho thấy, *exo-E415G* thường được liên kết chặt chẽ với sự gia tăng số bản sao gene *plasmepsin 2/3*, một chỉ thị sinh học khác liên quan đến tính kháng artemisinin [4, 6]. Vì vậy, các nghiên cứu tiếp theo trong tương lai có thể sẽ làm rõ hơn vai trò của đột biến *exo-E415G* đối với tính kháng artemisinin của *P. falciparum*.

Nghiên cứu này chỉ ra tỷ lệ mẫu bệnh phẩm mang alen đột biến chiếm 96/123 mẫu tương đương với 78% cho thấy đột biến rất phổ biến tại khu vực Việt Nam cũng tương tự như đã thấy ở nước láng giềng Lào, Thái Lan và Campuchia. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của H.H. Quang và cs (2021) [7] với tỷ lệ xuất hiện SNP *Exo-E415G* là 80%. Tuy nhiên, tỉnh Đắk Nông lại có sự gia tăng đáng kể tỷ lệ KST sốt rét mang đột biến từ 66,7% (2021) lên thành 80% (2022) chỉ trong một khoảng thời gian ngắn. Điểm chung của cả 3 tỉnh trong nghiên cứu này là đều có đường biên giới chung với Campuchia, nơi có tỷ lệ gia tăng đột biến *exo-E415G* ở mức cao trong khu vực. Trong khi đó, theo nghiên cứu của N.C. Phong và cs (2019) [2] tại tỉnh Ninh Thuận, nơi không có đường biên giới với Campuchia thì không tìm thấy đột biến *exo-E415G* tại khu vực này. Có thể thấy sự gia tăng tình trạng giao lưu, đi lại của người dân qua biên giới đặc biệt là với Campuchia đã làm tăng nguy cơ lan truyền sốt rét cũng như KST sốt rét kháng thuốc, gây trở ngại lớn đến công cuộc phòng chống sốt rét.

Từ những năm 2011 đến 2013 đã có sự gia tăng đáng kể tình trạng kháng thuốc với DHA-PPQ tại 3 tỉnh là Ratanakiri, Preah Vihear và Pursat của Campuchia [6]. Phân tích SNP trên toàn bộ bộ gen của KST *P. falciparum* đã xác định được đột biến *exo-E415G* trên nhiễm sắc thể số 13 có liên kết với sự tái phát của KST sau khi điều trị bằng DHA-PPQ. R. Amato và cs (2017) [6] đã tiến hành khảo sát SNP *exo-E415G* bằng phương pháp giải trình tự tại Campuchia thu được tỷ lệ đột biến tại 3 tỉnh Ratanakiri, Preah Vihear và Pursat lần lượt là 15,38 (2/13), 40 (8/20) và 81,58% (31/38) vào năm 2013; trong khi đó, tỷ lệ đột biến tại 3 tỉnh này vào năm 2011 lần lượt chỉ là 0 (0/71), 0 (0/66) và 58,5% (48/82). Như vậy, tần suất xuất hiện của *exo-E415G* ở Campuchia đã có xu hướng tăng lên theo thời gian và có nguy cơ lan rộng sang các nước láng giềng, trong đó có Việt Nam. Tuy nhiên, các nghiên cứu về *exo-E415G* tại Thái Lan và Lào hiện nay vẫn còn hạn chế, chưa có số liệu được công bố.

Tại châu Phi, rất ít trường hợp kháng với DHA-PPQ đã được mô tả tại đây. Hai trường hợp điều trị DHA-PPQ thất bại sau 30 và 32 ngày đã được báo cáo là các du khách người Ý trở về từ Ethiopia. Tại Senegal, DHA-PPQ không còn được coi là liệu pháp điều trị ưu tiên mà thay vào đó sự kết hợp artemether-lumefantrine và artesunate-amodiaquine được sử dụng nhiều nhất ở đây. Tổng số 77 mẫu bệnh nhân đang điều trị sốt rét tại Senegal đã được đem đi giải trình tự để khảo sát đột biến

exo-E415G, kết quả thu được tất cả các mẫu đều có kiểu hình hoang dã, như vậy *exo-E415G* không được tìm thấy tại Senegal [10]. Đường như với sự thay đổi và phối hợp các liệu pháp điều trị sốt rét khác nhau mà hiện tượng KST sốt rét mang đột biến kháng thuốc có thể không xảy ra phổ biến tại khu vực này. Năm 2020 cũng đã có những nghiên cứu tại Cameroon và Nam Mỹ những nơi chưa sử dụng ACTs làm liệu pháp chính để điều trị sốt rét thì kết quả cũng không phát hiện được đột biến *exo-E415G*. Điều này cũng chứng tỏ *exo-E415G* là một trong những chỉ thị sinh học phân tử đáng tin cậy để phát hiện KST *P. falciparum* kháng artemisinin.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã thiết lập được quy trình đơn giản, chính xác, tiết kiệm thời gian để xác định SNP *exo-E415G* bằng phương pháp tetra-primer ARMS-PCR. Phương pháp này cho kết quả chính xác khi so sánh với phương pháp giải trình tự. Nghiên cứu đã bước đầu khảo sát tần suất đột biến *exo-E415G* ở khu vực Tây Nguyên và kiến nghị phương pháp này nên được sử dụng cho xác định SNP *exo-E415G* trên quy mô lớn tại các điểm nóng về sốt rét tại Việt Nam cũng như trên thế giới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organization (2021), *World Malaria Report 2011*, <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/worldmalaria-report-2021>, accessed 2 May 2022.
- [2] N.C. Phong, M. Chavchich, H.H. Quang, et al. (2019), "Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinins and *Plasmodium vivax* to chloroquine in Phuoc Chien commune, Ninh Thuan province, south-central Vietnam", *Malar. J.*, **18**(1), DOI: 10.1186/s12936-019-2640-2.
- [3] V. Duru, B. Witkowski, D. Ménard (2016), "*Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin derivatives and piperazine: A major challenge for malaria elimination in Cambodia", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **95**(6), pp.1228-1238, DOI: 10.4269/ajtmh.16-0234.
- [4] M.R. Ansbro, C.G. Jacob, R. Amato, et al. (2020), "Development of copy number assays for detection and surveillance of piperazine resistance associated *plasmepsin 2/3* copy number variation in *Plasmodium falciparum*", *Malar. J.*, **19**, DOI: 10.1186/s12936-020-03249-x.
- [5] C. Nsanabana (2019), "Resistance to artemisinin combination therapies (ACTs): Do not forget the partner drug!", *Trop. Med. Infect. Dis.*, **4**(1), DOI: 10.3390/tropicalmed4010026.
- [6] R. Amato, P. Lim, O. Miotto, et al. (2017), "Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: A genotype-phenotype association study", *Lancet Infect. Dis.*, **17**(2), pp.164-173, DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30409-1.
- [7] H.H. Quang, M. Chavchich, N.T.M. Trinh, et al. (2021), "Multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* parasites in the central highlands of Vietnam jeopardize malaria control and elimination strategies", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **65**(4), DOI: 10.1128/AAC.01639-20.
- [8] R.F.V. Medrano, C.A.D. Oliveira (2014), "Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development", *Mol. Biotechnol.*, **56**(7), pp.599-608, DOI: 10.1007/s12033-014-9734-4.
- [9] N. Boonyalai, K. Kirativanich, C. Thamnurak, et al. (2022), "A single point mutation in the *Plasmodium falciparum* 3'-5' exonuclease does not alter piperazine susceptibility", *Malar. J.*, **21**, DOI: 10.1186/s12936-022-04148-z.
- [10] M.G. Robert, F.F. Tsombeng, M. Gendrot, et al. (2019), "Baseline *ex vivo* and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperazine before implementation of Dihydroartemisinin-piperazine in Senegal", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **63**(5), DOI: 10.1128/AAC.02445-18.

Ảnh hưởng của bất hoạt bằng nhiệt đối với giá trị CT trong kỹ thuật xác định SARS-CoV-2 bằng phương pháp realtime RT-PCR

Hoàng Xuân Quảng, Bùi Tiến Dũng, Đặng Tiến Trường*

Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y, 222 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/11/2021; ngày chuyển phản biện 25/11/2021; ngày nhận phản biện 15/12/2021; ngày chấp nhận đăng 20/12/2021

Tóm tắt:

SARS-CoV-2 gây ra đại dịch COVID-19 toàn cầu vào năm 2019. Giá trị chu kỳ ngưỡng (CT) của kỹ thuật realtime RT-PCR là tiêu chuẩn vàng trong xác định nhiễm, đánh giá nguy cơ lây nhiễm và tiêu chuẩn ra viện, hết cách ly bệnh nhân. Bất hoạt nhiệt là giải pháp đơn giản, kinh tế giúp đảm bảo an toàn trong xét nghiệm SARS-CoV-2. Sự thay đổi của giá trị CT sau khi bất hoạt bằng nhiệt chưa được đánh giá đầy đủ. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của phương pháp bất hoạt bằng nhiệt tới giá trị CT trong kỹ thuật realtime RT-PCR xác định SARS-CoV-2. Bốn nhóm mẫu, gồm một nhóm không bất hoạt, ba nhóm bất hoạt ở 65°C/30 phút, 80°C/10 phút và 95°C/10 phút; mỗi nhóm gồm 16 ống bệnh phẩm, được chia từ 16 bệnh phẩm dịch tỵ hầu đã được xác định nhiễm SARS-CoV-2, các nhóm được xử lý bất hoạt, sau đó tiến hành phân tích bằng kỹ thuật realtime PCR. Kết quả cho thấy, bất hoạt virus bằng nhiệt trước làm tăng giá trị CT của kỹ thuật realtime RT-PCR trong xác định các mẫu dương tính với SARS-CoV-2. Nhiệt độ bất hoạt càng lớn thì giá trị CT càng tăng cao.

Từ khóa: bất hoạt bằng nhiệt, realtime RT-PCR, SARS-CoV-2.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Vào tháng 12/2019, một loại coronavirus có tên là SARS-CoV-2 xuất hiện ở TP Vũ Hán, tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc. Virus này nhanh chóng lây lan sang hầu hết các quốc gia trong vòng 2 tháng và trở thành đại dịch COVID-19 vào đầu năm 2020 [1-3]. Số lượng người nhiễm và tử vong liên tục tăng cao, gây ra gánh nặng cho nền y tế, làm tổn thất nặng nề về kinh tế, xã hội toàn cầu. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), tính đến ngày 7/11/2021, hơn 249 triệu trường hợp được xác nhận nhiễm COVID-19 và hơn 5 triệu trường hợp tử vong đã được báo cáo [4].

Do chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu nên việc chẩn đoán chính xác và nhanh chóng là rất quan trọng trong việc phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh [5]. Bên cạnh đó, xử lý đúng các mẫu bệnh phẩm nhiễm hoặc nghi ngờ nhiễm SARS-CoV-2 trước khi xét nghiệm có vai trò rất quan trọng để đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế, giúp ngăn ngừa nguy cơ phát tán virus ra môi trường, từ đó giúp bảo vệ cộng đồng [6]. SARS-CoV-2 có khả năng lây lan mạnh nên các mẫu bệnh phẩm được khuyến cáo cần được bất hoạt trước khi thực hiện xét nghiệm. Có nhiều phương pháp bất hoạt, tuy nhiên phương pháp bất hoạt bằng nhiệt đơn giản, kinh tế, tiết kiệm thời gian và có thể thực hiện với số lượng lớn nên phù hợp triển khai thực hiện ở nhiều phòng xét nghiệm ở các cấp độ khác nhau [3, 7].

Xét nghiệm realtime RT-PCR được coi là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán nhiễm COVID-19 [8]. Kết quả xét nghiệm dựa trên chỉ số CT của kỹ thuật realtime RT-PCR. Chỉ số CT để xác định kết quả âm tính hay dương tính khác nhau giữa các bộ kit. Chỉ số CT

của một bộ kit cũng có thể bị ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau. Trong đó, bất hoạt bằng nhiệt có thể làm thay đổi chỉ số CT của kỹ thuật. Đã có nghiên cứu chỉ ra việc giảm tỷ lệ phát hiện SARS-CoV-2, tăng tỷ lệ âm tính giả khi bất hoạt virus bằng nhiệt, tuy nhiên kết quả này không có sự thống nhất [9, 10]. Nghiên cứu này nhằm khảo sát ảnh hưởng của bất hoạt bằng nhiệt đối với giá trị CT của kỹ thuật realtime RT-PCR trong xét nghiệm SARS-CoV-2.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

16 mẫu bệnh phẩm dịch tỵ hầu, bảo quản trong môi trường vận chuyển không bất hoạt vì rút, thu từ 16 bệnh nhân khác nhau, được chẩn đoán nhiễm SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật realtime RT-PCR (giá trị CT ở bảng 1), tại phòng xét nghiệm khẳng định. Mẫu bệnh phẩm được bảo quản ở 2-8°C, trong vòng 12 giờ sau khi thu mẫu.

Bảng 1. Giá trị CT của 16 mẫu nghiên cứu.

Mã mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CT	16,5	15,2	15,3	16,6	16,8	17,1	17,5	13,8	15,5	15,6	16,0	17,4	16,2	17,5	16,8	17,4

2.2. Bất hoạt vi rút bằng nhiệt

Mỗi bệnh phẩm được trộn đều, chuyển vào 4 ống Eppendorf 1,5 ml, mỗi ống 350 µl. Các ống được chia thành 4 nhóm, gồm:

- Nhóm 1 (nhóm chứng): Không sấy, bảo quản mẫu ở tủ lạnh 2-8°C.
- Nhóm 2: Sấy ở 65°C trong 30 phút.
- Nhóm 3: Sấy ở 80°C trong 10 phút.
- Nhóm 4: Sấy ở 95°C trong 10 phút.

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

Effect of heat inactivation on CT value of realtime RT-PCR technique for SARS-CoV-2 detection

Xuan Quang Hoang, Tien Dung Bui,
Tien Truong Dang*

Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical University,
222 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 17 May 2022; revised 2 June 2022; accepted 7 June 2022

Abstract:

SARS-CoV-2 was the cause of the global COVID-19 pandemic in 2019. The cycle threshold (CT) value of the real-time RT-PCR technique is the gold standard in infections diagnosis, infections risk assessment, discharged criteria, and patient isolation for SARS-CoV-2. Heat inactivation is a simple, economical solution for safety in testing for SARS-CoV-2. The change of CT values after heat inactivation has not been thoroughly evaluated. This study evaluated the effect of heat inactivation on CT value in the realtime RT-PCR technique of SARS-CoV-2 detection. Four groups of samples consisted of one non-inactivated group, three groups that were inactivated at 65°C/30min, 80°C/10min, and 95°C/10min; each group included 16 tubes, from 16 nasopharyngeal swabs samples that were confirmed to be infected with SARS-CoV-2. Groups were inactivated and then analysed by realtime PCR technique. The results show that virus inactivation by heat increased the CT value of realtime PCR in SARS-CoV-2 positive samples. The higher temperature was in the inactivation, and the higher CT value was increased.

Keywords: heat-inactivation, realtime RT-PCR, SARS-CoV-2.

Classification number: 3.1

Sau khi bất hoạt bằng nhiệt trên hệ thống HV 110 (Hirayama, Nhật Bản), các mẫu được mã hóa và thực hiện các bước tiếp theo.

2.3. Tách chiết ARN

ARN được tách chiết bằng bộ kit ab Genix TM Viral DNA/RNA Extraction Kit (AIT Biotech, Singapore) trên hệ thống tách chiết tự động ABGENIX theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ARN sau khi được tách chiết chuyển sang giai đoạn phân tích bằng kỹ thuật realtime RT-PCR.

2.4. Phát hiện SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật realtime RT-PCR

Phản ứng realtime RT-PCR sử dụng bộ kit LightPower SARS-CoV-2 1st RT-PCR (Vieta Corp) trên hệ thống AriaMx (Agilent) theo khuyến cáo của nhà sản xuất, được tóm tắt như sau: Mỗi phản ứng được bổ sung 5 µl ARN được tách chiết từ mẫu bệnh phẩm. Bộ kit được thiết kế trên vùng gen mục tiêu là gen N của

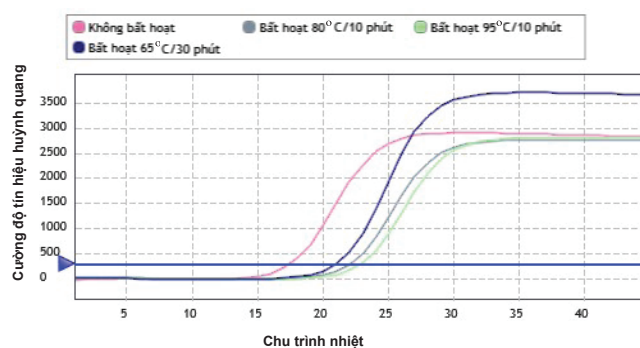
SARS-CoV-2, ARN của SARS-CoV-2 được thu nhập từ mẫu bệnh phẩm sau đó được chuyển thành cDNA rồi nhân bản bằng kỹ thuật realtime PCR. TaqMan probe màu FAM khuếch đại gen đích N của SARS-CoV-2. Chứng nội sinh (HEX) cho phép kiểm soát toàn bộ quá trình từ thu nhận mẫu đến thu nhận kết quả. Chu trình nhiệt gồm: giai đoạn RT ở 50°C trong 10 phút; tiếp theo, 1 chu kỳ ở 95°C trong 5 phút và 45 chu kỳ (95°C-15 giây, 55°C-45 giây).

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả phân tích của các mẫu, các nhóm được phân tích tự động bằng phần mềm AriaMx (Agilent). Kết quả CT trung bình của các nhóm được so sánh và kiểm định Wilcoxon sign rank test.

3. Kết quả

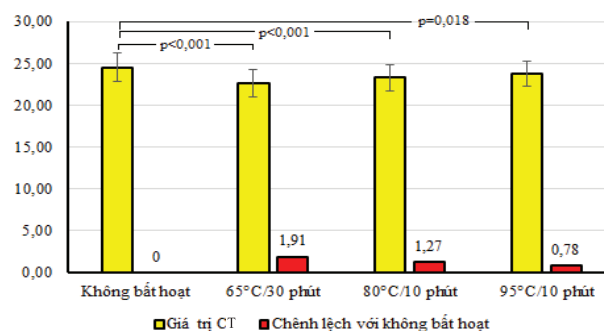
Kết quả chạy phản ứng realtime RT-PCR của các nhóm bất hoạt và không bất hoạt được minh họa ở hình 1.



Hình 1. Minh họa kết quả realtime RT-PCR của các nhóm bất hoạt và không bất hoạt.

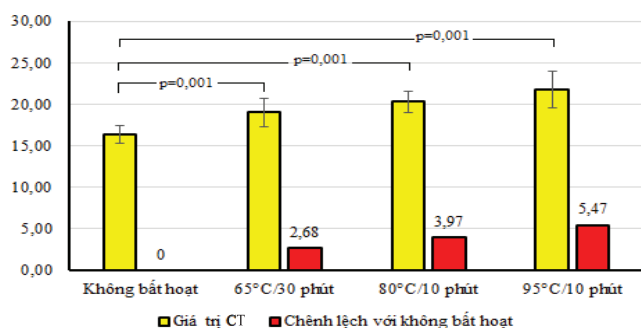
Kết quả hình 1 cho thấy, tín hiệu của nhóm không bất hoạt có tín hiệu lên sớm nhất, tiếp theo là nhóm bất hoạt ở 65°C/30 phút, nhóm 80°C/10 phút và cuối cùng là nhóm 95°C/10 phút.

CT của chứng nội chuẩn ở các mẫu, thuộc các nhóm đều đạt yêu cầu (CT<35). Giá trị CT nhóm bất hoạt bằng nhiệt, ở các nhiệt độ khác nhau đều thấp hơn giá trị CT của nhóm không được bất hoạt, cụ thể: bất hoạt 65°C/30 phút là 1,91, bất hoạt 80°C/10 phút là 1,27 và 0,78 với nhóm bất hoạt 95°C/10 phút với p lần lượt là 0,001, 0,001 và 0,018 (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1. Giá trị CT (chứng nội chuẩn) của các nhóm bất hoạt và không bất hoạt.

Tất cả các mẫu thuộc các nhóm không được bất hoạt và được bất hoạt bằng nhiệt đều có kết quả dương tính. Tuy nhiên, giá trị CT của các nhóm bất hoạt bằng nhiệt đều cao hơn ở nhóm không bất hoạt bằng nhiệt. CT của mẫu được bất hoạt ở nhiệt độ cao thì cao hơn CT của mẫu được bất hoạt ở nhiệt độ thấp hơn ($p=0,001$) (biểu đồ 2). CT của nhóm không được bất hoạt là 16,32, thấp hơn CT của các nhóm được bất hoạt bằng nhiệt bất hoạt ở 65°C/30 phút là 2,68; 80°C/10 phút là 3,97; 95°C/10 phút là 5,47 ($p<0,001$).



Biểu đồ 2. Giá trị CT (gen N của SARS-CoV-2) của các nhóm bất hoạt và không bất hoạt.

4. Bàn luận

Vào đầu năm 2019, SARS-CoV-2 đã gây ra đại dịch toàn cầu, lây nhiễm hàng trăm triệu người, gây tử vong hàng triệu người, gây ra vấn đề lớn về y tế, kinh tế và xã hội cho các nước. Kỹ thuật realtime RT-PCR được coi là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán bệnh. CT của gen đích là giá trị giúp chẩn đoán xác định tình trạng nhiễm bệnh. Bên cạnh đó, CT là giá trị quan trọng trong tiêu chuẩn ra viện, khả năng lây nhiễm cho cộng đồng [11]. Vì vậy, tất cả các yếu tố ảnh hưởng đến giá trị CT trong quá trình tiến hành xét nghiệm SARS-CoV-2 đều cần được xem xét, đánh giá ở mỗi phòng thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, giá trị CT ở các nhóm bất hoạt bằng nhiệt đều cao hơn so với nhóm không bất hoạt bằng nhiệt. Thay đổi của CT càng lớn khi nhiệt độ bất hoạt càng lớn, thấp nhất là 2,68 ở 65°C/30 phút và cao nhất là 5,47 95°C/10 phút ($p<0,001$). Hiện tượng này có thể do một số lý do như: Thứ nhất, môi trường bảo quản vi rút đang được tạo ra với mục đích bảo vệ vi rút ở nhiệt độ thấp phục vụ cho việc xét nghiệm, chứ không phải bảo vệ vi rút ở nhiệt độ cao cho bất hoạt vi rút, do đó khi bất hoạt bằng nhiệt, axit nucleic của vi rút có thể bị phân hủy một phần. Thứ hai, bất hoạt vi rút ở nhiệt độ cao có thể gây thoái hóa ARN của SARS-CoV-2 trong thời gian ngắn. Thứ ba, việc đun nóng kéo dài có thể dẫn đến sản sinh chất ức chế phản ứng realtime RT-PCR [3].

Kết quả cho thấy, việc bất hoạt vi rút bằng nhiệt làm tăng giá trị CT của các mẫu dương tính. Điều này có nguy cơ xuất hiện tình trạng âm tính giả ở các mẫu có tải lượng vi rút thấp. Hơn nữa, với CT tiêu chuẩn là 30 được coi rất khó có thể lây nhiễm cho người xung quanh ở giai đoạn thoái lui của bệnh, là tiêu chuẩn ra viện

trong các phác đồ điều trị, quản lý bệnh nhân COVID-19 hiện nay. Ảnh hưởng của bất hoạt bằng nhiệt có thể làm tăng CT là 27 của các bệnh nhân vẫn còn khả năng lây nhiễm cho cộng đồng lên 30-31 sau khi được bất hoạt, được coi là không lây nhiễm cho cộng đồng.

Trong đại dịch, việc bất hoạt vi rút nhằm đảm bảo an toàn cho cộng đồng và nhân viên y tế là nguyên tắc cơ bản đảm bảo an toàn xét nghiệm. Tuy nhiên, kỹ thuật viên làm xét nghiệm cần hiểu rõ ảnh hưởng của phương pháp này đến giá trị CT của kỹ thuật và kết quả xét nghiệm. Việc này càng cần được quan tâm trong các trường hợp sàng lọc, mẫu gộp và chẩn đoán xác định tránh bỏ sót các trường hợp nhiễm bệnh cũng như giải phóng cách ly và cho ra viện quá sớm.

5. Kết luận

Bất hoạt vi rút bằng nhiệt trước giúp đảm bảo an toàn cho nhân viên và cộng đồng. Tuy nhiên, quá trình này có thể làm tăng giá trị CT của kỹ thuật realtime RT-PCR trong xác định các mẫu dương tính với SARS-CoV-2. Nhiệt độ bất hoạt càng lớn thì giá trị CT tăng lên càng cao. Phương pháp sấy mẫu ở 65°C trong 30 phút là tối ưu nên được áp dụng trong bất hoạt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/worldmalaria-report-2021>, accessed 2 May 2022.
- [2] N.C. Phong, M. Chavchich, H.H. Quang, et al. (2019), "Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinins and *Plasmodium vivax* to chloroquine in Phuoc Chien commune, Ninh Thuan province, south-central Vietnam", *Malar. J.*, **18**(1), DOI: 10.1186/s12936-019-2640-2.
- [3] V. Duru, B. Witkowski, D. Ménard (2016), "*Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin derivatives and piperazine: A major challenge for malaria elimination in Cambodia", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **95**(6), pp.1228-1238, DOI: 10.4269/ajtmh.16-0234.
- [4] M.R. Ansbro, C.G. Jacob, R. Amato, et al. (2020), "Development of copy number assays for detection and surveillance of piperazine resistance associated *plasmepsin 2/3* copy number variation in *Plasmodium falciparum*", *Malar. J.*, **19**(1), DOI: 10.1186/s12936-020-03249-x.
- [5] C. Nsanabana (2019), "Resistance to artemisinin combination therapies (ACTs): Do not forget the partner drug!", *Trop. Med. Infect. Dis.*, **4**(1), DOI: 10.3390/tropicalmed4010026.
- [6] R. Amato, P. Lim, O. Miotto, et al. (2017), "Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: A genotype-phenotype association study", *Lancet Infect. Dis.*, **17**(2), pp.164-173, DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30409-1.
- [7] H.H. Quang, M. Chavchich, N.T.M. Trinh, et al. (2021), "Multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* parasites in the central highlands of Vietnam jeopardize malaria control and elimination strategies", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **65**(4), DOI: 10.1128/AAC.01639-20.
- [8] R.F. Medrano, C.A. de Oliveira (2014), "Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development", *Mol. Biotechnol.*, **56**(7), pp.599-608, DOI: 10.1007/s12033-014-9734-4.
- [9] N. Boonyalai, K. Kirativanich, C. Thamnurak, et al. (2022), "A single point mutation in the *Plasmodium falciparum* 3'-5' exonuclease does not alter piperazine susceptibility", *Malar. J.*, **21**(1), DOI: 10.1186/s12936-022-04148-z.
- [10] M.G. Robert, F.F. Tsombeng, M. Gendrot, et al. (2019), "Baseline *ex vivo* and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperazine before implementation of Dihydroartemisinin-piperazine in Senegal", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **63**(5), DOI: 10.1128/AAC.02445-18.

Xác định tần suất mang gen *erm*(B) và *mef*(A) ở các chủng *Streptococcus pneumoniae* kháng macrolide thu thập từ trẻ dưới 5 tuổi bị viêm phổi tại Nghệ An (2019-2021)

Bùi Anh Sơn¹, Dương Đình Chính², Lê Thị Hồng Hạnh³, Đỗ Ngọc Ánh^{4*}

¹Bệnh viện Sản Nhi Nghệ An, 19 Tôn Thất Tùng, phường Hưng Dũng, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

²Sở Y tế Nghệ An, 18 Trường Thi, phường Trường Thi, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

³Bệnh viện Nhi Trung ương, 18/879 La Thành, phường Láng Thượng, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

⁴Học viện Quân y, 160 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/2/2022; ngày chuyển phản biện 17/2/2022; ngày nhận phản biện 10/3/2022; ngày chấp nhận đăng 15/3/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm xác định tần suất mang gen *erm*(B) và *mef*(A) ở các chủng phế cầu khuẩn kháng sinh macrolide thu thập từ trẻ dưới 5 tuổi bị viêm phổi tại Nghệ An (2019-2021). Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm trên 126 chủng phế cầu khuẩn kháng sinh macrolide trong thời gian từ tháng 11/2019 đến tháng 12/2021. Vi khuẩn phế cầu khuẩn phân lập từ trẻ dưới 5 tuổi bị viêm phổi được định danh bằng hình thái, hệ thống định danh VITEK® 2 Compact và cấp mỗi đặc hiệu. Mức độ nhạy cảm của phế cầu khuẩn với kháng sinh được xác định bằng hệ thống VITEK® 2 Compact và phân loại tình trạng kháng thuốc dựa vào nồng độ ức chế tối thiểu theo hướng dẫn của Viện Kiểm chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm Hoa Kỳ năm 2020. Sự có mặt của các gen *erm*(B) và *mef*(A) được xác định bằng các phản ứng PCR. Kết quả nghiên cứu trên 126 chủng phế cầu khuẩn kháng sinh macrolide cho thấy, tần suất mang gen *erm*(B) và *mef*(A) lần lượt là 92,1 và 57,9%. Tần suất mang ít nhất một trong hai gen này là 95,3% và tần suất mang đồng thời hai gen là 54,8%. Kết quả cho thấy, tần suất mang các gen *erm*(B) và *mef*(A) liên quan đến kháng thuốc nhóm macrolide ở phế cầu khuẩn rất phổ biến tại Nghệ An.

Từ khóa: *erm*(B), kháng thuốc, macrolide, *mef*(A), *Streptococcus pneumoniae*.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Phế cầu khuẩn (*Streptococcus pneumoniae*) là vi khuẩn gram dương, có dạng hình cầu, kỵ khí tùy nghi và gây tan máu alpha. Vi khuẩn này là mầm bệnh quan trọng gây ra viêm phổi cộng đồng, viêm xoang, viêm tai giữa, viêm màng não và nhiễm khuẩn huyết ở trẻ em dưới 5 tuổi với tỷ lệ tử vong cao [1]. Các bệnh do phế cầu khuẩn là vấn đề sức khỏe cộng đồng được quan tâm trên toàn thế giới [2]. Theo B. Wahl và cs (2018) [3], mỗi năm trên thế giới có khoảng 317.300 trẻ em dưới 5 tuổi tử vong do phế cầu khuẩn, tập trung chủ yếu ở các quốc gia có thu nhập thấp. Vi khuẩn này cũng có thể gây ra các nhiễm trùng xâm lấn ở người cao tuổi và người có hệ miễn dịch suy yếu [1].

Vào những năm 80-90 của thế kỷ trước, tình trạng kháng penicilin ở phế cầu khuẩn trở nên rất phổ biến nên các kháng sinh nhóm macrolide đã được lựa chọn sử dụng thay thế. Tuy nhiên, chính việc sử dụng các kháng sinh macrolide một cách rộng rãi dẫn tới tình trạng kháng kháng sinh macrolide lan rộng ở vi khuẩn này [4]. Tỷ lệ kháng kháng sinh macrolide của phế cầu khuẩn thay đổi theo khu vực địa lý, dao động từ 10 đến trên 90% [4]. Kháng thuốc nhóm macrolide ở cầu khuẩn nói chung và phế cầu khuẩn nói riêng thường do 2 cơ chế: (1) Thay đổi ở vị trí đích trên gen 23S ribosome làm kích hoạt sinh enzyme (được mã hóa bởi các gen thuộc họ *erm* như *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(E) nằm trên plasmid của vi khuẩn) ngăn chặn quá

trình gắn thuốc vào vi khuẩn; (2) Tạo ra các kênh bơm thuốc ra khỏi vi khuẩn (được mã hóa bởi các gen như *mef* và *msr*) [4, 5]. Tình trạng kháng thuốc của phế cầu khuẩn ngày càng gia tăng, nhất là ở châu Á, khiến cho việc sử dụng kháng sinh theo kinh nghiệm trở nên ít hiệu quả [6]. Do vậy, những hiểu biết về tình trạng kháng thuốc và cơ chế kháng thuốc là rất cần thiết để đưa ra những hướng dẫn sử dụng kháng sinh phù hợp, hiệu quả trong điều trị các bệnh do phế cầu khuẩn [7].

Ở Việt Nam, tỷ lệ kháng kháng sinh nhóm macrolide ở phế cầu khuẩn khá cao (trên 75%) [8, 9] và một số gen như *erm*(A), *erm*(B), *mef*(A) và *msr*(D) đã được khảo sát, phân tích ở các chủng phế cầu khuẩn gây bệnh [10, 11]. Tuy nhiên, dữ liệu về các gen liên quan đến kháng thuốc của phế cầu khuẩn vẫn còn rất hạn chế, nhất là tại Nghệ An. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xác định tần suất mang gen *erm*(B) và *mef*(A) ở các chủng phế cầu khuẩn kháng kháng sinh macrolide thu thập từ trẻ dưới 5 tuổi bị viêm phổi tại Nghệ An (2019-2021).

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Phân lập và định danh vi khuẩn *S. pneumoniae*

Trong nghiên cứu này, tổng số 126 chủng phế cầu khuẩn được phân lập từ dịch tị hầu/dờm của trẻ từ 2 đến 59 tháng tuổi bị viêm phổi cấp tại Bệnh viện Sản nhi Nghệ An trong

*Tác giả liên hệ: Email: dranhh61.vmmu@gmail.com

Prevalence of *mef(A)* and *erm(B)* in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in children with pneumonia in Nghe An (2019-2021)

Anh Son Bui¹, Dinh Chinh Duong²,
Thi Hong Hanh Le³, Ngoc Anh Do^{4*}

¹Nghe An Obstetrics and Pediatrics Hospital,
19 Ton That Tung Street, Hung Dung Ward, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

²Nghe An Department of Health,
18 Trung Thi Street, Trung Thi Ward, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

³National Pediatrics Hospital,
18/879 La Thanh Street, Lang Thuong Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

⁴Vietnam Military Medical University,
160 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 15 February 2022; revised 10 March 2022; accepted 15 March 2022

Abstract:

The present study aimed to determine the incidence of *erm(B)* and *mef(A)* among macrolide-resistant *S. pneumoniae* isolated in children with pneumonia in Nghe An province (2019-2021). A total of 126 clinical pneumococcal strains isolated from unvaccinated children less than 5 years of age with pneumonia at the Nghe An Obstetrics and Pediatrics Hospital, Vietnam during the period from Nov 2019 and Dec 2021. All strains were identified using conventional microbiological method, VITEK® 2 Compact system and specific PCR. The antimicrobial resistance patterns of pneumococcal strains were determined using the VITEK® 2 Compact system. Polymerase chain reaction (PCR) assay were used to detect the macrolide resistance genes *erm(B)* and *mef(A)*. Of the 126 isolates, 92.1% (116 of 126) were PCR positive for *erm(B)* and 57.9% (73 of 126) were PCR positive for *mef(A)*. 120 (95.3%) had the *mef(A)* and/or the *erm(B)* gene and 54.8% of strains were both *erm(B)* and *mef(A)* positive. The findings of the current study showed high prevalence of the *mef(A)* and *erm(B)* genes among macrolide-resistant *S. pneumoniae* isolates in children with pneumonia in Nghe An province.

Keywords: antibiotic resistance, *erm(B)*, macrolide, *mef(A)*, *Streptococcus pneumoniae*.

Classification number: 3.1

thời gian từ tháng 11/2019 đến tháng 12/2021. Mẫu dịch tị hầu/đờm được lấy bởi bác sỹ chuyên khoa nhi và chuyển tới labo xét nghiệm vi sinh trong vòng 2 giờ để phân lập vi khuẩn. Tất cả các mẫu bệnh phẩm được ủ trên đĩa thạch máu chứa 5% máu cừu (Himedia, Ấn Độ) ở 37°C trong tủ nuôi cấy chứa 5% CO₂ trong thời gian 18-24 giờ. Những mẫu mọc vi khuẩn sẽ được cấy chuyển sang đĩa thạch máu khác rồi phân tích hình thái bằng nhuộm gram và định danh bằng hệ thống VITEK® 2 Compact (bioMérieux, North Carolina 27712, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Những mẫu chưa mọc vi khuẩn được ủ thêm 24 giờ trước khi kết luận âm tính và loại bỏ. Mẫu dương tính với phẩy cầu khuẩn tiếp tục được khẳng định bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu *cpsA-F* (5'-GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC-3') và *cpsA-R* (5'-GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC-3') thiết kế trên gen *cps(A)* cho phẩy cầu khuẩn được tham khảo trong một nghiên cứu trước [12]. Sau đó, 22 chủng phẩy cầu khuẩn đại diện được chạy PCR và gửi giải trình tự một phần gen 16S tại Hãng Apical Scientific Sdn. Bhd (Selangor, Malaysia) sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') và 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') [13].

2.2. Xác định tình trạng kháng thuốc

Các chủng vi khuẩn được xác định mức độ nhạy cảm với các kháng sinh, trong đó có các kháng sinh azithromycin, clarithromycin, erythromycin thuộc nhóm macrolide bằng hệ thống VITEK® 2 Compact theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thông qua nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), các chủng phẩy cầu khuẩn được phân loại nhạy, trung gian, kháng với các kháng sinh dựa theo tài liệu M100 của Viện Kiểm chuẩn lâm sàng và Xét nghiệm Hoa Kỳ năm 2020 [14]. Chủng *S. pneumoniae* ATCC 49619 được sử dụng làm chủng chuẩn tham chiếu. Các chủng được khẳng định là phẩy cầu khuẩn và kháng với ít nhất một trong 3 kháng sinh azithromycin, clarithromycin, erythromycin sẽ được đưa vào xác định tần suất có mặt của các gen *erm(B)* và *mef(A)*.

2.3. Xác định tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* ở phẩy cầu khuẩn

Các phản ứng PCR được sử dụng để xác định tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* ở các chủng phẩy cầu khuẩn kháng kháng sinh macrolide. Cụ thể, sự có mặt của gen *erm(B)* ở các chủng phẩy cầu khuẩn được xác định bằng cặp mồi *ermB-F* (5'-TGG TAT TCC AAA TGC GTA ATG-3') và *ermB-R* (5'-CTG TGG TAT GGC GGG TAA GT-3') cho sản phẩm có kích thước 745 bp [15]. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: một chu kỳ 95°C trong 5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước 94°C trong 45 giây, 61°C trong 45 giây và 72°C trong 90 giây; cuối cùng là 1 chu kỳ 72°C trong 10 phút. Sự có mặt của gen *mef(A)* được xác định bằng cặp mồi *mef(A)-F* (5'-AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC-3') và *mef(A)-R* (5'-TTC TTC TGG TAC TAA AAG TTG-3') cho sản phẩm kích thước 348 bp [16]. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: một chu kỳ 95°C trong 5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3

bước 94°C trong 30 giây, 50°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây; cuối cùng là 1 chu kỳ 72°C trong 10 phút.

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được nhập liệu và phân tích bằng phần mềm thống kê IBM SPSS phiên bản 20.0 (Armonk, New York, Hoa Kỳ). Trình tự gen 16S của phế cầu khuẩn được chỉnh sửa, ghép cặp và xây dựng cây phả hệ bằng chương trình MEGA6.06, sử dụng phương pháp kết nối liên kết NJ (Neighborjoining) với hệ số tin cậy bootstrap là 1.000 lần lặp lại. Các trình tự thu được được so sánh với trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen (NCBI) sử dụng công cụ BLAST tại trang web <http://ncbi.nlm.nih.gov> của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia Hoa Kỳ.

2.5. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Cha mẹ của trẻ tham gia được thông tin về mục đích của nghiên cứu và ký vào bản chấp thuận tham gia nghiên cứu trước khi việc lấy mẫu bệnh phẩm được tiến hành. Quy trình và các khía cạnh đạo đức trong nghiên cứu được thông qua Hội đồng đạo đức của Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương tại Quyết định số 225/QĐ-VSR vào tháng 3/2018. Thông tin của trẻ tham gia được bảo mật và chỉ sử dụng vào mục đích nghiên cứu.

3. Kết quả

3.1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu (bảng 1)

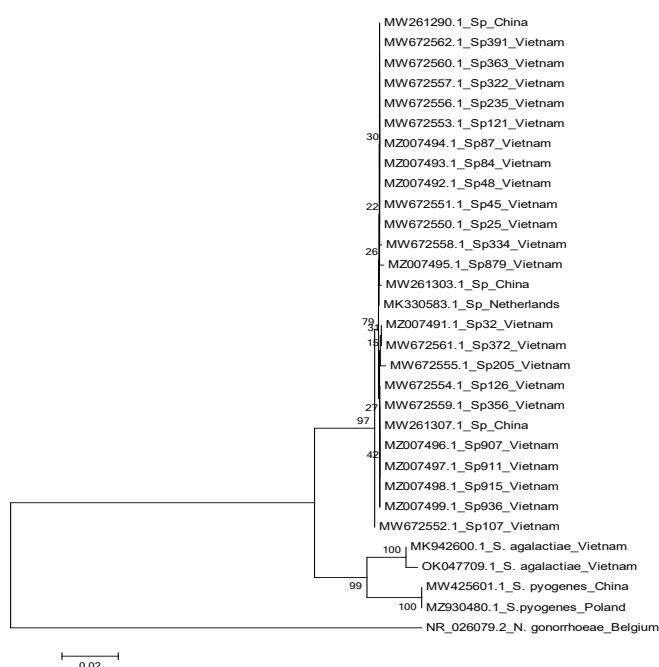
Bảng 1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu (n=126).

Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Giới tính		
Nam	82	65,1
Nữ	44	34,9
Nhóm tuổi		
≤24 tháng	96	76,2
>24 tháng	30	23,8

Trong nghiên cứu này, trẻ em nam chiếm 65,1% cao hơn so với trẻ em nữ 34,9%. Đa số trẻ bị viêm phổi cấp có độ tuổi dưới 24 tháng (76,2%).

3.2. Kết quả định danh các chủng phế cầu khuẩn

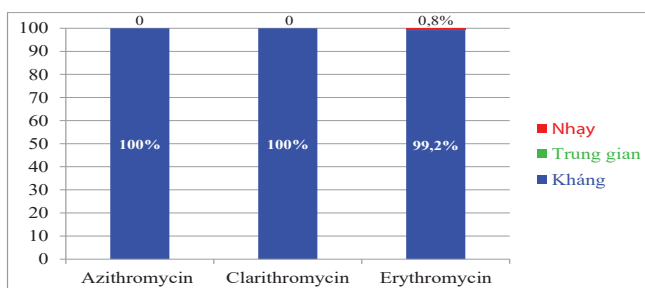
Toàn bộ 126 chủng nuôi cấy dương tính với phế cầu khuẩn đều có kết quả PCR dương tính với gen *cpsA*. Trình tự một phần gen 16S của 22 chủng đại diện được so sánh với ngân hàng gen đều cho kết quả phù hợp với phế cầu khuẩn (tỷ lệ tương đồng >98%). Các trình tự này đã được đăng ký và cấp mã số trên ngân hàng gen với mã số từ MW672550 đến MW672562 và từ MZ007491 đến MZ007499. Phân tích quan hệ phả hệ cho thấy, các chủng phế cầu khuẩn trong nghiên cứu này có quan hệ gần gũi với các chủng phế cầu khuẩn ở Trung Quốc, Hà Lan (hình 1) và quan hệ xa với liên cầu khuẩn nhóm B (*S. agalactiae*), *S. pyogenes* và quan hệ xa hơn nữa cầu khuẩn (*Neisseria gonorrhoeae*).



Hình 1. Cây phát sinh loài xác định mối quan hệ về loài giữa các chủng phế cầu khuẩn tại Nghệ An dựa trên trình tự đoạn gen 16S xây dựng bằng chương trình MEGA6.06, sử dụng phương pháp kết nối liên kết NJ với hệ số tin cậy bootstrap là 1.000 lần lặp lại.

3.3. Kết quả xác định tình trạng kháng thuốc nhóm macrolide

100% các chủng phế cầu khuẩn trong nghiên cứu này kháng đồng thời 2 loại kháng sinh azithromycin và clarithromycin. Đối với kháng sinh erythromycin, 99,2% các chủng (125 chủng) xuất hiện kháng, chỉ 0,8% (1 chủng) nhạy cảm (hình 2).



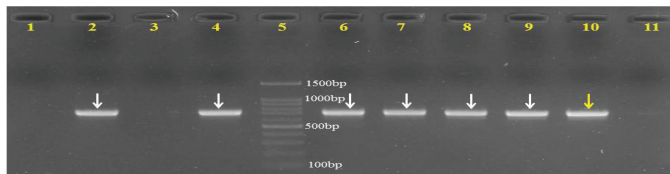
Hình 2. Kết quả xác định tình trạng kháng thuốc nhóm macrolide của 126 chủng phế cầu khuẩn.

3.4. Tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* (bảng 2)

Bảng 2. Tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* của các chủng phế cầu khuẩn kháng kháng sinh nhóm macrolide (n=126).

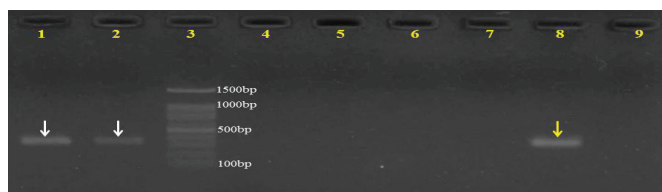
Kiểu mang gen	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Mang <i>erm(B)</i>	116	92,1
Mang <i>mef(A)</i>	73	57,9
Mang đồng thời 2 gen <i>erm(B)</i> và <i>mef(A)</i>	69	54,8
Mang gen <i>erm(B)</i> , không mang gen <i>mef(A)</i>	47	37,3
Mang gen <i>mef(A)</i> , không mang gen <i>erm(B)</i>	4	3,2
Không mang cả 2 gen <i>erm(B)</i> và <i>mef(A)</i>	6	4,8

Tần suất mang gen *erm*(B) và *mef*(A) của các chủng phế cầu khuẩn kháng kháng sinh macrolide lần lượt là 92,1 và 57,9%. Tần suất mang đồng thời 2 gen này là 54,8% và không mang gen nào trong 2 gen này là 4,8%.



Hình 3. Minh họa kết quả chạy PCR phát hiện gen *erm*(B) ở phế cầu khuẩn.

Trong hình 3, giếng 1 và 3: chủng phế cầu khuẩn không mang gen *erm*(B); giếng 2, 4, 6-9: chủng phế cầu khuẩn mang gen *erm*(B); giếng 5: thang ADN chuẩn 100-1500 bp; giếng 10: chứng dương; giếng 11: chứng âm.



Hình 4. Minh họa kết quả chạy PCR phát hiện gen *mef*(A) ở phế cầu khuẩn.

Trong hình 4, giếng 1 và 2: chủng phế cầu khuẩn mang gen *mef*(A); giếng 3: thang ADN chuẩn 100-1500 bp; giếng 4-7: chủng phế cầu khuẩn không mang gen *mef*(A); giếng 8: chứng dương; giếng 9: chứng âm.

4. Bàn luận

Macrolide là nhóm kháng sinh được sử dụng khá phổ biến để điều trị bệnh viêm phổi cộng đồng và các bệnh nhiễm trùng đường hô hấp khác do khả năng dung nạp dễ dàng và phổ tác dụng rộng đối với các vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp [5, 17]. Một số thuốc mới như clarithromycin và azithromycin được khuyến cáo là thuốc đầu tay để điều trị theo kinh nghiệm viêm phổi cộng đồng. Các thuốc này có thể được sử dụng một mình cho bệnh nhân ngoại trú, đặc biệt những người không có bệnh lý kết hợp, hoặc được sử dụng phối hợp cùng với các kháng sinh nhóm β -lactam cho các bệnh nhân điều trị nội trú [17]. Tuy nhiên, tình trạng kháng kháng sinh macrolide ngày càng phổ biến ở phế cầu khuẩn gây ra những lo ngại về việc sử dụng nhóm kháng sinh này trong thực hành điều trị [5]. Do đó, dữ liệu về tình trạng kháng thuốc và cơ chế kháng thuốc có vai trò quan trọng để hướng dẫn sử dụng kháng sinh phù hợp, hiệu quả trong thực hành điều trị các bệnh do phế cầu khuẩn [7].

Trong nghiên cứu này, phế cầu khuẩn được phân lập từ trẻ dưới 5 tuổi bị viêm phổi cấp. Đa phần trẻ bị viêm phổi phế cầu khuẩn có độ tuổi dưới 24 tháng và là nam giới. Đây là nhóm tuổi chưa được tiêm chủng vắc xin phòng chống bệnh do phế cầu khuẩn gây ra. Kết quả kháng sinh đồ đối với 3

kháng sinh nhóm macrolide là azithromycin, clarithromycin và erythromycin cho thấy, 99,2% các chủng (125 chủng) kháng đồng thời cả 3 loại kháng sinh này. Điều đó cho thấy, tỷ lệ kháng cùng lúc nhiều kháng sinh nhóm macrolide của phế cầu khuẩn ở Nghệ An là rất phổ biến. Kết quả này chỉ ra rằng, azithromycin, clarithromycin và erythromycin hầu như không có tác dụng trong điều trị bệnh do phế cầu khuẩn. Tình trạng kháng thuốc nhóm macrolide là vấn đề rất đáng lo ngại như các nghiên cứu trước đã đề cập [5], nhưng đây lại là thông tin chỉ dẫn quan trọng giúp các bác sỹ lâm sàng lựa chọn kháng sinh phù hợp cho những bệnh nhân nghi ngờ nhiễm phế cầu khuẩn ngay cả khi chưa có kết quả kháng sinh đồ.

Các gen *erm*(B) và *mef*(A) tham gia vào 2 cơ chế kháng thuốc macrolide khác nhau của phế cầu khuẩn đã được xác định tần suất có mặt. Kết quả phân tích cho thấy, tần suất mang gen *erm*(B) và *mef*(A) của các chủng phế cầu khuẩn kháng kháng sinh macrolide tương ứng là 92,1 và 57,9%. Tất cả các chủng mang gen *erm*(B) và/hoặc *mef*(A) đều kháng ít nhất một trong số các kháng sinh azithromycin, clarithromycin và erythromycin. Tần suất phế cầu khuẩn kháng kháng sinh macrolide mang gen *erm*(B) ở nghiên cứu này cao hơn hầu hết các nghiên cứu trước đây trên thế giới. Các nghiên cứu khác nhau trên thế giới cho thấy, tần suất mang gen *erm*(B) ở phế cầu khuẩn kháng kháng sinh macrolide dao động từ 5 đến 90,2% [4]. Theo đó, tần suất phế cầu khuẩn mang gen *erm*(B) khá cao ở một số nước như Ma Rốc (90,2%), Bỉ (90,2%), Pháp (90%), Phần Lan (80,8%), Tây Ban Nha (74,3%) và Venezuela (83,3%). Trong khi, tần suất thấp hơn gặp ở Anh (20,8%), các nước Bắc Mỹ (5-27%) và Argentina (19,2%) [4]. Đối với gen *mef*(A), tần suất mang gen này ở các nghiên cứu trên thế giới thường dao động từ 0 đến 57,5%, trung bình khoảng 30%, thấp hơn nhiều so với ở nghiên cứu này [4, 18, 19].

Tần suất mang ít nhất một gen và mang đồng thời 2 gen *erm*(B) và *mef*(A) ở các chủng phế cầu khuẩn kháng kháng sinh macrolide trong nghiên cứu này khá cao (95,2 và 54,8%). So với các nghiên cứu tại Đức và Nhật Bản, tần suất mang ít nhất một trong 2 gen *erm*(B) và *mef*(A) ở nghiên cứu này cao hơn (95,3 so với 88 và 91,9%) [19]. Tuy nhiên, so với một nghiên cứu tại Canada, tần suất mang ít nhất một trong 2 gen *erm*(B) và *mef*(A) ở nghiên cứu này lại thấp hơn (95,3 so với 98,1%) [18]. Chúng tôi cũng nhận thấy rằng, tần suất mang đồng thời 2 gen *erm*(B) và *mef*(A) trong nghiên cứu này cao hơn nhiều so với các nghiên cứu khác trên thế giới. Ví dụ, ở Li Băng và Canada, tần suất mang đồng thời 2 gen *erm*(B) và *mef*(A) của phế cầu khuẩn kháng erythromycin lần lượt là 32 và 2,8% [18]. Còn ở một nghiên cứu tại Đức cho thấy, không thấy chủng phế cầu khuẩn kháng erythromycin nào mang đồng thời 2 gen này [20].

Có 6 chủng kháng kháng sinh macrolide ở nghiên cứu này không mang gen nào trong số 2 gen *erm*(B) và *mef*(A), chiếm 4,8%. Như đã đề cập ở trên, có nhiều gen khác nhau tham gia vào cơ chế kháng kháng sinh nhóm macrolide của phế cầu khuẩn như các gen thuộc họ *erm* là *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C),

erm(E) nằm trên plasmid của vi khuẩn và các gen thuộc họ *mef* và *msr* tạo ra các kênh bơm thuốc ra khỏi vi khuẩn [4, 5]. Do vậy, 6 chủng không mang cả 2 gen *erm(B)* và *mef(A)* rất có thể sẽ mang một hoặc nhiều gen khác trong số các gen *erm(A)*, *erm(C)*, *erm(E)* hoặc *mef* và *msr*. Theo các nghiên cứu trước, tại nhiều nơi, tỷ lệ mang gen *mef(E)* có thể cao hơn nhiều so với gen *mef(A)*. Ví dụ: ở Canada, tỷ lệ mang *mef(E)* là 95%, trong khi tỷ lệ mang *mef(A)* chỉ 5%, hay ở Colombia tỷ lệ mang các gen *mef(E)* và *mef(A)* lần lượt là 30,7 và 0,9% [4]. Do đó, mở rộng nghiên cứu xác định sự có mặt của các gen khác là rất cần thiết để làm sáng tỏ cơ chế kháng kháng sinh macrolide ở phế cầu khuẩn.

Ở Việt Nam, theo nghiên cứu của T.T. Ha (2017) [10] thực hiện tại 3 tỉnh/thành gồm Hà Nội, Hải Dương và Khánh Hòa, tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* tương ứng là 86,4 và 39,3%. Trong khi đó, nghiên cứu của Lê Văn Duyệt và cs (2017) [11] trên 26 chủng phế cầu khuẩn không ghi nhận chủng nào mang gen *erm(B)* và chỉ 1 chủng mang gen *mef(A)*. So với nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ mang gen *erm(B)* và *mef(A)* ở 2 nghiên cứu này thấp hơn. Theo D.J. Hoban và cs (2001) [18], dữ liệu về các gen liên quan đến kháng thuốc macrolide cùng với dữ liệu kháng thuốc là căn cứ quan trọng để lựa chọn kháng sinh phù hợp sử dụng trong thực hành lâm sàng điều trị bệnh do phế cầu khuẩn. Tuy nhiên tại Việt Nam, vấn đề này chưa thực sự được quan tâm nên dữ liệu còn rất khiêm tốn. Vì vậy, cần có thêm những nghiên cứu khác trên quy mô rộng hơn về tình trạng kháng thuốc, tần suất mang các gen liên quan đến kháng thuốc của phế cầu khuẩn để có thêm cơ sở đưa ra các khuyến cáo sử dụng kháng sinh macrolide trên lâm sàng một cách phù hợp, hiệu quả.

5. Kết luận

Nghiên cứu trên 126 chủng phế cầu khuẩn kháng kháng sinh macrolide cho thấy, tần suất mang các gen *erm(B)* và *mef(A)* lần lượt là 92,1 và 57,9%, tần suất mang ít nhất 1 trong 2 gen là 95,3% và mang đồng thời 2 gen là 54,8%.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Nghệ An đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này; Bệnh viện Sản Nhi Nghệ An, Học viện Quân y đã hỗ trợ thu thập bệnh phẩm, phân lập vi khuẩn, làm kháng sinh đồ và xác định gen liên quan đến kháng thuốc của phế cầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] https://www.jhsph.edu/ivac/wp-content/uploads/2019/05/VIEW-hub_Report_Mar2019.pdf, accessed 2 February 2022.

[2] W. Shi, K. Zhou, L. Yuan, et al. (2018), "Serotype distribution, antibiotic resistance patterns and molecular characteristics of serogroup 6 *Streptococcus pneumoniae* isolates collected from Chinese children before the introduction of PCV13", *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **14**, pp.23-28, DOI: 10.1016/j.jgar.2017.12.007.

[3] B. Wahl, K.L. O'Brien, A. Greenbaum, et al. (2018), "Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: Global, regional, and national estimates for 2000-15", *The Lancet Global Health*, **6(7)**, pp.e744-e757, DOI: 10.1016/S2214-109X(18)30247-X.

[4] M.R. Schroeder, D.S. Stephens (2016), "Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **6**, DOI: 10.3389/fcimb.2016.00098.

[5] A.C. Cheng, A.W.J. Jenney (2016), "Macrolide resistance in pneumococci - is it relevant?", *Pneumonia*, **8(1)**, pp.1-3, DOI: 10.1186/s41479-016-0010-1.

[6] C. Zhao, Z. Li, F. Zhang, et al. (2017), "Serotype distribution and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from 17 Chinese cities from 2011 to 2016", *BMC Infectious Diseases*, **17(1)**, DOI: 10.1186/s12879-017-2880-0.

[7] C. Liu, X. Xiong, W. Xu, et al. (2013), "Serotypes and patterns of antibiotic resistance in strains causing invasive pneumococcal disease in children less than 5 years of age", *PLOS ONE*, **8(1)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0054254.

[8] N.D. Quyet, D.M. Tuan, B.Q. Phuc, et al. (2021), "The situation of antibiotic resistance of pneumococci and results of treatment of pneumococcal pneumonia in children at the National Children's Hospital", *Journal of Pediatric Research and Practice*, **5(4)**, pp.27-34 (in Vietnamese).

[9] T.T. Ha, N.T.H. Anh, V.T.T. Huong, et al. (2017), "Determining antibiotic resistance status of *S. pneumoniae* bacteria isolated on clinical specimens at Khanh Hoa General Hospital in 2008-2013", *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, **27(8)**, pp.514-525 (in Vietnamese).

[10] T.T. Ha (2017), *Research on The Circulation of Serotypes and Antibiotic Resistance Genotypes of Pathogenic Streptococcus Pneumoniae Using Multiplex PCR Technique in Some Localities in Vietnam*, Doctoral thesis, VNU University of Sciences, Vietnam National University, Hanoi (in Vietnamese).

[11] L.V. Duyệt, T.T.G. Huong, N.V. Trung (2017), "Detecting erythromycin resistance genes and mutations in *Streptococcus pneumoniae* strains", *Vietnam Journal of Science and Technology*, **19(8)**, p.11-18 (in Vietnamese).

[12] J.G. Ahn, S.Y. Choi, D.S. Kim, et al. (2012), "Enhanced detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* using multiplex polymerase chain reaction", *Korean J. Pediatr.*, **55(11)**, pp.424-429, DOI: 10.3345/kjp.2012.55.11.424.

[13] C.S. Miller, K.M. Handley, K.C. Wrighton, et al. (2013), "Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments", *PLOS ONE*, **8(2)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0056018.

[14] Clinical and Laboratory Standards Institute (2020), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI Supplement M100*, <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100>, accessed 2 February 2022.

[15] S.M. Kumar, C. Lammens, J. Piessens, et al. (2005), "Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49(11)**, pp.4798-4800, DOI: 10.1128/aac.49.11.4798-4800.2005.

[16] S.E. Ashkar, M. Osman, R. Rafei, et al. (2017), "Molecular detection of genes responsible for macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in North Lebanon", *Journal of Infection and Public Health*, **10(6)**, pp.745-748, DOI: 10.1016/j.jiph.2016.11.014.

[17] E. Nuermberger, W.R. Bishai (2004), "The clinical significance of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*: It's all relative", *Clinical Infectious Diseases*, **38(1)**, pp.99-103, DOI: 10.1086/380126.

[18] D.J. Hoban, A.K. Wierzbowski, K. Nichol, et al. (2001), "Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 1998-1999: Prevalence of *mef(A)* and *erm(B)* and susceptibilities to ketolides", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45(7)**, pp.2147-2150, DOI: 10.1128/aac.45.7.2147-2150.2001.

[19] A. Harimaya, N. Yamazaki, T. Himi, et al. (2007), "High prevalence of erythromycin resistance and macrolide-resistance genes, *mef(A)* and *erm(B)*, in *Streptococcus pneumoniae* isolates from the upper respiratory tracts of children in the Sapporo district, Japan", *Journal of Infection and Chemotherapy*, **13(4)**, pp.219-223, DOI: 10.1007/s10156-007-0528-5.

[20] M. Kresken, B. Henrichfreise, S. Bagel, et al. (2004), "High prevalence of the *ermB* gene among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Germany during the winter of 2000-2001 and in vitro activity of telithromycin", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48(8)**, pp.3193-3195, DOI: 10.1128/aac.48.8.3193-3195.2004.

Hội chứng bong vảy da do tụ cầu: Báo cáo chùm ca lâm sàng tại Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng

Nguyễn Thị Phương Anh*

Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng, đường Việt Đức, phường Lâm Hà, quận Kiến An, TP Hải Phòng, Việt Nam

Ngày nhận bài 9/9/2022; ngày chuyển phản biện 13/9/2022; ngày nhận phản biện 3/10/2022; ngày chấp nhận đăng 7/10/2022

Tóm tắt:

Hội chứng bong vảy da do tụ cầu (Staphylococcal-scalded skin syndrome - SSSS) là một tình trạng ban đỏ bong vảy trên diện rộng do độc tố tróc vảy của *Staphylococcus aureus* gây ra. Bệnh này thường ảnh hưởng đến trẻ dưới 5 tuổi với triệu chứng thường gặp là bong vảy và phỏng rộp, bệnh thường đáp ứng nhanh với liệu pháp kháng sinh. Nghiên cứu báo cáo 4 trường hợp trẻ mắc SSSS, tất cả được xác định dưới 2 tuổi, nhập viện tại Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng. Bệnh xuất hiện với các triệu chứng ban đầu kèm theo sốt, cả 4 trẻ đều phát hiện sớm, điều trị kháng sinh và truyền dịch nên có dấu hiệu hồi phục tốt.

Từ khóa: hội chứng bong vảy da do tụ cầu, kháng sinh, *Staphylococcus aureus*.

Chỉ số phân loại: 3.2

Staphylococcal-scalded skin syndrome: A case series at Hai Phong Children Hospital

Thi Phuong Anh Nguyen*

Hai Phong Children Hospital, Viet Duc Street, Lam Ha Ward, Kien An District,
Hai Phong City, Hai Phong Province, Vietnam

Received 9 September 2022; revised 3 October 2022; accepted 7 October 2022

Abstract:

Staphylococcal-scalded skin syndrome (SSSS) is a widespread, scaly erythematous condition caused by the exfoliative toxin of *Staphylococcus aureus*. This disease usually affects children under 5 years of age with common symptoms of scabbing and blistering, which often responds quickly to antibiotic therapy. The authors reported 4 cases of children with SSSS, all identified as under 2 years of age and admitted at Hai Phong Children Hospital. The disease appeared with initial symptoms accompanied by fever, all 4 children were early detected and treated with antibiotics, so they showed good signs of recovery.

Keywords: antibiotic, staphylococcal-scalded skin syndrome, *Staphylococcus aureus*.

Classification number: 3.2

1. Đặt vấn đề

SSSS hay hội chứng da dạng bông do tụ cầu là nhiễm trùng da cấp tính gây ra do các chủng tụ cầu vàng thuộc nhóm cấp tính II típ 3A, 3B, 3C, 55 và 71. SSSS thường gặp ở trẻ em dưới 5 tuổi, nhưng nhiều hơn ở trẻ dưới 3 tháng tuổi, đặc biệt hay gặp ở lứa tuổi sơ sinh và có xu hướng bùng phát thành dịch do sự lây nhiễm và có nguy cơ đe dọa đến tính mạng. Trong trường hợp nhiễm trùng, bề mặt da bị bong ra, da như bị bỏng bởi chất lỏng nóng [1]. Tỷ lệ mắc SSSS thấp và được xếp vào danh sách một trong những bệnh hiếm gặp. Tuy hội chứng thường gặp ở những trẻ nhỏ dưới 2 tuổi nhưng người lớn có tình trạng suy giảm miễn dịch và bệnh thận cũng có nguy cơ cao mắc phải. Trong bài báo này, nhóm nghiên cứu trình bày 4 trường hợp dưới 2 tuổi bị SSSS, nhấn mạnh vai trò chẩn đoán, phát hiện và điều trị sớm hội chứng này.

2. Báo cáo các ca lâm sàng

2.1. Ca lâm sàng 1

Bệnh nhi nam, 6 tháng tuổi, đẻ thường, nhập viện với lý do sốt cao, ho kèm có tổn thương bề mặt da. Bệnh diễn biến 3 ngày với triệu chứng khởi phát là sốt cao và ho đờm, sốt theo cơn, nhiệt độ dao động 38-39,5°C, trẻ có quấy khóc và bỏ bú trong cơn sốt. Đến ngày thứ 2 sau khi sốt, bề mặt da vùng mặt, cổ bắt đầu hình thành những tổn thương bị bào mòn khô, vùng tổn thương nhanh chóng lan ra vùng lân cận. Tiền sử bệnh của trẻ và gia đình đều chưa phát hiện bất thường. Khám thấy bệnh nhi sốt cao 39°C, phát hiện tổn thương da ở vùng mắt, mũi, miệng, cổ và lan xuống một

*Email: pa376550@gmail.com

ít ở ngực, dấu hiệu của Nikolsky dương tính (hình 1). Các xét nghiệm cận lâm sàng cho thấy: Ca^{2+} 1,09 mmol/l, định lượng sắt huyết thanh 18,38 $\mu\text{mol/l}$, định lượng CRP 80,06 mg/l, IgA 13 mg%, bạch cầu đa nhân trung tính 8,44 g/l, hồng cầu 3,08 T/l, huyết sắc tố 99,2 g/l, hematocrit 28%. Hình ảnh Xquang ngực thẳng cho hình ảnh viêm phế quản. Nuôi cấy vi khuẩn tìm thấy khuẩn *Staphylococcus aureus*. Sau khi được thăm khám và chẩn đoán bệnh, trẻ được yêu cầu điều trị và theo dõi tại Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng.



Hình 1. Hình ảnh tổn thương da ở vùng mặt và cổ của trẻ.

Phác đồ điều trị của trẻ bao gồm: kháng sinh Ceftriaxone liều 100 mg/kg/ngày + Selemycin liều 15 mg/kg/ngày, truyền NaCl 0,9% kèm thuốc kháng Histamin. Chăm sóc tại chỗ bằng các dung dịch Jarish, Vaseline, Amthimucin. Sau 3 ngày điều trị, tình trạng trẻ có dấu hiệu chuyển biến tích cực: da khô, đã bong vảy, hết sốt, ăn uống được, vẫn còn ho. Xét thấy tình hình của trẻ, gia đình xin phép cho trẻ xuất viện, chăm sóc và theo dõi ở nhà.

2.2. Ca lâm sàng 2

Bệnh nhi nam, 24 tháng, đẻ thường, vào viện với lý do sốt cao kèm theo tổn thương da ở vùng mặt và lưng. Bệnh khởi phát 2 ngày trước khi vào viện với triệu chứng sốt cao, liên tục với nhiệt độ dao động 38,5-40°C. Đồng thời, những vết mụn nước li ti bắt đầu xuất hiện ở vùng mặt và lưng dẫn đến các khu vực tổn thương bị bong tróc da. Ngoài ra, trẻ còn bỏ ăn, thường xuyên quấy khóc. Tiền sử của bệnh nhi và gia đình không phát hiện các dấu hiệu tương tự. Bệnh nhi cũng chưa sử dụng phương pháp điều trị nào trước khi vào viện. Lúc thăm khám lâm sàng thấy: trẻ sốt, nhiệt độ 38,5°C, quấy khóc nhiều. Tại vùng mặt có tổn thương bong tróc, sần đỏ vùng xung quanh mắt và miệng, dấu hiệu của Nikolsky dương tính. Vùng da ở sau lưng trẻ có nổi ban, bắt đầu hình thành các vết bong do khô (hình 2). Các xét nghiệm cận lâm sàng của bệnh nhi bao gồm: hồng cầu 5,08 T/l, MCV (thể tích trung bình hồng cầu) 69,2 fL, MCH (lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu) 23,7 pg, bạch cầu 11,3 g/l, bạch cầu lympho 5,72 g/l. Nuôi cấy vi khuẩn âm tính. Các hình

ảnh siêu âm ổ bụng, Xquang ngực thẳng chưa phát hiện bất thường. Sau thăm khám, trẻ được chẩn đoán mắc SSSS, được chỉ định nhập viện điều trị và theo dõi tại Khoa Nội tổng hợp, Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng.



Hình 2. Tổn thương da vùng mặt và lưng của trẻ.

Sau nhập viện, nhóm nghiên cứu điều trị cho bệnh nhi bằng phác đồ: kháng sinh Cefoperazone 100 mg/kg/ngày + Gentamycin 8 mg/kg/ngày kèm truyền dịch NaCl 0,9% và kháng Histamin Dimedrol. Chăm sóc tại chỗ bằng các dung dịch Jarish, Vaseline, Amthimucin. Sau 5 ngày điều trị nội trú, trẻ đã hết sốt, tự ăn uống được, tổn thương vùng da ở lưng đã khỏi hẳn, còn tổn thương ở vùng mặt đã hết sần đỏ, da bắt đầu kết vảy và bong ra. Sau ngày điều trị thứ 5, gia đình bé đã xin về chăm sóc, theo dõi trẻ tại nhà và tái khám theo định kỳ.

2.3. Ca lâm sàng 3

Bệnh nhi nữ, 2 tháng tuổi, đẻ thường, vào viện với lý do sốt cao kèm theo dấu hiệu bong tróc da vùng mặt nặng. Bệnh diễn biến được 3 ngày trước khi vào viện và khởi phát bằng những cơn sốt cao (38-40°C). Đến ngày thứ 2 sau khi sốt, da vùng mặt của bé bắt đầu nổi những bọng nước rồi nhanh chóng hình thành các vùng bị bào mòn, bong tróc cùng một vài tổn thương trợt tại vùng bị bong tróc kèm theo quấy khóc nhiều và bỏ bú. Trước khi vào viện, gia đình chưa dùng phương pháp/thuốc nào điều trị cho bé. Tiền sử của bé và gia đình chưa có dấu hiệu bất thường. Khám lâm sàng thấy: trẻ sốt cao 39,5°C, quấy khóc nhiều, tình trạng tổn thương da khá nghiêm trọng. Trên các vùng tổn thương, đặc biệt là xung quanh miệng và mắt, da mềm đã tụ lại thành các nếp gấp và sự co rút của nó đã để lại những vùng da sần sùi khiến người bệnh vô cùng đau đớn. Dấu hiệu của Nikolsky là dương tính (hình 3). Sau thăm khám lâm sàng, nhóm nghiên cứu quyết định cho bệnh nhi nhập viện điều trị và theo dõi tại Khoa Nội tổng hợp - Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng.



Hình 3. Tồn thương xói mòn kèm đóng vảy xung quanh miệng của trẻ.

Sau nhập viện, nhóm nghiên cứu tiến hành điều trị cho bệnh nhi theo phác đồ: kháng sinh Vancomycin 40 mg/kg/ngày kết hợp với truyền dịch NaCl 0,9% và kháng Histamin Dimedrol. Trong điều trị tại chỗ, nhóm nghiên cứu cũng sử dụng phác đồ tương tự 2 ca lâm sàng trên (Jarish, Vaseline, Amthimucin). Trong quá trình điều trị, trẻ có dấu hiệu tiến triển tích cực. Sau 7 ngày điều trị và theo dõi tại viện, tình trạng của trẻ đã ổn định: trẻ hết sốt, ăn được, ít quấy khóc, các vùng da bị tổn thương đã bong ra gần hết và bắt đầu lên da non. Qua xem xét và thăm khám, nhóm nghiên cứu quyết định cho gia đình đưa bé về chăm sóc, theo dõi bé tại nhà và hẹn tái khám sau 1 tháng.

2.4. Ca lâm sàng 4

Bệnh nhi nam, 6 tháng tuổi, đẻ thường. Bệnh nhi vào viện với lý do sốt và nổi ban đỏ kèm bong tróc da ở vùng mặt, cổ và lưng. Vào 3 ngày trước khi vào viện, bệnh nhi bắt đầu sốt cao, sốt theo cơn, trong cơn sốt nhiệt độ dao động 38-39°C, trẻ quấy khóc nhiều, ăn uống ít. Vào 2 ngày sau khi sốt, trên mặt của trẻ bắt đầu xuất hiện các vết dát da, sau đó chúng nhanh chóng xói mòn gây bong tróc da, đặc biệt là vùng mắt và miệng, khiến trẻ đau đớn khi cử động miệng. Trước đó, gia đình chưa dùng thuốc gì điều trị cho trẻ. Qua thăm khám lâm sàng thấy: trẻ tỉnh, quấy khóc nhiều, sốt cao (38,5°C). Khám thấy có tổn thương da ở vùng mặt, cổ và lưng. Tại tổn thương vùng mặt, xung quanh mắt và miệng có nhiều vết dát kèm theo bong tróc da. Còn ở lưng và cổ, da trẻ nổi ban đỏ thành đám lớn, chưa có dấu hiệu bong da. Dấu hiệu của Nikolsky âm tính ở cả mặt, cổ và lưng (hình 4). Sau thăm khám và hỏi bệnh, trẻ được gia đình làm thủ tục nhập viện để điều trị và theo dõi thêm tại Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng.



Hình 4. Các vết dát, bong tróc da ở vùng mặt và ban đỏ vùng lưng.

Qua thăm khám tình trạng của bệnh nhi, nhóm nghiên cứu tiến hành điều trị theo phác đồ: Vigentin dạng gói 30 mg/kg/ngày kết hợp với truyền dịch kháng Histamin Clopheniramin. Ngoài ra, trong điều trị tại chỗ, nhóm nghiên cứu cũng sử dụng giống như các bệnh nhi trên (Jarish, Vaseline, Amthimucin). Sau 3 ngày điều trị và chăm sóc, tình trạng của trẻ chuyển biến rất tích cực: trẻ hết sốt, không quấy khóc, ăn được nhiều và các vùng tổn thương da đang dần thu hẹp, một số chỗ đã khỏi hẳn như cổ và lưng. Theo tình trạng này, nhóm nghiên cứu chấp nhận yêu cầu xin về chăm sóc và theo dõi trẻ tại nhà của gia đình và hẹn tái khám định kỳ.

Sau khi tái khám theo định kỳ, tất cả bệnh nhi kể trên đều đã khỏi hẳn và không có biến chứng nào được ghi nhận.

3. Bàn luận

SSSS là một tình trạng da hiếm gặp, chủ yếu ảnh hưởng đến trẻ em. Lần đầu tiên được mô tả bởi nghiên cứu của P.J. Haasnoot và cs (2018) [2], nhiễm trùng do tụ cầu gây ra các vết phỏng rộp trên da. Da bị bong tróc là do chất độc tẩy da chết, loại A và B (ETA và ETB). Trẻ sơ sinh và trẻ em có nguy cơ mắc SSSS cao hơn do hệ miễn dịch chưa phát triển để sản xuất kháng thể chống lại ETs và khả năng bài tiết độc tố gây bệnh của thận không đủ. Tương tự như trẻ nhỏ, người lớn bị suy giảm miễn dịch hoặc người lớn mắc bệnh thận có tỷ lệ mắc SSSS cao hơn. Mặc dù hiếm gặp, nhưng hội chứng này có khả năng gây tử vong cao. Do đó, nếu có biểu hiện sốt kèm theo ban đỏ, đặc biệt là ở trẻ em, các bác sĩ da liễu nên đặc biệt coi SSSS TEN và phản ứng thuốc là chẩn đoán phân biệt. Điều trị kịp thời sớm cho tiên lượng tốt, nhưng điều trị chậm trễ, chẩn đoán không đúng và suy giảm miễn dịch, bệnh có thể tiến triển và dẫn đến viêm mô tế bào, viêm cầu thận nhiễm trùng huyết cũng như biến chứng khác dẫn đến tử vong [3].

Các đặc điểm lâm sàng của SSSS bao gồm một giai đoạn tiền căn, trong đó có thể sốt và trẻ có thể trở nên cáu kỉnh. Tiếp theo là sự xuất hiện của các mảng ban đỏ trên cơ thể, trên đó phát triển các mụn nước lớn dễ vỡ. Khi các mụn nước này vỡ ra, da có màu đỏ và đóng vảy [4]. Tất cả các đặc điểm lâm sàng này đã được quan sát thấy ở bệnh nhi của nhóm nghiên cứu. Thông thường, chẩn đoán SSSS được thực hiện trên lâm sàng với sự trợ giúp của các báo cáo nuôi cấy, như nhóm nghiên cứu đã làm trong trường hợp của mình. Tuy nhiên, nếu nghi ngờ, chẩn đoán có thể được xác nhận thông qua sinh thiết da cho thấy sự phân cắt nội bì mà không có hoại tử [5].

Các biến thể lâm sàng có 2 loại SSSS tổng quát và cục bộ. SSSS khu trú đường như ưu tiên tất cả các vùng cong và nếp gấp, đặc biệt là các cơ gấp ở nách, háng và chi. Việc xác nhận được thực hiện bằng tăm bông từ các tổn thương da và các khu vực ban đầu. Cấy máu là để chẩn đoán xác định, được thực hiện như trong trường hợp của nhóm nghiên cứu. Sinh thiết da cho thấy sự phân chia thành lớp hạt với thâm nhiễm tế bào viêm. Chẩn đoán được thực hiện trong trường hợp của nhóm nghiên cứu dựa trên phát hiện lâm sàng và có thể là cấy máu cùng một số xét nghiệm. Tuy nhiên, trong 4 trường hợp của nhóm nghiên cứu, chỉ 1 trường hợp nuôi cấy gặp *S. aureus* kháng Methicillin (Methicillin-resistant *S. aureus* - MRSA). Tuy nhiên, nếu nghi ngờ MRSA, Vancomycin hoặc Linezolid được chỉ định. Clindamycin được công nhận là hữu ích trong các bệnh nhiễm trùng do tụ cầu [1].

Trong những ca lâm sàng được báo cáo ở trên, các bệnh nhi đang phát triển SSSS được nhóm nghiên cứu đưa ra phác đồ điều trị theo cách tương tự như bệnh nhi bỏng, tức là duy trì hydrat hóa, chăm sóc vết thương tại chỗ và thêm điều trị bằng kháng sinh cùng với đội ngũ bác sỹ nhi khoa và bác sỹ da liễu liên ngành. Đặc biệt, một điều may mắn ở các ca bệnh trên là người nhà bệnh nhi phát hiện nhanh

chóng, đưa trẻ đi khám và điều trị sớm. Vì vậy, việc điều trị cũng trở nên thuận lợi, nhanh chóng và không để lại biến chứng cho trẻ.

4. Tuyên bố và sự đồng ý của bệnh nhân

Nhóm nghiên cứu xác nhận rằng đã được nhận các mẫu đơn đồng ý thích hợp từ cha mẹ của bệnh nhi để hoàn thành báo cáo chùm ca bệnh này. Họ được đảm bảo rằng tên và tên viết tắt của bệnh nhi sẽ không được công bố và mặc dù, nhóm nghiên cứu đảm bảo sẽ nỗ lực thực hiện che giấu danh tính của bệnh nhi, nhưng không thể đảm bảo tính ẩn danh.

5. Kết luận

Theo kết quả điều trị, tất cả bệnh nhi trong báo cáo này đều được điều trị khỏi hoàn toàn, tuy nhiên SSSS vẫn có khả năng gây tử vong cho bệnh nhi. Do đó, chẩn đoán sớm, điều trị kịp thời và tuân theo các biện pháp vệ sinh tích cực là điều cần thiết để quản lý thành công bệnh này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] I. Braunstein, K.A. Wanat, K. Abuabara, et al. (2013), "Antibiotic sensitivity and resistance patterns in pediatric staphylococcal scalded skin syndrome", *Pediatric Dermatology*, **31**(3), DOI: 10.1111/pde.12195.
- [2] P.J. Haasnoot, A.D. Vries (2018), "Staphylococcal scalded skin syndrome in a 4-year-old child: A case report", *J. Med. Case. Rep.*, **12**(1), DOI: 10.1186/s13256-017-1533-7.
- [3] A.K. Mishra, P. Yadav, A. Mishra (2016), "A systemic review on staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS): A rare and critical disease of neonates", *The Open Microbiol. J.*, **10**, pp.150-159, DOI: 10.2174/1874285801610010150.
- [4] O. Lamanna, D. Bongiorno, L. Bertoncello (2017), "Rapid containment of nosocomial transmission of a rare community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) clone, responsible for the staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS)", *Ital. J. Pediatr.*, **43**(1), DOI: 10.1186/s13052-016-0323-y.
- [5] M.Z. Handler, R.A. Schwartz (2014), "Staphylococcal scalded skin syndrome: Diagnosis and management in children and adults", *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **28**(11), DOI: 10.1111/jdv.12541.

Tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron bằng phương pháp vi sóng

Võ Thị Cẩm Vân*, Đào Quốc Mạnh, Võ Hoàng Minh, Trần Hoàng Phúc, Huỳnh Nguyễn Hoài Phương

Bộ môn Hoá dược, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 18/7/2022; ngày chuyển phản biện 20/7/2022; ngày nhận phản biện 8/8/2022; ngày chấp nhận đăng 12/8/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu trình bày kết quả khảo sát điều kiện phản ứng tổng hợp 4,6-dihydroxyauron và các dẫn chất bằng phương pháp vi sóng, gồm các giai đoạn: tổng hợp 2',4',6'-trihydroxycloacetophenon (50 W, 65°C và 30 phút), 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (50 W, 60°C và 5 phút) và 4,6-dihydroxyauron (50 W, 80°C và 20-40 phút). Quy trình sau khảo sát được áp dụng để tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron với nhóm thế khác nhau trên vòng benzylic.

Từ khoá: auron, benzaldehyd, phloroglucinol, tổng hợp hỗ trợ vi sóng, 4,6-dihydroxyauron.

Chỉ số phân loại: 3.4

Microwave-assisted synthesis of 4,6-dihydroxyaurone derivatives

Thi Cam Van Vo*, Quoc Manh Dao, Hoang Minh Vo, Hoang Phuc Tran, Nguyen Hoai Phuong Huynh

Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy,
University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City,

41 Dinh Tien Hoang Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 18 July 2022; revised 8 August 2022; accepted 12 August 2022

Abstract:

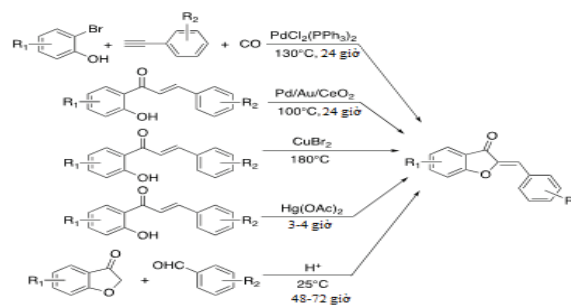
In this study, the authors described the evaluation of microwave-assisted reaction conditions for the synthesis of 4,6-dihydroxyaurone derivatives, including synthesis of 2',4',6'-trihydroxycloacetophenone (50 W, 65°C and 30 min); synthesis of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (50 W, 60°C and 5 min), and synthesis of 4,6-dihydroxyaurone (50 W, 80°C and 20-40 min). The optimum procedure was applied to prepare 4,6-dihydroxyaurone derivatives with different substituents on the benzylic ring.

Keywords: aurone, benzaldehyde, microwave-assisted synthesis, phloroglucinol, 4,6-dihydroxyaurone.

Classification number: 3.4

1. Đặt vấn đề

Auron là nhóm dẫn chất thuộc họ flavonoid, đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành sắc tố của hoa, quả [1]. Trong những năm gần đây, auron thu hút sự chú ý của y học khi một số dẫn chất được báo cáo với nhiều hoạt tính sinh học triển vọng như kháng virus, kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hoá, ức chế một số enzym quan trọng trong chuyển hoá... [2]. Trong tự nhiên, vị trí 4, 6, 4' trong cấu trúc auron thường được gắn các nhóm thế, chủ yếu dưới dạng hydroxy hóa, methoxy hóa, glycosid hóa [3]. Dẫn chất 4,6-dihydroxyauron tự nhiên như aureusidin và bracteatin có tác dụng chống oxy hoá [4]; 4,4',6-trihydroxyauron và hispidol ức chế tyrosinase [5]. Auron nói chung và 4,6-dihydroxyauron tồn tại với hàm lượng thấp trong tự nhiên và cấu trúc kém đa dạng [4]. Để tăng tính đa dạng cấu trúc và tạo điều kiện cho nghiên cứu phát triển thuốc, các phương pháp tổng hợp dẫn chất auron được phát triển và ứng dụng. Các con đường tổng hợp auron có thể chia thành 2 nhóm: (1) Tổng hợp auron thông qua phản ứng đóng vòng nội phân tử hay liên phân tử; (2) Tổng hợp auron thông qua phản ứng ngưng tụ giữa benzofuran-3(3H)-on và aldehyd thơm (hình 1) [6-10]. Đa số quy trình tổng hợp được thực hiện với phương pháp gia nhiệt truyền thống ở nhiệt độ cao và trong thời gian dài. Điều này bất lợi với dẫn chất 4,6-hydroxyauron với 2 nhóm hydroxy tự do [11].



Hình 1. Một số phương pháp tổng hợp dẫn chất auron.

*Tác giả liên hệ: Email: vocamvan@ump.edu.vn

Vi sóng được áp dụng trong tổng hợp hữu cơ với nhiều ưu điểm như rút ngắn thời gian phản ứng, tiết kiệm năng lượng và sử dụng ít dung môi [12-14]. Phản ứng trong điều kiện vi sóng hạn chế sự tiếp xúc của nguyên liệu và sản phẩm với nhiệt độ cao trong thời gian dài; từ đó giảm thiểu tạo thành sản phẩm phụ, sản phẩm phân hủy và nâng cao hiệu suất. Nghiên cứu này trình bày kết quả khảo sát điều kiện quy trình tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron từ nguyên liệu phloroglucinol và benzaldehyd hỗ trợ vi sóng với mục tiêu cải thiện hiệu suất, giảm sản phẩm phụ và rút ngắn thời gian phản ứng.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

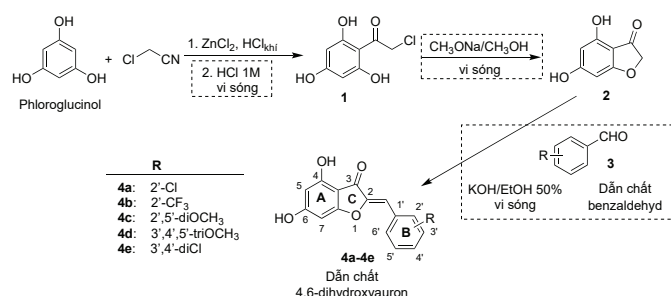
Quy trình tổng hợp dẫn chất 4,6-dihydroxyauron từ nguyên liệu phloroglucinol và benzaldehyd dưới hỗ trợ vi sóng.

2.2. Nguyên liệu và trang thiết bị

Hoà chất, dung môi hữu cơ từ các nước Trung Quốc và Đức theo tiêu chuẩn tổng hợp. Phản ứng được tiến hành dưới sự hỗ trợ vi sóng từ máy tổng hợp hoá học Discover SP-CEM. Phản ứng được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng silica gel GF₂₅₄; phát hiện vết dưới đèn UV 254 nm, 365 nm và dung dịch FeCl₃ 0,5%. Điểm chảy đo trên máy Stuart SMP10. Phổ IR đo trên máy Tensor 27 Bruker (Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh). Phổ khối MS được đo trên máy Shimadzu LCMS (Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP Hồ Chí Minh). Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR được đo trên máy Bruker BioSpin GmbH (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Tối ưu quy trình tổng hợp 4,6-dihydroxyauron từ nguyên liệu phloroglucinol và dẫn chất benzaldehyd: Dẫn chất 4,6-dihydroxyauron được tổng hợp từ nguyên liệu đầu phloroglucinol và dẫn chất benzaldehyd thông qua 3 bước (hình 2) [15].



Hình 2. Quy trình tổng hợp dẫn chất 4,6-dihydroxyauron. Ghi chú: phản ứng đóng khung là phản ứng khảo sát.

Yếu tố khảo sát cho từng phản ứng theo thứ tự bao gồm nhiệt độ, công suất máy và thời gian. Khi khảo sát, giá trị của yếu tố khảo sát được thay đổi trong khi các yếu tố khác

được cố định giá trị. Điều kiện lựa chọn là điều kiện ở đó hiệu suất sản phẩm thu được là cao nhất. Nếu cùng hiệu suất, điều kiện có thời gian phản ứng ngắn hơn được lựa chọn. Phản ứng trong điều kiện gia nhiệt truyền thống và không hỗ trợ vi sóng cũng được tiến hành song song, ghi nhận hiệu suất sản phẩm.

Tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron với quy trình tối ưu: Quy trình sau khảo sát được áp dụng để tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron với các nhóm thế có đặc điểm không gian và điện tử khác nhau trên vòng benzylic (hình 2). Chất tổng hợp được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ (¹H-NMR, MS và IR).

3. Thực nghiệm

3.1. Phản ứng tổng hợp 2',4',6'-trihydroxycloacetophenon 1

Trong bình cầu 250 ml, 20 ml Et₂O, phloroglucinol (1,00 g, 7,9 mmol) được hoà tan và làm lạnh đến 0°C. Hỗn hợp phản ứng được thêm chloroacetonitril (0,5 ml, 7,9 mmol) và ZnCl₂ (0,11 g, 0,8 mmol). HCl khí được sục vào bình phản ứng trong 2 giờ ở 0°C, phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được lọc thu tủa. Tủa được cho vào cốc phản ứng vi sóng chuyên dụng và hoà tan trong HCl 1 M (10 ml). Phản ứng được tiến hành ở điều kiện vi sóng khảo sát và theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi chloroform:methanol (10:1) mỗi 5 phút. Phản ứng trong điều kiện gia nhiệt truyền thống và không hỗ trợ vi sóng cũng được tiến hành song song. Phản ứng được dừng lại khi vết nguyên liệu biến mất trên sắc ký đồ và ghi nhận thời gian. Hỗn hợp được làm lạnh, lọc, rửa tủa bằng nước cất lạnh thu sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại trong nước và sấy ở 50-60°C thu sản phẩm 1. R_f = 0,57 (toluen:aceton=4:1); IR (ATR, ν cm⁻¹) 3402,43 (ν_{OH}), 1635,64 (ν_{C=O}); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 12,05 (2H, s, OH), 10,52 (1H, s, OH), 5,84 (2H, s, H-Ar), 4,97 (2H, s, CH₂). Phổ ¹H-NMR phù hợp với công bố trước đây [15].

3.2. Phản ứng đóng vòng tạo 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-on 2

Trong cốc phản ứng chuyên dụng, 2',4',6'-trihydroxycloacetophenon 1 (0,50 g, 2,5 mol) và natri methanolat (0,54 g, 10 mmol) được hoà tan trong methanol (15 ml). Phản ứng được tiến hành ở điều kiện vi sóng khảo sát và theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi chloroform:methanol (10:1) mỗi 5 phút. Phản ứng trong điều kiện gia nhiệt truyền thống và không hỗ trợ vi sóng cũng được tiến hành song song. Phản ứng được dừng lại khi vết nguyên liệu biến mất trên sắc ký đồ và ghi nhận thời gian. Hỗn hợp phản ứng được thêm 10 ml nước cất, acid hoá bằng dung dịch HCl 1 M, làm lạnh, lọc, rửa bằng nước cất lạnh thu sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại trong nước thu sản phẩm 2. R_f = 0,59 (toluen:aceton=1:1); IR (ATR, ν cm⁻¹) 3298,28

($\nu_{\text{O-H}}$), 1668,43 ($\nu_{\text{C=O}}$); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6 , ppm) δ 9,65 (1H, s, OH), 8,81 (1H, s, OH), 6,06 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H-Ar), 6,00 (1H, d, $J=1,7$ Hz, H-Ar), 4,60 (2H, s, CH_2). Phổ $^1\text{H-NMR}$ phù hợp với công bố trước đây [15].

3.3. Tổng hợp dẫn chất 4,6-dihydroxyauron 4

Trong cốc phản ứng chuyên dụng, 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-on **2** (0,2 g, 1,2 mmol), KOH (0,34 g, 6,0 mmol) và 2,5-dimethoxybenzaldehyd **3** (0,23 g, 1,4 mmol) được hoà tan trong EtOH 50% (10 ml). Phản ứng được tiến hành ở điều kiện vi sóng được khảo sát và theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi cloroform:methanol (10:1) mỗi 5 phút. Phản ứng được dừng lại khi vết nguyên liệu biến mất trên sắc ký đồ và ghi nhận thời gian. Phản ứng trong điều kiện gia nhiệt truyền thống và không hỗ trợ vi sóng cũng được tiến hành song song. Hỗn hợp được thêm vào nước cất (30 ml), trung hoà bằng dung dịch HCl 1 M, lọc thu sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại trong hỗn hợp ethanol/nước thu được 2-(2,5-dimethoxybenzyliden)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-on **4c**. IR (ATR, ν cm^{-1}) 3244,27 ($\nu_{\text{O-H}}$), 1654,92 ($\nu_{\text{C=O}}$); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 10,96 (1H, s, OH), 10,89 (1H, s, OH), 7,64 (1H, d, $J=3,0$ Hz, H6'), 7,06-6,98 (2H, m, H3', H4'), 6,85 (1H, s, CH=), 6,23 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H7), 6,08 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H5), 3,83 (3H, s, OCH_3), 3,77 (3H, s, OCH_3); $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$; MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ dự kiến 315,09 m/z, thực tế 315,00 m/z.

3.4. Tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron với quy trình tối ưu

Quy trình sau khảo sát được áp dụng để tổng hợp 5 dẫn chất 4,6-dihydroxyauron với các nhóm thế khác nhau trên vòng benzyliden.

Chất **4a** (2-(2'-clorobenzyliden)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-on): được tạo thành từ phản ứng ngưng tụ giữa **2** và 2-clorobenzaldehyd trong 25 phút, hiệu suất 98%. Sản phẩm thu được dạng tinh thể màu vàng; tan trong ethanol, ethylacetat, DMSO; tan ít trong cloroform; không tan trong nước, hexan; phân huỷ ở 251°C; IR (ATR, ν cm^{-1}) 3373,50 ($\nu_{\text{O-H}}$), 1647,21 ($\nu_{\text{C=O}}$); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 11,08 (1H, s, OH), 11,02 (1H, s, OH), 8,21 (1H, dd, $J=7,8$ Hz, 1,8 Hz, H3'), 7,58 (1H, dd, $J=7,8$ Hz, 1,2 Hz, H6'), 7,48 (1H, td, $J=7,7$ Hz, 1,2 Hz, H4'), 7,41 (1H, td, $J=7,7$ Hz, 1,8 Hz, H5'), 6,81 (1H, s, CH=), 6,23 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H7), 6,10 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H5), $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClO}_4$, MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ dự kiến 289,03 (đồng vị Cl 35); 291,02 (đồng vị Cl 37) m/z, thực tế 289,00; 291,10 m/z. Phổ $^1\text{H-NMR}$ phù hợp với công bố trước đây [15].

Chất **4b** (4,6-dihydroxy-2-(2'-(trifluoromethyl)benzyliden) benzofuran-3(2H)-on): được tạo thành từ phản ứng ngưng tụ giữa **2** và 2-(trifluoromethyl)benzaldehyd

trong 25 phút, hiệu suất 98%. Sản phẩm thu được dạng tinh thể màu vàng; tan trong ethanol, ethylacetat, DMSO; tan ít trong cloroform; không tan trong nước, hexan; phân huỷ ở 251°C; IR (ATR, ν cm^{-1}) 1656,85 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1359,82 ($\nu_{\text{C-F}}$); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 11,11 (1H, s, OH), 11,04 (1H, s, OH), 8,29 (1H, d, $J=7,9$ Hz, H3'), 7,84 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H6'), 7,81 (1H, t, $J=7,7$ Hz, H5'), 7,60 (1H, t, $J=7,7$ Hz, H4'), 6,66 (1H, s, CH=), 6,22 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H7), 6,11 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H5); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 178,5 (C3), 168,0 (C6), 167,9 (C4), 158,8 (C8), 149,2 (C2), 132,9 (C4'), 131,7 (C5'), 130,0 (C1'), 129,0 (C6'), 127,3 (q, $^2J_{\text{CF}}=29,5$ Hz, C2'), 126,3 (q, $^3J_{\text{CF}}=5,7$ Hz, C3'), 124,15 (q, $^1J_{\text{CF}}=273,4$ Hz, CF_3), 102,1 (C=H), 101,2 (C5), 98,0 (C9), 90,9 (C7). $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{F}_3\text{O}_4$, MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ dự kiến 323,05 m/z, thực tế 323,05 m/z.

Chất **4c** (2-(2',5'-dimethoxybenzyliden)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-on): được tạo thành từ phản ứng ngưng tụ giữa **2** và 2,5-dimethoxybenzaldehyd trong 25 phút, hiệu suất 99%. Sản phẩm thu được dạng tinh thể màu vàng; tan trong ethanol, ethylacetat, DMSO; tan ít trong cloroform; không tan trong nước, hexan; nhiệt độ nóng chảy 237-239°C. Dữ liệu phổ được trình bày ở trên.

Chất **4d** (4,6-dihydroxy-2-(3',4',5'-trimethoxybenzyliden)benzofuran-3(2H)-on): được tạo thành từ phản ứng ngưng tụ giữa **2** và 3,4,5-trimethoxybenzaldehyd trong 40 phút, hiệu suất 96%. Sản phẩm thu được dạng tinh thể màu vàng; tan trong ethanol, ethylacetat, DMSO; tan ít trong cloroform; không tan trong nước, hexan; nhiệt độ nóng chảy 227-228°C; IR (ATR, ν cm^{-1}) 3392,79 ($\nu_{\text{O-H}}$), 1664,57,85 ($\nu_{\text{C=O}}$); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 10,94 (1H, s, OH), 10,85 (1H, s, OH), 7,25 (2H, s, H2', H6'), 6,57 (1H, s, CH=), 6,24 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H7), 6,08 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H5), 3,84 (6H, s, OCH_3 , OCH_3), 3,72 (3H, s, OCH_3); $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$; MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ dự kiến: 345,10 m/z, thực tế 345,10 m/z. Phổ $^1\text{H-NMR}$ phù hợp với công bố trước đây [15].

Chất **4e** (2-(3',4'-dichlorobenzyliden)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-on): được tạo thành từ phản ứng ngưng tụ giữa **2** và 3,4-dichlorobenzaldehyd trong 35 phút, hiệu suất 98%. Sản phẩm thu được dạng tinh thể màu vàng; tan trong ethanol, ethylacetat, DMSO; tan ít trong cloroform; không tan trong nước, hexan; phân huỷ ở 256°C; IR (ATR, ν cm^{-1}) 3377,36 ($\nu_{\text{O-H}}$), 1672,28 ($\nu_{\text{C=O}}$); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 11,05 (1H, s, OH), 10,99 (1H, s, OH), 8,09 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H2'), 7,89 (1H, dd, $J=8,5$ Hz, 2,0 Hz, H6'), 7,71 (1H, d, $J=8,4$ Hz, H5'), 6,63 (1H, s, CH=), 6,24 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H7), 6,09 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H5); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 178,7 (C3), 167,8 (C6), 167,7 (C4), 158,6 (C8), 148,6 (C2), 133,3 (C3'), 131,9 (C4'), 131,5 (C1'), 131,3 (C5'), 131,0 (C2'), 130,3 (C6'), 105,4 (C=H), 102,3 (C5), 98,0 (C9), 90,8 (C7); $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_4$;

MS (ESI) $[M+H]^+$ dự kiến 322,99 (đồng vị Clo 35), 324,98 (đồng vị Clo 35, Clo 37), 326,98 (đồng vị Clo 37) m/z, thực tế 323,00, 325,10, 327,10 m/z.

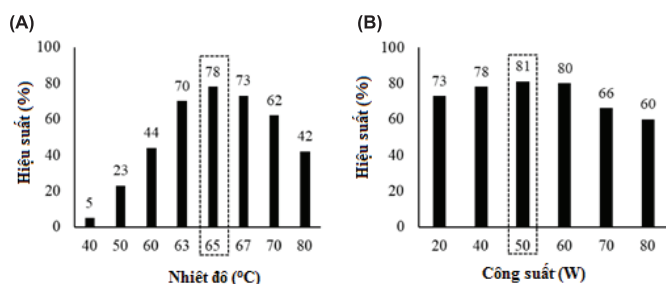
4. Kết quả và bàn luận

4.1. Phản ứng tổng hợp 2',4',6'-trihydroxycloacetophenon 1

Khảo sát nhiệt độ: Các phản ứng được tiến hành riêng biệt với công suất máy cố định 40 W và nhiệt độ thay đổi 40-80°C (hình 3A). Kết quả cho thấy ở 65°C, hiệu suất phản ứng là cao nhất (78%).

Khảo sát công suất máy và thời gian: Các phản ứng được tiến hành riêng biệt ở nhiệt độ 65°C và công suất máy thay đổi từ 20 đến 80 W (hình 3B). Kết quả cho thấy, ở 50 W hiệu suất phản ứng là cao nhất (81%), phản ứng xảy ra trong 30 phút.

Phản ứng trong điều kiện gia nhiệt truyền thống và không vi sóng ở 80°C được tiến hành trong 3 giờ. Chất rắn thu được là một hỗn hợp gồm **1** và các tạp chất khác khó phân tách, hiệu suất thô 70-90%.



Hình 3. Kết quả khảo sát điều kiện phản ứng tổng hợp chất 1. (A) Khảo sát nhiệt độ ở công suất 40 W; (B) Khảo sát công suất ở nhiệt độ 65°C.

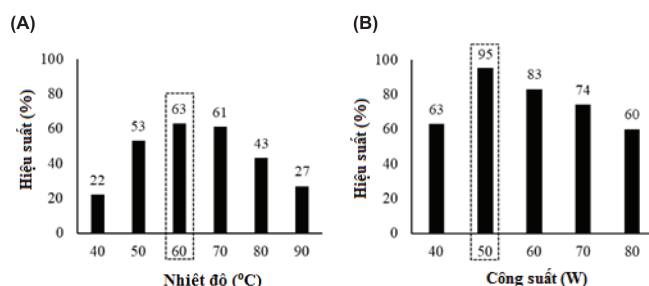
Thực nghiệm cho thấy, khi tiến hành phản ứng thủy phân muối iminium với dung dịch HCl tạo **1** rất dễ sinh tạp khi thời gian phản ứng dài và nhiệt độ quá cao. Trong công bố trước đây, hiệu suất sản phẩm trong điều kiện gia nhiệt truyền thống thường thấp (30-40%) [15]. Việc áp dụng vi sóng đã giúp giảm đáng kể thời gian phản ứng từ 3 giờ xuống 30 phút, hạn chế tác dụng của nhiệt độ cao trên phản ứng, hiệu suất phản ứng cải thiện từ 40 lên 81%. Khi thực hiện ở điều kiện máy vi sóng, thông số nhiệt độ và công suất cần điều chỉnh phù hợp. Nếu công suất nhỏ, thời gian phản ứng kéo dài, sinh nhiều tạp. Nếu công suất quá lớn, nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng khó kiểm soát, dễ vượt ra giới hạn nhiệt độ thích hợp, phản ứng cũng sẽ sinh ra tạp.

4.2. Phản ứng đóng vòng tạo 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-on 2

Khảo sát nhiệt độ: Các phản ứng được tiến hành riêng biệt với công suất máy cố định 40 W và nhiệt độ thay đổi từ 40 đến 90°C (hình 4A). Kết quả cho thấy, ở 60°C hiệu suất phản ứng là cao nhất (63%).

Khảo sát công suất máy và thời gian: Các phản ứng được tiến hành riêng biệt ở nhiệt độ 60°C và công suất máy thay đổi từ 20-80 W. Thời gian được ghi nhận khi vết nguyên liệu biến mất trên sắc ký đồ (hình 4B). Kết quả cho thấy, ở 60°C và 50 W hiệu suất phản ứng là cao nhất (95%), phản ứng xảy ra trong 5 phút.

Phản ứng trong điều kiện gia nhiệt truyền thống và không có vi sóng ở 50°C được tiến hành trong 30 phút. Hiệu suất **2** thu được là 49%.



Hình 4. Kết quả khảo sát điều kiện phản ứng tổng hợp chất 2. (A) Khảo sát nhiệt độ ở công suất 40 W; (B) Khảo sát công suất ở nhiệt độ 60°C.

Phản ứng tổng hợp hợp chất **2** xảy ra rất nhanh và bị ảnh hưởng nhiều bởi nhiệt độ. Do đó, nhiệt độ phản ứng khi tiến hành cần được kiểm soát bằng đầu dò nhiệt độ của máy tổng hợp vi sóng. Chất lượng và độ nhạy của đầu dò ảnh hưởng đến chất lượng phản ứng.

4.3. Tổng hợp dẫn chất 4,6-dihydroxyauron 4

Phản ứng ngưng tụ giữa 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-on **2** và 2,5-dimethoxybenzaldehyd **3** đã được nghiên cứu và áp dụng ở công suất 180 W [9]. Điều kiện này khi áp dụng trên máy tổng hợp hoá học Discover SP-CEM không thu được sản phẩm. Do đó, điều kiện công suất máy và thời gian được khảo sát ở nhiệt độ 80°C - khoảng nhiệt độ sôi của ethanol (bảng 1). Kết quả cho thấy, ở công suất 50 W, nhiệt độ 80°C, 30 phút, hiệu suất **4c** đạt 99%. Phản ứng trong điều kiện không có vi sóng được tiến hành ở 70-80°C và 1 ngày. Hiệu suất **4c** thu được là 74%.

Bảng 1. Kết quả khảo sát phản ứng ngưng tụ 4c.

Công suất máy	Thời gian	Hiệu suất 4c
180 W	-	-
100 W	-	-
75 W	30 phút	<40% nhiều tạp
50 W	25 phút	99%
25 W	>1 giờ	-
Gia nhiệt truyền thống	1 ngày	74%

-: phản ứng hoá đen hoặc rất nhiều tạp hoặc không tính hiệu suất.

4.4. Tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron với quy trình tối ưu

Quy trình tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron sử dụng vi sóng đã rút ngắn thời gian tổng hợp và hiệu suất cải thiện đáng kể so với quy trình gia nhiệt truyền thống (bảng 2). Các giai đoạn tổng hợp đều được tiến hành trong thời gian 5-30 phút so với phương pháp gia nhiệt truyền thống có thể lên đến ngày. Hiệu suất ở các giai đoạn đều đạt trên 80%.

Bảng 2. So sánh thời gian và hiệu suất phản ứng gia nhiệt truyền thống với phản ứng hỗ trợ vi sóng.

Phản ứng	Tổng hợp chất 1	Tổng hợp chất 2	Tổng hợp chất 4c
Gia nhiệt truyền thống	3 giờ	30 phút	1 ngày*
	-	49%	74%
Vi sóng	30 phút	5 phút	20-45 phút**
	81%	95%	99%

*: thời gian được trình bày cho **4c**; **: thời gian thay đổi tùy theo dẫn chất benzaldehyd được sử dụng.

Quy trình tổng hợp được áp dụng để tổng hợp dẫn chất auron (**4a-4e**) với các nhóm thế có đặc điểm điện tử và kích thước khác nhau trên vòng benzylic. Tất cả phản ứng đều cho hiệu suất cao $\geq 98\%$. Cấu trúc dẫn chất auron (**4a-4e**) được xác định bằng phổ $^1\text{H-NMR}$, IR và MS. Khối phổ thực nghiệm thu được từ 5 dẫn chất đều cho pic tương ứng với dự kiến. Phổ IR có các vân hấp thụ của các nhóm chức đặc trưng như C=O và OH. Theo công bố trước đây, đồng phân (E) hay (Z) của dẫn chất auron có thể được xác định qua độ dịch chuyển hóa học (δ) của hydro tại CH= olefin. Trong đó, hydro tại CH= olefin của đồng phân (Z) có δ khoảng 6,70 ppm và đồng phân (E) có $\delta > 7$ ppm [16]. Các dẫn chất auron tổng hợp đều có độ dịch chuyển hoá học của hydro olefin trong khoảng 6,57-6,81 ppm. Do đó, các dẫn chất tổng hợp được có cấu hình (Z) như dự kiến. Các dẫn chất **4a**, **4c** và **4d** cũng có phổ $^1\text{H-NMR}$ phù hợp với công bố trước đây [15, 17-19]. Dẫn chất **4b** và **4e** là những dẫn chất mới theo tra cứu trên Sci-Finder ngày 11/6/2022.

5. Kết luận

Quy trình tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron với sự hỗ trợ của vi sóng đã được tối ưu hóa. Từ quy trình tối ưu, 5 dẫn chất 4,6-dihydroxyauron với nhóm thế khác nhau trên vòng benzylic đã được tổng hợp và khẳng định cấu trúc thông qua các phương pháp phổ. Hai dẫn chất **4b**, **4e** trong số 5 chất tổng hợp được là chất mới. Kết quả của nghiên cứu tạo tiền đề cho việc tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron với nhóm thế khác nhau, góp phần làm giàu thêm ngân hàng các dẫn chất auron phục vụ cho nghiên cứu khảo sát hoạt tính sinh học.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này nhận được tài trợ kinh phí của Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh thông qua đề tài mã số 124/2021/HĐ-ĐHYD. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Ninomiya, M. Koketsu (2013), "Minor flavonoids (chalcones, flavanones, dihydrochalcones, and aurones)", *Natural Products*, **1**, pp.1867-1900, DOI: 10.1007/978-3-642-22144-6_62.
- [2] G. Sui, T. Li, B. Zhang, et al. (2021), "Recent advances on synthesis and biological activities of aurones", *Biorganic Medicinal Chemistry*, **29**, DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115895, DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115895.
- [3] R. Haudecoeur, A. Boumendjel (2012), "Recent advances in the medicinal chemistry of aurones", *Current Medicinal Chemistry*, **19**(18), pp.2861-2875, DOI: 10.2174/092986712800672085.
- [4] B. Boucherle, M. Peuchmaur, A. Boumendjel, et al. (2017), "Occurrences, biosynthesis and properties of aurones as high-end evolutionary products", *Phytochemistry*, **142**, pp.92-111, DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.06.017.
- [5] S. Okombi, D. Rival, S. Bonnet, et al. (2006), "Discovery of benzyldenebenzofuran-3 (2 H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes", *Journal of Medicinal Chemistry*, **49**(1), pp.329-333, DOI: 10.1021/jm050715i.
- [6] J. Liu, M. Liu, Y. Yue, et al. (2013), "Construction of the flavones and aurones through regioselective carbonylative annulation of 2-bromophenols and terminal alkynes", *Tetrahedron Letters*, **54**(14), pp.1802-1807, DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.01.043.
- [7] Ta. Yatabe, X. Jin, N. Mizuno, et al. (2018), "Unusual olefinic C-H functionalization of simple chalcones toward aurones enabled by the rational design of a functionintegrated heterogeneous catalyst", *ACS Catalysis*, **8**(6), pp.4969-4978, DOI: 10.1021/acscatal.8b00727.
- [8] C.T.H Van, T.T. Dao, V.P. Nguyen, et al. (2014), "Synthesis and investigation of anti-acetylcholinesterase activity of some aurone derivatives", *Journal of Pharmacology*, **54**(1), pp. 30-36 (in Vietnamese).
- [9] M.R. Ahmad, V.G. Sastry, N. Bano, et al. (2016), "Synthesis of novel chalcone derivatives by conventional and microwave irradiation methods and their pharmacological activities", *Arabian Journal of Chemistry*, **9**, pp.931-935, DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.09.002.
- [10] T.A. Geissman, J.B. Harborne (1955), "Anthochlor pigments. X. Aureusin and cernuosioid", *Journal of The American Chemical Society*, **77**(17), pp.4622-4624, DOI: 10.1021/ja01622a054.
- [11] I. Volf, I. Ignat, M. Neamtu, et al. (2014), "Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols", *Chemical Papers*, **68**(1), pp.121-129, DOI: 10.2478/s11696-013-0417-6.
- [12] C.O. Kappe, D. Dallinger (2006), "The impact of microwave synthesis on drug discovery", *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**(1), pp.51-63.
- [13] V. Polshettiwar, R.S. Varma (2008), "Aqueous microwave chemistry: A clean and green synthetic tool for rapid drug discovery", *Chemical Society Reviews*, **37**(8), pp.1546-1557, DOI: 10.1039/B716534J.
- [14] V. Santagada, F. Frecentese, E. Perissutti, et al. (2009), "Microwave assisted synthesis: A new technology in drug discovery", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **9**(3), pp.340-358, DOI: 10.2174/13895709787582989.
- [15] C.Y. Lee, E.H. Chew, M.L. Go (2010), "Functionalized aurones as inducers of NAD(P) H: Quinone oxidoreductase 1 that activate AhR/XRE and Nrf2/ARE signaling pathways: Synthesis, evaluation and SAR", *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**(7), pp.2957-2971, DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.03.023.
- [16] A. Boumendjel (2003), "[General articles] aurones: A subclass of flavones with promising biological potential", *Current Medicinal Chemistry*, **10**(23), pp.2621-2630, DOI: 10.2174/0929867033456468.
- [17] K. Boussafi, D. Villemin, M. Belghosi (2016), "Green synthesis of aurones and related compounds under solvent-free conditions", *Journal of Chemical Research*, **40**(9), pp.567-569, DOI: 10.3184/174751916X147195934886.
- [18] R. Haudecoeur, A.A. Belkacem, W. Yi, et al. (2011), "Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase", *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**(15), pp.5395-5402, DOI: 10.1021/jm200242p.
- [19] B. Touquet, L. Pelissier, P. Cavailles, et al. (2018), "High-content imaging assay to evaluate Toxoplasma gondii infection and proliferation: a multiparametric assay to screen new compounds", *PLOS ONE*, **13**(8), DOI: 10.1371/journal.pone.0201678, DOI: 10.1371/journal.pone.0201678.

Nghiên cứu đặc điểm nông sinh học và hàm lượng auranlio-obtusin trong hạt một số mẫu giống Thảo quyết minh (*Senna tora* L.) trồng tại Hà Nội

Đặng Văn Hùng*, Phan Thị Thu, Lương Thị Hoan, Trần Văn Thắng, Trịnh Văn Vượng, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Quỳnh Nga, Nguyễn Thị Hà Ly, Tô Minh Tứ

Viện Dược liệu, 3B Quang Trung, phường Tràng Tiền, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/6/2022; ngày chuyển phản biện 24/6/2022; ngày nhận phản biện 11/7/2022; ngày chấp nhận đăng 15/7/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện trên 11 mẫu giống Thảo quyết minh (TQM) thu thập ở các vùng sinh thái khác nhau, được gieo trồng, đánh giá về đặc điểm hình thái, yếu tố cấu thành năng suất và hàm lượng auranlio-obtusin trong hạt tại huyện Thanh Trì, TP Hà Nội năm 2021. Thí nghiệm được bố trí tuần tự không nhắc lại. Diện tích ô thí nghiệm là 50 m², khoảng cách trồng 40x40 cm. Kết quả cho thấy, các mẫu giống có chiều cao cây 123,6-233,2 cm, số quả chắc trung bình/cây đạt 253,4-464,0 quả, số hạt trung bình/quả đạt 18,1-30,1 hạt, khối lượng 1000 hạt đạt 8,63-21,70 g. Năng suất cả thể (năng suất hạt/cây) của các mẫu giống thu thập đạt 33,2-108,6 g/cây. Trong đó, các mẫu giống có triển vọng về năng suất gồm: TQM 1 (108,6 g/cây), TQM 6 (55,6 g/cây), TQM 4 (54,8 g/cây). Hàm lượng auranlio-obtusin trong hạt của các mẫu giống thu thập biến động từ 0,06 đến 0,27%. Trong đó, mẫu TQM 11 có hàm lượng auranlio-obtusin trong hạt cao nhất (0,27%), tiếp đến là TQM 10, TQM 8, TQM 4, TQM 3, TQM 1 và TQM 2, các mẫu này có hàm lượng auranlio-obtusin trong hạt đạt 0,15-0,24%, các mẫu còn lại đạt 0,06-0,09%.

Từ khóa: auranlio-obtusin, năng suất hạt/cây, Thanh Trì, Thảo quyết minh.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

TQM có tên khoa học *Senna tora* L., tên đồng nghĩa *Cassia tora* L. Ở Việt Nam, TQM phân bố hầu như ở khắp các địa phương, trừ những nơi thuộc vùng núi với độ cao trên 1000 m [1]. Theo tài liệu cổ, TQM có vị mặn, tính bình vào 2 kinh can và thận, có tác dụng thanh can, ích thận, khứ phong, sáng mắt, nhuận tràng, thông tiện. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, ngoài các tác dụng trên, TQM còn có một số hoạt động dược lý khác như: kháng khuẩn, hạ huyết áp, hạ sốt, chống oxy hóa, kháng nấm, chống viêm... [2].

Do có giá trị cao trong y học nên TQM đã được khai thác, sử dụng từ lâu và đã được Bộ Y tế đưa vào Danh mục 100 dược liệu có giá trị y tế và kinh tế cao để tập trung phát triển giai đoạn 2020-2030 [3]. Đến nay, nhu cầu về thị trường hạt TQM ngày càng tăng. Theo số liệu phân tích của Công ty Avlast Hydrocolloids, Ấn Độ về thị trường hạt TQM trên toàn cầu cho thấy, thị trường này sẽ đạt giá trị 42,4 tỷ USD vào năm 2026. Sự gia tăng nhu cầu về TQM ở nhiều khu vực trên thế giới như Mỹ, châu Á - Thái Bình Dương, châu Âu, Trung Đông và châu Phi. Trong đó, Mỹ chiếm thị phần lớn nhất trong năm 2017 và được dự đoán sẽ tiếp tục dẫn đầu trong 5 năm tới. Nguồn xuất khẩu hạt TQM chủ yếu đến từ các nước châu Á như: Ấn Độ, Trung Quốc, Indonesia... [4].

Việt Nam có nguồn TQM khá dồi dào. Ở các vùng núi thấp và trung du, mỗi năm thu mua được hàng trăm tấn hạt khô cung cấp cho nhu cầu sử dụng trong nước và xuất khẩu.

Tuy nhiên, với mức độ khai thác như hiện nay, thực tế vẫn chưa tận dụng hết tiềm năng của cây. Ở một số tỉnh như Hải Dương, Hưng Yên, Hà Nội (Hà Tây cũ), Nam Định và các địa phương khác ở miền Bắc nước ta..., người dân đã chủ động trồng TQM trên các bờ kênh mương, bãi hoang với tác dụng phủ đất, lấy cành lá làm phân xanh, hạt làm thuốc và làm nước uống như trà. Khối lượng dược liệu tiêu thụ trung bình trong giai đoạn 2010-2012 ở Việt Nam khoảng 200 tấn/năm [5, 6].

Nghiên cứu về thành phần hóa học trong hạt TQM trồng ở Việt Nam cho thấy, trong hạt TQM có 14 nguyên tố vô cơ: Al, Si, Mg, Ca, Fe, Mn, Ti, Ni, Mo, Cu, Ag, Xn, Pb và Na, trong đó các nguyên tố Mg, Ca và Na có hàm lượng tương đối cao (>3%). Ngoài các hợp chất có chứa antranoid là: chrysophanol, obtusifolin, obtusin và auranlio-obtusin đã tìm thấy trong hạt TQM trồng ở Hàn Quốc, hạt TQM trồng ở Việt Nam còn chứa 5-metoxyl furfural, hợp chất này chưa thấy đề cập đến trong thành phần hóa học của hạt TQM trồng ở Hàn Quốc, Ấn Độ và Nhật Bản [7].

Auranlio-obtusin là một dẫn xuất anthraquinon và phân lập chủ yếu từ hạt khô của một số loài thuộc chi *Cassia* như *Cassia purusifolia* L. (syn. *Senna purusifolia*, Fabaceae), *Cassia tora* L. (syn. *Senna tora*) và được gọi là *Semen cassiae*. Trong số các chất có hoạt tính sinh học được phân lập từ *Semen cassiae*, auranlio-obtusin được xác định là thành phần chính, nó cũng được sử dụng như một chất đánh dấu phytochemical để kiểm tra chất lượng của *Semen*

*Tác giả liên hệ: Email: hungdangvanvn1379@gmail.com

Assessment of agro-biological characteristics and aurantio-obtusin contents in seeds of some samples of *Senna tora* L. grown in Hanoi

Van Hung Dang*, Thi Thu Phan, Thi Hoan Luong, Van Thang Tran, Van Vuong Trinh, Thi Huong Nguyen, Quynh Nga Nguyen, Thi Ha Ly Nguyen, Minh Tu To

National Institute of Medicinal Materials,
3B Quang Trung Street, Trang Tien Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 20 June 2022; revised 11 July 2022; accepted 15 July 2022

Abstract:

This study was carried out on 11 *Senna tora* L. samples grown in different ecological areas in Thanh Tri, Hanoi in 2021. These samples are used for assessment of agronomical characteristics, yield component, and aurantio-obtusin contents. The experiment was arranged in sequence with no replication. The experimental plot area was 50 m², planting distance was 40x40 cm. The results showed that the plant height varied from 123.6 to 233.2 cm, the average number of firm fruits/plants varied from 253.4 to 464.0 fruits, the average number of seeds/fruits varied from 18.1 to 30.1 seeds, and the weight of 1,000 seeds reached 8.63 to 21.70 g. The individual yield of *Senna tora* L. samples varied from 33.2 to 108.6 g/plant. The promising varieties in term of yield are TQM 1 (108.6 g/plant), TQM 6 (55.6 g/plant), and TQM 4 (54.8 g/plant). The aurantio-obtusin content in the seeds of the *Senna tora* L. samples varied from 0.06 to 0.27%. Amongst them, the aurantio-obtusin content of TQM 11 is the highest (0.27%), followed by TQM 10, TQM 8, TQM 4, TQM 3, TQM 1 and TQM 2 (0.15 to 0.24%), and the rest of samples reached 0.06-0.09%.

Keywords: aurantio-obtusin, seed/plant yield, *Senna tora* L., Thanh Tri.

Classification number: 3.4

cassiae trong dược điển Trung Quốc. *Semen cassiae* được sử dụng rộng rãi trong bài thuốc dân gian ở Trung Quốc và được phát hiện có các đặc tính sinh học khác nhau, bao gồm tác dụng chống đái tháo đường, giảm đau bụng, chống oxy hóa, chống độc và bảo vệ thần kinh. Nghiên cứu của nhóm N.V. Chethala và cs (2014) [8] đã chỉ ra rằng, aurantio-obtusin không chỉ kích thích sự di chuyển của nguyên bào xương theo cách thức phụ thuộc vào nồng độ, mà còn cả sự phân hóa và khoáng hóa của nó.

Những nghiên cứu trước đây về TQM chủ yếu tập chung vào thành phần hóa học, tác dụng dược lý. Nghiên cứu về đánh giá đặc điểm hình thái, tiềm năng năng suất và đặc điểm về hạt còn hạn chế. Do đó, chúng tôi thực hiện “Nghiên cứu đặc điểm nông sinh học và hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt một số mẫu giống TQM (*Senna tora* L.) tại Thanh Tri, Hà Nội”.

2. Vật liệu, địa điểm, nội dung và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: Vật liệu nghiên cứu bao gồm 11 mẫu giống TQM thu thập tại ở các vùng sinh thái khác nhau như Đồng bằng sông Hồng (6 mẫu giống), gồm Vĩnh Phúc (TQM 4), Hà Nội (TQM 8, TQM 10), Hưng Yên (TQM 12), Hà Nam (TQM 9), Ninh Bình (TQM 5), trung du miền núi phía Bắc (4 mẫu giống): Lạng Sơn (TQM 1), Cao Bằng (TQM 2), Tuyên Quang (TQM 3), Hòa Bình (TQM 11) và Bắc Trung Bộ (1 mẫu giống): Thanh Hóa (TQM 6).

2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Nghiên cứu trồng và Chế biến cây thuốc Hà Nội (Thanh Tri, Hà Nội).

Thời gian: Từ tháng 2-12/2021.

2.2. Nội dung nghiên cứu: Đánh giá đặc điểm hình thái, các yếu tố cấu thành năng suất, năng suất cá thể (năng suất hạt/cây), đặc điểm và hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt của các mẫu giống TQM thu thập.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

11 mẫu giống TQM thu thập đều đúng loài *Senna tora* L. Rxb (kết quả giám định tên khoa học do Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu cung cấp gồm phiếu kết quả, số phiếu 79D/22 và hình ảnh mẫu giám định. Cán bộ giám định mẫu: ThS Nguyễn Quỳnh Nga, ThS Phan Văn Trường) và được đánh số ký hiệu từ TQM 1 đến TQM 12 (không có TQM 7).

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp tuần tự, không nhắc lại, diện tích ô thí nghiệm là 50 m².

Ngày gieo hạt: 8/2/2021.

Ngày trồng: 26/3/2021.

Mật độ trồng, lượng phân bón, cách bón phân áp dụng theo quy trình kỹ thuật trồng cây TQM trong sách Kỹ thuật trồng cây thuốc do Viện Dược liệu ban hành [5].

Khoảng cách trồng: 40x40 cm (62.500 cây/ha).

Lượng phân bón cho 1 ha: phân hữu cơ hoai mục: 10 tấn + N 100 kg + P₂O₅ 52 kg + KCl 120 kg.

2.4. Các chỉ tiêu theo dõi

Các chỉ tiêu về sinh trưởng, phát triển: Chiều cao cây (cm) từ mặt đất đến đầu mút của cành cao nhất lúc thu hoạch. Số nhánh cấp I/cây (cành): số nhánh được hình thành từ thân chính của 10 cây mẫu/ô. Thời gian từ gieo đến ra hoa (ngày) tính từ lúc trồng đến khi có 50% số cây/ô có ít nhất một hoa nở. Thời gian sinh trưởng tính từ ngày gieo đến ngày thu hoạch đợt cuối.

Các chỉ tiêu về hình thái: Màu sắc thân, lá, hoa, quả khi chín, hạt được quan sát bằng mắt thường và đối chiếu với bảng so màu. Hình dạng lá, hạt được quan sát bằng mắt thường và mô tả theo hình dạng thực tế.

Các chỉ tiêu về các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất cá thể:

Số quả/cây: đếm tổng số quả trên 5 cây mẫu, tính giá trị trung bình.

Số quả chắc/cây: đếm số quả chắc trên 5 cây mẫu, tính giá trị trung bình.

Số hạt/quả: đếm tổng số hạt trên 10 quả, tính giá trị trung bình.

Khối lượng 1000 hạt (g): cân 3 mẫu, mỗi mẫu 1000 hạt ở độ ẩm 12%.

Năng suất cá thể (g/cây): năng suất cá thể được tính trên tổng các lần thu của 5 cây mẫu, tính giá trị trung bình.

Chỉ tiêu về hàm lượng hoạt chất trong hạt:

Khi quả của các mẫu giống gieo trồng chín hoàn toàn (màu vỏ quả chuyển sang màu nâu), tiến hành thu và tách hạt riêng theo từng mẫu. Mỗi mẫu giống TQM lấy 1 mẫu hạt để phân tích hàm lượng aurantio-obtusin.

Xác định hàm lượng hoạt chất aurantio-obtusin trong hạt theo Phương pháp HPLC-DAD [9] tại Khoa Hóa phân tích tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.

Hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt được tính theo % hạt khô kiệt.

2.5. Xử lý số liệu

Các số liệu theo dõi (chiều cao cây, số cành cấp I, các yếu tố cấu thành năng suất, năng suất hạt/cây, kích thước, khối lượng hạt) được xử lý theo phần mềm MS Excel và chương trình IRRISTRT 5.0.

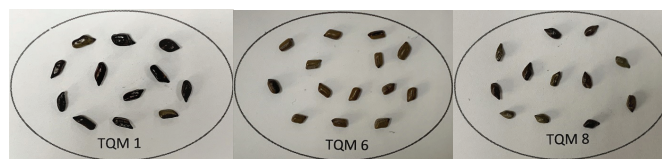
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả đánh giá đặc điểm hình thái của các mẫu TQM thu thập

Kết quả đánh giá đặc điểm hình thái của các mẫu TQM thu thập được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Một số đặc điểm hình thái của các mẫu giống TQM thu thập.

STT	Ký hiệu mẫu	Màu sắc thân	Màu sắc lá	Hình dạng lá chết	Màu sắc hoa	Màu quả khi chín	Hình dạng, màu sắc hạt
1	TQM 1	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu nhạt	Hình trụ, đầu vát chéo, màu nâu sẫm, bóng
2	TQM 2	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu nhạt	Hình trụ, đầu vát chéo, màu nâu nhạt, bóng
3	TQM 3	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu nhạt	Hình trụ, đầu vát chéo, màu nâu vàng, bóng
4	TQM 4	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu nhạt	Hình trụ, đầu vát chéo, màu nâu nhạt, bóng
5	TQM 5	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu	Hình trụ, màu nâu vàng, bóng
6	TQM 6	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu	Hình trụ, màu nâu vàng, bóng
7	TQM 8	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu	Hình Tháp, màu nâu vàng, bóng
8	TQM 9	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu	Hình trụ, màu nâu vàng, bóng
9	TQM 10	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu	Hình trụ, đầu vát chéo, màu nâu nhạt, bóng
10	TQM 11	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu	Hình trụ, đầu vát chéo, màu nâu nhạt, bóng
11	TQM 12	Xanh - xám	Xanh	Hình trứng ngược	Vàng	Nâu	Hình trụ, màu nâu vàng, bóng



Hình 1. Đặc điểm hình thái của một số mẫu giống TQM.

Kết quả đánh giá cho thấy, các mẫu giống thu thập có màu sắc thân, lá, hình dạng lá, màu sắc hoa giống nhau (thân non có màu xanh, thân già có màu xám, lá màu xanh, lá chết có hình trứng ngược, hoa màu vàng). Quả của các mẫu giống khi chín có màu nâu nhạt đến nâu. Có 4 mẫu giống có màu vỏ quả nâu nhạt khi chín là: TQM 1, TQM 2, TQM 3 và TQM 4. Các mẫu khác đều có màu vỏ quả khi chín là màu nâu. Theo các tài liệu nghiên cứu trước đây, hạt TQM có hình trụ, ngắn 5-7 mm, rộng 2,5-3 mm, 2 đầu vát chéo, trông hơi giống viên đá lửa, màu nâu nhạt, bóng [1]. Theo mô tả trong tài liệu Dược điển Việt Nam V, hạt TQM có hình trụ, đôi khi hình tháp, 2 đầu vát chéo, dài 3-6 mm, đường kính 1-2,5 mm; mặt ngoài màu nâu nhạt hay lục nâu, bóng; 4 cạnh bên thường nổi rõ thành đường gò, một đường gò nhỏ lên thành ngắn [10].

Kết quả đánh giá hình dạng hạt của các mẫu giống cho thấy, phần lớn các mẫu giống thu thập có hạt hình trụ, đầu vát chéo (ngoại trừ mẫu TQM 8 có dạng hình tháp), đa số các mẫu có màu hạt nâu nhạt hoặc nâu vàng (ngoại trừ mẫu TQM 1 có màu nâu sẫm).

3.2. Một số đặc điểm nông học của các mẫu giống TQM thu thập

Kết quả theo dõi, đánh giá đặc điểm nông học của các mẫu giống TQM thu thập được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Một số đặc điểm nông học của các mẫu TQM thu thập.

STT	Ký hiệu mẫu	Thời gian từ gieo đến khi ra hoa (ngày)	Thời gian từ gieo đến khi ra hoa 50% (ngày)	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Số cành cấp I (cành)	Độ thuần đồng ruộng
1	TQM 1	63	132	242	182,8±8,1	15,4±1,7	Khá
2	TQM 2	147	162	264	228,2±8,0	8,4±1,1	Khá
3	TQM 3	92	157	261	226,6±10,7	9,2±1,2	Khá
4	TQM 4	79	134	237	215,7±5,8	9,6±0,8	Khá
5	TQM 5	120	128	238	123,6±7,9	10,2±1,9	Khá
6	TQM 6	92	106	210	124,5±11,8	9,7±1,1	Khá
7	TQM 8	79	152	262	221,1±10,5	9,4±1,0	Khá
8	TQM 9	144	151	259	136,9±3,1	7,8±0,7	Khá
9	TQM 10	79	157	261	233,2±7,8	8,0±0,8	Khá
10	TQM 11	151	162	265	231,5±5,4	8,3±0,9	Khá
11	TQM 12	79	135	239	125,4±8,0	10,1±1,6	Khá

Thời gian từ gieo đến khi ra hoa là đặc tính di truyền của các giống nhưng chịu sự chi phối rất lớn của các yếu tố môi trường như: nhiệt độ, độ ẩm và dinh dưỡng. Ngày ra hoa được tính từ khi gieo đến khi có 50% số cây/ô có hoa nở. Kết quả theo dõi ở bảng 2 cho thấy, các mẫu giống thu thập có thời gian ra hoa khác nhau khá rõ. Mẫu thu thập tại Lạng Sơn (TQM 1) có thời gian từ gieo đến ra hoa sớm nhất là 63 ngày. Mẫu thu thập tại Hòa Bình (TQM 11) có thời gian từ gieo đến ra hoa muộn nhất là 151 ngày. Các mẫu thu thập khác có thời gian từ gieo đến ra hoa 79-147 ngày. Thời gian từ khi ra hoa đến thời kỳ ra hoa rộ của các mẫu thu thập biến động khá lớn. Nhiều mẫu thu thập có thời gian từ gieo đến khi ra hoa khá sớm (79-92 ngày) như: TQM 3, TQM 4, TQM 10... Tuy nhiên, thời kỳ ra hoa rộ lại muộn, các mẫu này ra hoa rải rác và kéo dài.

Các mẫu giống ra hoa tập trung (thời gian từ bắt đầu ra hoa đến khi ra hoa rộ) từ 7 đến 15 ngày gồm: TQM 9, TQM5, TQM 11 và TQM2. Các mẫu có thời gian ra hoa tập trung sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho công tác thu hái quả sau này. Thời gian sinh trưởng của các mẫu giống biến động từ 210 đến 265 ngày.

Chiều cao cây của các mẫu thu thập biến động khá lớn, từ 123,6 đến 233,2 cm.

Số cành cấp I liên quan đến số quả/cây của các mẫu giống. Kết quả theo dõi cho thấy, số cành cấp I của các mẫu

thu thập biến động từ 7,8 đến 15,4 cành. Mẫu TQM 9 có số cành cấp I ít nhất (7,8 cành), mẫu TQM 1 có số cành cấp I nhiều nhất (15,4 cành), các mẫu còn lại có số cành cấp I từ 8,0-10,2 cành.

Độ thuần đồng ruộng của các mẫu giống được đánh giá gián tiếp thông qua việc quan sát, đếm tỷ lệ cây khác dạng trên ô thí nghiệm. Kết quả đánh giá cho thấy các mẫu giống đều có độ thuần khá.

3.3. Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất cá thể (năng suất hạt/cây) của các mẫu giống TQM thu thập

Kết quả theo dõi các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất cá thể (năng suất hạt/cây) của các mẫu giống TQM thu thập được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất cá thể của các mẫu giống TQM thu thập.

STT	Ký hiệu mẫu	Số quả/cây	Số quả chắc/cây	Tỷ lệ quả lép (%)	Số hạt/quả	Khối lượng 1000 hạt (g)	Năng suất cá thể (g/cây)
1	TQM 1	492,6±26,2	464,0±25,1	5,8	21,0±2,9	21,70±0,22	108,6±2,5
2	TQM 2	302,2±22,2	275,1±21,0	8,9	28,4±2,7	8,63±0,21	40,6±1,4
3	TQM 3	282,2±28,9	255,6±29,4	9,4	28,1±2,2	11,67±0,24	48,4±1,8
4	TQM 4	295,7±18,4	272,2±19,6	10,9	30,1±2,4	13,13±0,17	54,8±2,4
5	TQM 5	376,2±28,7	353,7±27,5	6,0	18,1±2,0	12,63±0,09	50,5±1,3
6	TQM 6	433,1±19,1	411,2±17,0	5,1	18,1±0,8	14,27±0,21	55,6±2,6
7	TQM 8	341,1±32,6	316,0±32,1	11,4	24,6±2,1	11,20±0,16	48,2±1,9
8	TQM 9	275,6±13,2	253,4±13,4	8,4	20,6±1,8	10,57±0,21	33,2±1,4
9	TQM 10	343,3±30,9	318,1±33,2	7,3	25,9±2,5	11,10±0,22	47,6±1,7
10	TQM 11	291,0±18,2	263,5±21,6	9,5	27,3±3,3	9,57±0,17	37,9±1,8
11	TQM 12	431,9±20,1	406,5±21,0	5,9	19,4±2,1	12,43±0,12	50,3±1,4

Các chỉ tiêu được tính theo giá trị trung bình.

Số quả trung bình/cây là một trong những thành phần quyết định đến năng suất hạt của các mẫu giống TQM thu thập. Số quả trung bình/cây nhiều hay ít phụ thuộc vào đặc điểm di truyền của giống và điều kiện trồng trọt. Kết quả theo dõi cho thấy, số quả trung bình/cây của các mẫu giống TQM thu thập biến động từ 275,6 đến 492,6 quả; số quả chắc trung bình/cây của các mẫu biến động 253,4-464,0 quả. Mẫu TQM 9 có số quả chắc/cây ít nhất (253,4 quả), mẫu giống TQM 1 có số quả chắc trung bình/cây nhiều nhất (464,0 quả); tỷ lệ quả lép của các mẫu giống biến động từ 5,1 đến 11,4%.

Số hạt/quả là một trong những yếu tố góp phần gia tăng năng suất, số hạt/quả thay đổi theo chiều dài quả. Các mẫu giống thu thập có số hạt/quả biến động 18,1-30,1 hạt, mẫu giống TQM 5, TQM 6 có số hạt/quả ít nhất (18,1 hạt/quả), mẫu giống TQM 4 có số hạt/quả lớn nhất (30,1 hạt/quả). Các mẫu giống còn lại có số hạt/quả từ 19,4 đến 28,4.

Khối lượng 1000 hạt là đặc tính di truyền của giống, nếu canh tác tốt và đúng lúc vào quá trình tạo hạt sẽ góp phần gia tăng khối lượng 1000 hạt đáng kể. Kết quả theo dõi cho

thấy, các mẫu giống TQM thu thập có khối lượng 1000 hạt biến động từ 8,63 đến 21,70 g. Mẫu giống TQM 1 có khối lượng 1000 hạt lớn nhất (21,70 g) và TQM 2 có khối lượng 1000 hạt nhỏ nhất (8,63 g). Các mẫu giống TQM khác có khối lượng 1000 hạt từ 9,57 đến 14,27 g.

Năng suất cá thể của các mẫu giống TQM thu thập đạt 33,2-108,6 và có thể chia thành các nhóm sau: i) Nhóm có năng suất cá thể >50 g/cây gồm: TQM 1, TQM 6, TQM 4, TQM 5 và TQM 12; ii) Nhóm có năng suất cá thể ≤50 g/cây gồm: TQM 3, TQM 8, TQM 10, TQM 2, TQM 11 và TQM 9.

3.4. Kết quả đánh giá chất lượng hạt của các mẫu TQM thu thập

Kết quả đánh giá kích thước, khối lượng và hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt của các mẫu giống TQM thu thập được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá kích thước, khối lượng và hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt của các mẫu TQM thu thập.

STT	Ký hiệu mẫu	Chiều dài hạt (mm)	Chiều rộng hạt (mm)	Khối lượng 1000 hạt (g)	Hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt (%)
1	TQM 1	5,32±0,42	2,82±0,15	21,70±0,22	0,18±0,01
2	TQM 2	4,37±0,24	2,11±0,15	8,63±0,21	0,15±0,01
3	TQM 3	4,38±0,18	2,09±0,15	11,67±0,24	0,21±0,01
4	TQM 4	4,07±0,15	2,37±0,24	13,13±0,17	0,22±0,01
5	TQM 5	3,98±0,18	2,15±0,08	12,63±0,09	0,06±0,00
6	TQM 6	4,13±0,20	2,56±0,41	14,27±0,21	0,09±0,00
7	TQM 8	4,13±0,08	2,16±0,09	11,20±0,16	0,23±0,01
8	TQM 9	3,69±0,22	1,89±0,16	10,57±0,21	0,09±0,00
9	TQM 10	4,43±0,25	2,33±0,04	11,10±0,22	0,24±0,02
10	TQM 11	4,31±0,15	2,01±0,12	9,57±0,17	0,27±0,02
11	TQM 12	3,64±0,24	2,11±0,18	12,43±0,12	0,08±0,00

Kết quả theo dõi về kích thước hạt của các mẫu giống TQM thu thập cho thấy, các mẫu giống có kích thước hạt biến động 3,69x1,89 mm đến 5,32x2,82 mm. Trong đó, mẫu giống TQM 1 có kích thước hạt lớn nhất (5,32x2,82 mm), kích thước hạt của mẫu giống TQM 9 là nhỏ nhất (3,69x1,89 mm). Các mẫu còn lại có kích thước hạt biến động từ 3,64x2,11 mm đến 4,43x2,33 mm.

Hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt của các mẫu giống TQM thu thập biến động từ 0,06 đến 0,27%. Mẫu giống TQM 11 có hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt cao nhất (0,27%). Các mẫu giống có hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt <0,1% gồm TQM 5, TQM 6, TQM 9 và TQM 12. Đây cũng là nhóm các mẫu giống có chiều cao cây trung bình <150 cm. Các mẫu giống còn lại (TQM 1, TQM 2, TQM 3, TQM 4, TQM 8, TQM 10) có hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt đạt 0,15-0,24%. Đối chiếu với chuyên luận *Cassiae semen* - Dược điển Trung Quốc 2015 thì mẫu giống TQM 5 không đạt về chỉ tiêu hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt.

4. Kết luận

Các mẫu giống TQM đều có thân khi non màu xanh, thân khi già màu xám, lá màu xanh, lá hình trứng ngược, hoa màu vàng. Quả khi chín có màu nâu nhạt đến nâu. Đa số các mẫu giống có hạt hình trụ, đầu vát chéo. Các mẫu giống có màu sắc hạt là màu nâu nhạt hoặc nâu vàng, ngoại trừ mẫu giống TQM 1 hạt có màu nâu sẫm.

Các mẫu có chiều cao cây 123,6-233,2 cm và thời gian sinh trưởng 210-265 ngày. Năng suất cá thể của các mẫu đạt 33,2-108,6 g/cây.

Hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt của các mẫu TQM thu thập đạt 0,06-0,27%. 10 mẫu có hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt đạt theo tiêu chuẩn Dược điển Trung Quốc 2015. Mẫu TQM 5 có hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt thấp hơn so với tiêu chuẩn (theo Dược điển Trung Quốc 2015).

Các mẫu giống có tiềm năng năng suất và hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt cao gồm: TQM 1, TQM 3, TQM 4, TQM 8 và TQM 10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.H. Bich, D.Q. Trung, B.X. Truong, et al (2004), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Science and Technics Publishing House, 2, pp.840-843 (in Vietnamese).
- [2] S. Jain, U.K. Patil (2010), "Phytochemical and pharmacological profile of *Cassia tora* Linn - An over review", *Indian J. Nat. Prod. Res.*, **1**(4), pp.430-437.
- [3] Ministry of Health (2019), *Decision No. 3657/QĐ-BYT on Promulgating The List of 100 Medicinal Herbs with High Medical and Economic Value to Focus on Development in The Period 2020-2030* (in Vietnamese).
- [4] <https://www.avlasthydrocolloids.com/blog/cassia-tora-seedsagricultural-production-statistics-of-india-and-others>, accessed 25 May 2022.
- [5] National Institute of Medicinal Materials (2013), *Techniques for Growing Medicinal Plants*, Agriculture Publishing House, pp.261-262 (in Vietnamese).
- [6] National Institute of Medicinal Materials (2016), *Project report: Building a Database of Vietnamese Medicinal Plant Sources to Serve The Pharmaceutical Chemistry Industry* (in Vietnamese).
- [7] V.T. Nguyet (2010), *Research on Biochemical Characteristics of Some Extract Fractions from Cassia tora L.*, Master's thesis in chemistry, VNU University of Sciences, Vietnam National University, Hanoi.
- [8] C.N. Vishnuprasad, T. Tsuchiya, S. Kanegasaki, et al. (2014), "Aurantio-obtusin stimulates chemotactic migration and differentiation of MC3T3-E1 osteoblast Cells", *Planta Medica*, **80**(7), pp.544-549, DOI: 10.1055/s-0034-1368445.
- [9] Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), *Pharmacopoeia of The People's Republic of China*, China Medical Science Press, pp.97-98.
- [10] Ministry of Health (2018), *Vietnam Pharmacopoeia*, Medical Publishing House, pp.1335-1336 (in Vietnamese).

Điều chế hydrogel chứa chitosan và dầu dừa bằng phương pháp đông lạnh - rã đông

Lê Xuân Trường, Trần Văn Thành*, Hoàng Kim Nghị

Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/3/2021; ngày chuyển phản biện 25/3/2021; ngày nhận phản biện 13/4/2021; ngày chấp nhận đăng 19/4/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm xây dựng công thức cho một hydrogel chứa chitosan (CS) và dầu dừa nguyên chất (VCO) sử dụng các chu kỳ đông lạnh - rã đông (F-T) lặp lại, mục đích cho ứng dụng băng bó vết thương. Nghiên cứu đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của độ thủy phân polyvinyl alcohol (PVA), nồng độ và độ dày lớp dung dịch, số chu kỳ F-T, tỷ lệ CS lên tính chất cảm quan, độ trương nở và phần gel của hydrogel. Khả năng kháng khuẩn của màng PVA/CS/VCO chống lại *Staphylococcus aureus* nhạy methicillin, *S. aureus* kháng methicillin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả cho thấy, PVA có độ thủy phân cao (trên 99%), dễ dàng tạo được hydrogel sau vài chu kỳ F-T. Màng hydrogel càng dày, nồng độ dung dịch PVA càng cao thì độ mềm dẻo, đàn hồi và trương nở càng thấp, đồng thời phần gel càng cao. Công thức dung dịch PVA 10%, tỷ lệ CS/PVA là 40%, 5% (khối lượng/khối lượng - kl/kl) VCO, sau 3 chu kỳ F-T được chọn vì tạo ra hydrogel có tính chất phù hợp và hoạt tính kháng khuẩn tốt.

Từ khóa: chitosan, dầu dừa, hydrogel, polyvinyl alcohol.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Một loạt các loại băng vết thương đã ra đời để phục vụ cho các mục đích khác nhau của quá trình làm lành vết thương. Các loại băng gạc truyền thống có chức năng chính là giữ cho vết thương khô ráo, ngăn chặn sự xâm nhập của vi khuẩn vào vết thương. Tuy nhiên, hiện nay người ta đã chứng minh rằng việc giữ một môi trường vết thương ẩm và ẩm giúp chữa lành vết thương nhanh chóng và hiệu quả hơn. Băng vết thương hiện đại giúp giữ và tạo môi trường ẩm xung quanh vết thương, chúng chủ yếu bao gồm hydrocolloid, alginate và hydrogel [1]. Trong đó, hydrogel được báo cáo là lựa chọn tốt nhất do chúng đáp ứng được yêu cầu cần thiết cho băng vết thương lý tưởng. Nhược điểm duy nhất của hydrogel ở trạng thái trương nở là nó có độ ổn định cơ học thấp. Hạn chế này đã được giải quyết bằng cách sử dụng hệ màng hydrogel hỗn hợp, bao gồm nhiều hơn một polymer trong thành phần băng [2]. Hydrogel giống với mô tự nhiên hơn bất kỳ loại vật liệu sinh học tổng hợp nào khác, do hàm lượng nước cao, độ mềm tương tự như mô tự nhiên, có tính tương thích sinh học [3], mang lại cảm giác mát và giảm đau cho vết thương.

Các polymer thân nước tự nhiên và tổng hợp có thể liên kết chéo về mặt vật lý hoặc hóa học để tạo ra hydrogel cho ứng dụng băng vết thương [4]. Các phương pháp liên kết chéo vật lý, chẳng hạn liên kết hydro, liên kết Van Der Waals hoặc chu kỳ F-T liên tiếp là phương pháp liên kết chéo an toàn nhất để tạo ra hydrogel cho băng vết thương, do những phương pháp này tránh được việc sử dụng dung môi hữu cơ và thuốc thử hóa học có nguy cơ độc hại, khó loại bỏ khỏi sản phẩm... [2].

PVA có thể tạo hydrogel bền vững bằng các chu kỳ F-T lặp đi lặp lại, do sự hình thành tinh thể có vai trò như những liên kết chéo

vật lý [5]. CS là một chất đồng trùng hợp của các đơn vị glucosamin và N-acetyl glucosamin được liên kết bởi 1,4-glucosidic, nó được tạo ra bằng cách deacetyl hóa một phần chitin [6]. CS được coi là chất tạo băng vết thương phổ biến, có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, chống lại các tác nhân từ môi trường, tính chất kết dính và khả năng thấm oxy rất tốt [2]. Hydrogel hỗn hợp PVA/CS đã tăng cường đáng kể các hoạt động sinh học so với hydrogel chỉ bao gồm PVA [6]. Dầu dừa đã được chứng minh là có rất nhiều giá trị trong y học, VCO có nhiều đặc tính hỗ trợ cho việc làm lành vết thương ngoài da như hoạt tính kháng khuẩn, tác dụng kháng virus, kháng nấm, hiệu quả trong chăm sóc và dưỡng ẩm da [7], chúng có thể được điều chế ở dạng nhũ tương và liposom mà vẫn giữ được các đặc tính kháng khuẩn.

Tại Việt Nam, vật liệu hydrogel đã và đang thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học, đặc biệt trong nông nghiệp, tuy nhiên nghiên cứu ứng dụng của hydrogel trong y sinh tại Việt Nam hiện vẫn còn rất non trẻ [8]. Có nhiều nghiên cứu trên thế giới và một số nghiên cứu ở Việt Nam đã điều chế hydrogel chứa PVA, CS và kết hợp thêm các thành phần khác nhau như minocyclin [9], oxytetracyclin [10]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về hydrogel chứa các loại dầu tự nhiên còn hạn chế, trong đó hydrogel PVA/CS/VCO chưa được nghiên cứu. Vì thế nghiên cứu này được thực hiện với mong muốn tạo được màng hydrogel có tính chất phù hợp, khả năng kháng khuẩn tốt, an toàn và mang đến sự thoải mái cho người bệnh, giúp đẩy nhanh tốc độ làm lành vết thương.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

PVA 1750±50 (độ thủy phân ≥99%) được cung cấp bởi Công ty Shanghai Zhanyun Chemical (Trung Quốc). PVA 217 (độ thủy phân

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

Preparation of hydrogel containing chitosan and virgin coconut oil using the freeze-thawing method

Xuan Truong Le, Van Thanh Tran*, Kim Nghi Hoang

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, 41 Dinh Tien Hoang Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 22 March 2021; revised 13 April 2021; accepted 19 April 2021

Abstract:

This study aimed to formulate a hydrogel membrane containing chitosan (CS) and virgin coconut oil (VCO) using repeated cycles of freezing and thawing (F-T) for wound dressing applications. This study evaluated the effects of degree of hydrolysis of polyvinyl alcohol (PVA), solution concentration and thickness, number of F-T cycles, CS proportion on the sensory properties, swelling ratio, and gel fraction of hydrogels. The antibacterial ability of PVA/CS/VCO membrane against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* was evaluated by disk diffusion method. The results showed that PVA with a high degree of hydrolysis (over 99%) easily generated hydrogel after several F-T cycles. The thicker the hydrogel membrane or the higher the concentration of PVA solution was, the lower the flexibility, elasticity, swelling ratio was, and the higher the gel fraction was. The formula including 10% PVA solution, the ratio of CS to PVA is 40%, 5% w/w VCO, through 3 F-T cycles created hydrogel with suitable properties and good antibacterial activity.

Keywords: chitosan, hydrogel, polyvinyl alcohol, virgin coconut oil.

Classification number: 3.4

87-89%) có nguồn gốc từ Singapore. CS (độ nhớt thấp hơn 20 cps, 96,6% deacetyl hóa) được cung cấp bởi Công ty Chitoworld (Việt Nam). VCO lấy từ Công ty Chế biến dừa Lương Quới (Việt Nam).

2.2. Phương pháp điều chế hydrogel

Bột PVA được cho từ từ vào nước cất ở 90-100°C để tạo thành các dung dịch PVA có nồng độ 7-15% (kl/kl), tiếp tục khuấy 1 giờ ở 90-100°C để PVA tan hoàn toàn. Nếu có bọt khí, giữ yên qua đêm để loại bỏ. Sau đó lượng dung dịch nhất định được đổ ra đĩa petri đường kính 80 mm với độ dày khác nhau (1, 2 và 3 mm). Các đĩa petri này được đông lạnh ở -20°C trong 18 giờ và rã đông ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ (tổng thời gian 24 giờ cho 2 giai đoạn này được gọi là 1 chu kỳ), quá trình này được lặp lại 1 đến 7 lần (chu kỳ) [9].

Hydrogel PVA/CS được điều chế tương tự, dung dịch CS 4% (kl/kl) được chuẩn bị trong dung dịch acid acetic 2% (kl/kl), sau đó các dung dịch có tỷ lệ khối lượng giữa CS và PVA khác nhau (khối lượng CS bằng 0, 5, 10, 20, 30, 40 và 50% so với khối lượng PVA) được trộn bằng cách khuấy từ trong 1 giờ.

Với hydrogel PVA/CS/VCO, phối hợp dầu dừa với tỷ lệ 5% (kl/kl) vào dung dịch PVA/CS, khuấy trong 15 phút để tạo nhũ tương, sau đó tiếp tục như trên.

2.3. Phương pháp xác định phân gel (Gel fraction - GF%)

Các miếng hydrogel thu được sau chu kỳ F-T cuối cùng được cắt thành miếng 2×2 cm, làm khô trong tủ sấy ở 60°C trong 24 giờ và cân (Wo), sau đó chúng được ngâm trong 50 ml nước cất trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng cho đến khi cân bằng khối lượng (Ws) để loại bỏ các phần có thể rò rỉ hoặc hòa tan. Các miếng hydrogel sau đó được làm khô ở 60°C trong tủ sấy trong 24 giờ và cân lại (We). Phân gel (GF%) được tính như sau [11, 12]:

$$GF\% = \frac{We}{Wo} \times 100\%$$

2.4. Phương pháp xác định độ trương nở (Swelling ratio - SR%)

Để đo độ trương nở của hydrogel, các mẫu được cắt thành các miếng 2×2 cm và sấy khô ở 60°C trong tủ sấy trong 24 giờ cho đến khối lượng không đổi (Wa). Các mẫu khô được ngâm trong 50 ml nước cất, duy trì ở 37°C, sau đó đem cân khối lượng (Ws) ở các khoảng thời gian cụ thể (5 phút đến 72 giờ). Sự hấp thụ nước hay tỷ lệ trương nở được tính như sau [10, 12]:

$$SR\% = \frac{Ws}{Wa} \times 100\%$$

Mỗi thử nghiệm được thực hiện 3 lần, lấy kết quả trung bình.

2.5. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế vi sinh vật

Hydrogel được kiểm tra khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, môi trường thử nghiệm là thạch Mueller-Hinton, với 4 loại vi sinh vật *S. aureus* nhạy methicillin (MSSA), *S. aureus* kháng methicillin (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* và *Candida albicans*. Cắt hydrogel thành miếng có cạnh 10 mm và để lên bề mặt thạch, sau đó ủ hộp thạch trong tủ ấm ở 35-37°C trong 24 giờ với vi khuẩn và 48 giờ với vi nấm.

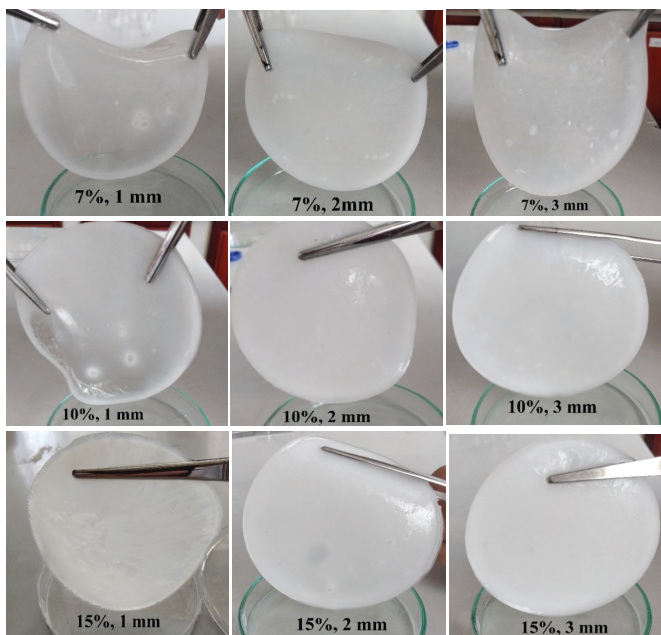
Đọc kết quả: Lấy đĩa petri ra và để lên nền đen không phản quang, xác định đường kính vòng kháng khuẩn (được định nghĩa là đường đi xuyên qua tâm của miếng hydrogel đến mép của khóm vi khuẩn hoặc khóm nấm). Hydrogel được xem là có tính kháng khuẩn khi quan sát rõ đường kính này, và đường kính này càng lớn thì hydrogel có hoạt tính kháng khuẩn càng mạnh.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của độ thủy phân của PVA đến sự hình thành hydrogel

PVA với các độ thủy phân khác nhau được khảo sát trong nghiên cứu này. PVA 217 (độ thủy phân 87-89%) không thể tạo hydrogel ngay cả với nồng độ dung dịch PVA cao (15%) và 7 chu kỳ F-T, sau khi rã đông chúng vẫn ở trạng thái lỏng. Trong khi đó

PVA 1750±50 (độ thủy phân ≥99%) đã có thể tạo hydrogel ngay cả với nồng độ thấp (7%) sau 1 chu kỳ F-T, mặc dù nó không thực sự ổn định. Với dung dịch PVA 1750±50 có nồng độ 7%, hydrogel tương đối ổn định được tạo ra sau 3 chu kỳ F-T (hình 1). Điều này chứng tỏ rằng mức độ thủy phân của PVA ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo hydrogel bằng chu kỳ F-T, trong đó mức độ thủy phân càng lớn thì khả năng tạo hydrogel càng tốt. Điều này cũng được khẳng định bởi các nhà khoa học, theo đó sự hiện diện của các nhóm acetat cồng kềnh có thể ức chế sự hình thành hydrogel [5]. Đồng thời, F. Yokoyama và cs (1986) [13] cũng có kết luận, sự tạo thành hydrogel rất nhạy cảm với mức độ thủy phân, do tính lỏng lẻo và khả năng chống thấm nước thấp của các nhóm acetyl ngăn cản sự hình thành và phát triển các tinh thể PVA trong môi trường nước. Với PVA có độ thủy phân 98,7%, cần tới hơn 20 chu kỳ F-T mới hình thành được cấu trúc xốp của hydrogel [13].



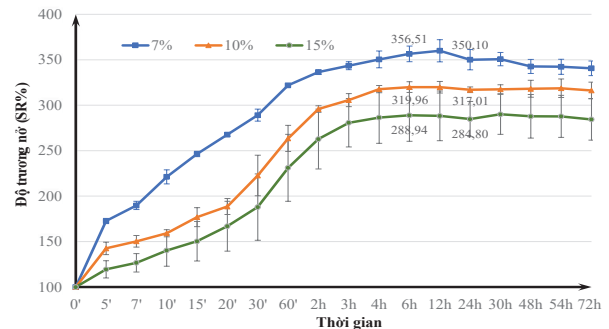
Hình 1. Hydrogel từ PVA 1750±50 với nồng độ và độ dày dung dịch khác nhau.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ và độ dày lớp dung dịch PVA đến tính chất hydrogel

Các hydrogel từ PVA 1750±50 với các nồng độ 7, 10 và 15%, độ dày lớp dung dịch trong đĩa petri là 1, 2 và 3 mm được tạo ra sau 3 chu kỳ F-T (hình 1).

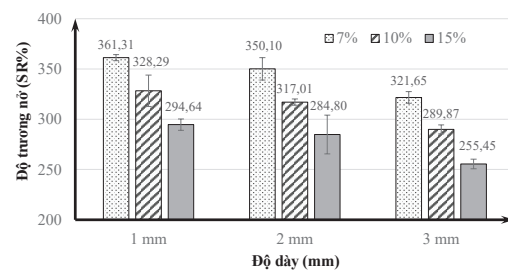
Ở độ dày 1 mm, các hydrogel thu được rất mỏng, mềm, quá linh động, khó cầm nắm cố định. Với độ dày 2 mm thì hydrogel dày hơn, nhờ đó ổn định, ít linh động hơn và dễ cầm được trên tay, nhưng khi độ dày lên đến 3 mm thì chúng lại quá dày, cứng. Tính mềm dẻo, linh hoạt cũng giảm dần theo thứ tự nồng độ 7, 10 và 15%, tức là nồng độ dung dịch tăng thì hydrogel thu được càng cứng và kém linh động hơn, đồng thời độ đàn hồi giảm dần, độ bền tăng dần. Nguyên nhân là mức độ kết tinh tăng lên khi nồng độ PVA tăng lên, do tăng sự chồng chéo và thúc đẩy sự gấp khúc của các chuỗi PVA [14].

Động học trương nở của 3 hydrogel từ dung dịch PVA 7, 10 và 15% với độ dày 2 mm được tạo ra sau 3 chu kỳ F-T được thể hiện trong hình 2. Đồ thị cho thấy các mẫu trương nở tương tự nhau, chúng đều nhanh chóng hấp thu nước và sau 6 giờ đã đạt đến độ trương nở cân bằng khá tốt (từ 280 đến 350%). Nồng độ dung dịch PVA càng cao, hydrogel có độ trương nở càng thấp.

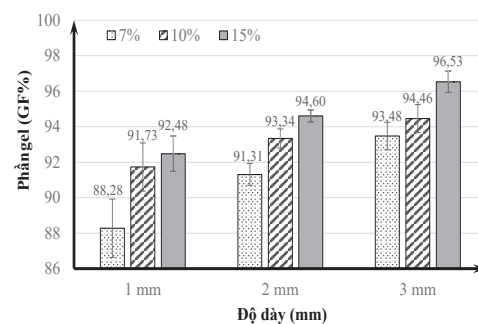


Hình 2. Động học trương nở của hydrogel từ dung dịch PVA ở nồng độ 7, 10 và 15%.

Hình 3 và 4 cho thấy, độ trương nở cân bằng (là độ trương nở tối đa và gần như không thay đổi khi tiếp tục ngâm, quy ước lấy ở thời điểm 24 giờ) và phần gel của các hydrogel từ các dung dịch có nồng độ và độ dày khác nhau. Nhìn chung, độ trương nở tỷ lệ nghịch, còn phần gel tỷ lệ thuận với nồng độ và độ dày lớp dung dịch PVA. Sau 3 chu kỳ, các mẫu đều tạo được hydrogel có phần gel lớn (trên 88%) cho thấy sự liên kết chéo hiệu quả ngay khi nồng độ thấp hay lớp dung dịch mỏng.



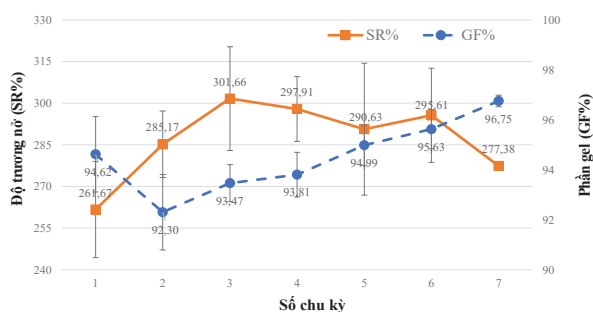
Hình 3. Độ trương nở cân bằng của hydrogel từ dung dịch PVA ở nồng độ 7, 10 và 15% với độ dày 1, 2 và 3 mm sau 3 chu kỳ F-T.



Hình 4. Phần gel của hydrogel từ dung dịch PVA ở nồng độ 7, 10 và 15% với độ dày 1, 2 và 3 mm sau 3 chu kỳ F-T.

3.3. Số chu kỳ F-T và tính chất của hydrogel

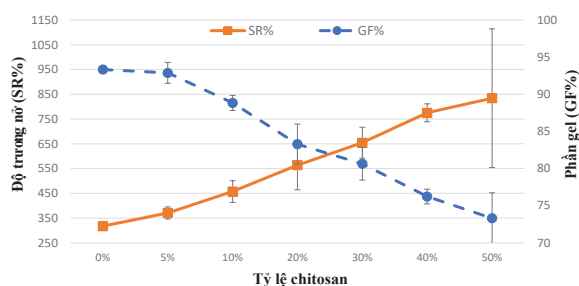
Từ các kết quả trên nhận thấy, hydrogel thu được từ dung dịch PVA có nồng độ 10% với chiều dày 2 mm có các tính chất cảm quan, phần gel, độ trương nở phù hợp, do đó chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của số chu kỳ F-T lên tính chất hydrogel dựa trên mẫu này. Các hydrogel được tạo ra sau 1-7 chu kỳ F-T có độ trương nở và phần gel như ở hình 5. PVA có thể tạo được hydrogel chỉ với 1 chu kỳ F-T, nhưng hydrogel thu được quá dẻo, dính, tính chất cơ học không phù hợp để đắp lên vết thương. Khi số chu kỳ tăng, phần gel tăng lên do tăng số lượng các tinh thể đóng vai trò như các điểm liên kết chéo, làm cho mạng lưới bền vững, chặt chẽ hơn [14]. Từ chu kỳ thứ 3 trở đi, nhìn chung tăng số chu kỳ thì độ trương nở giảm, các hydrogel liên kết chéo ít chặt chẽ có xu hướng cho thấy khả năng hấp thụ nước cao hơn. Tuy nhiên, khác biệt về độ trương nở của 3, 4, 5 và 6 chu kỳ là không đáng kể. Vì vậy, chọn số chu kỳ là 3 để vừa có lợi về thời gian, vừa đảm bảo tính chất phù hợp của hydrogel.



Hình 5. Ảnh hưởng của số chu kỳ F-T đến độ trương nở cân bằng và phần gel.

3.4. Hydrogel PVA/CS

Khi phối hợp thêm CS, hydrogel vẫn được tạo ra sau 3 chu kỳ F-T. Khi tỷ lệ CS càng cao, hydrogel thu được càng mềm dẻo, linh hoạt, nhưng khi tỷ lệ lên đến 50% chúng trở nên quá dẻo và khó cầm nắm cố định. Độ trương nở và phần gel của PVA/CS được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ CS đến độ trương nở cân bằng và phần gel của hydrogel PVA/CS.

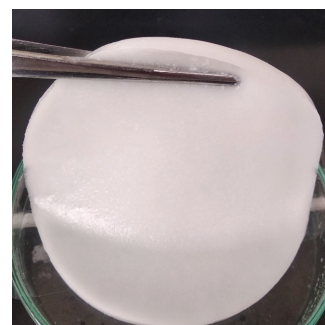
Dễ dàng nhận thấy, khi có mặt CS, hydrogel thu được có độ trương nở tăng, phần gel giảm so với hydrogel chỉ chứa PVA và tỷ lệ CS càng cao thì độ trương nở càng lớn, phần gel càng thấp. Điều này là do sự có mặt của CS làm giảm liên kết chéo của các chuỗi polymer, mặc dù CS có thể liên kết chéo với PVA

nhưng độ bền liên kết chéo của CS yếu hơn PVA [9]. Khi chỉ có PVA (0% CS), hydrogel cấu trúc liên kết chéo cao đã được thu và cấu trúc này có khả năng trương nở thấp, khoảng 320%. Sau khi tăng hàm lượng CS lên 50%, độ trương nở tăng lên đến 850%, do hàm lượng CS cao làm tăng tính thấm ướt và tính ưa nước của hydrogel.

Từ các kết quả trên nhận thấy, hydrogel thu được từ dung dịch có tỷ lệ CS/PVA là 40% có các tính chất cảm quan (độ linh hoạt, mềm dẻo vừa phải, không quá mềm), phần gel cao (trên 75%), độ trương nở tốt (tối đa 780%). Ngoài ra, tỷ lệ CS khá cao sẽ đảm bảo cho hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của màng. Tuy nhiên màng hydrogel PVA/CS có tính dính cao, khả năng giữ ẩm kém, nhanh chóng bị khô khi tiếp xúc với không khí. Vì vậy, chúng tôi chọn tỷ lệ CS/PVA là 40% cho nghiên cứu tiếp theo.

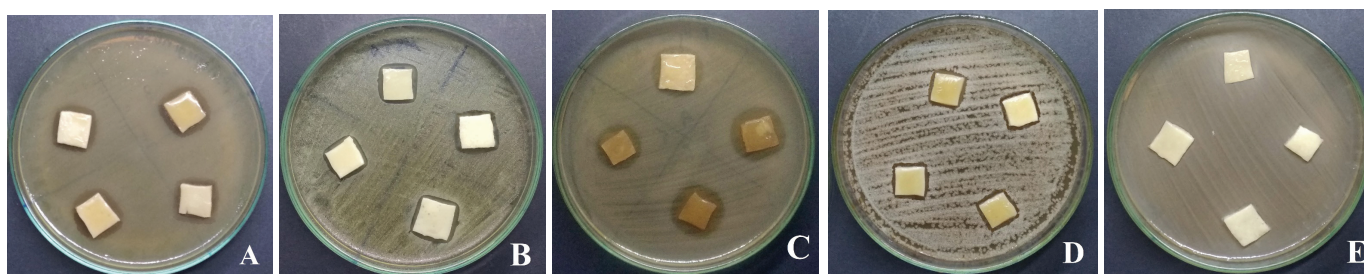
3.5. Hydrogel PVA/CS/VCO

Khi có mặt dầu dừa với tỷ lệ 5% (kl/kl), hydrogel vẫn được tạo ra. Màng hydrogel thu được (hình 7) cho thấy tính đồng nhất, không có vết nứt, không có dấu hiệu của sự tách pha trên bề mặt hydrogel và mềm dẻo, không dính. Hydrogel màu trắng đục, có mùi dầu dừa nhẹ và không có bọt khí trên bề mặt. Cấu trúc đồng nhất này cho thấy sự tương thích tốt giữa các thành phần.



Hình 7. Hydrogel PVA/CS/VCO sau 3 chu kỳ F-T.

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn được thể hiện ở hình 8. *MRSA*, *MSSA*, *P. aeruginosa* và *C. albicans* là những vi sinh vật thường thấy trong vết thương bị nhiễm trùng [15, 16]. Hydrogel chỉ chứa PVA (hình 8E, nhóm chứng) không có hoạt tính kháng khuẩn do không quan sát được bất kỳ vòng ức chế nào xung quanh miếng hydrogel, trong khi đó hydrogel PVA/CS/VCO cho thấy các vòng kháng khuẩn có đường kính khá lớn, do đó nó ức chế tốt cả 4 loài vi sinh vật nêu trên. Điều đó là nhờ hoạt tính ức chế vi sinh vật của dầu dừa và của CS trong môi trường acid loãng. CS có nhiều ưu điểm như phổ kháng khuẩn rộng hơn, hoạt tính kháng khuẩn cao hơn và độc tính đối với tế bào động vật thấp hơn so với các chất kháng khuẩn khác. Tính chất này liên quan đến điện tích dương của CS do các nhóm amin proton hóa trong môi trường acid yếu [17]. Một cơ chế được đề xuất để giải thích cho hoạt tính kháng khuẩn là tương tác giữa các điện tích dương của CS trong môi trường acid và điện tích âm của màng tế bào vi sinh vật làm cho protein và các thành phần của tế bào bị rò rỉ [18].



Hình 8. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của hydrogel PVA/CS/VCO trên MRSA (A), MSSA (B), *P. aeruginosa* (C), *C. albicans* (D) và của hydrogel chỉ chứa PVA trên MRSA (E - nhóm chứng).

4. Kết luận

Bằng chu kỳ F-T, các hydrogel PVA, PVA/CS và PVA/CS/VCO đã được tạo ra thành công. Độ thủy phân của PVA, nồng độ và độ dày lớp dung dịch, số chu kỳ F-T đều có ảnh hưởng lớn đến tính chất, độ trương nở và phân gel của hydrogel tạo ra. Từ PVA có độ thủy phân trên 99%, nồng độ dung dịch 10%, tỷ lệ CS/PVA là 40%, 5% VCO, sau 3 chu kỳ F-T, mỗi chu kỳ đông lạnh 18 giờ ở -20°C và rã đông 6 giờ ở nhiệt độ phòng, đã hình thành hydrogel có tính chất cơ học phù hợp, hoạt tính kháng khuẩn tốt chống lại MRSA, MSSA, *P. aeruginosa* và *C. albicans*. Màng hydrogel này sẽ là một ứng viên cho một băng vết thương tiềm năng để thúc đẩy quá trình lành vết thương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N.E. Stevens, et al. (2008), "Wound healing dressings and drug delivery systems: A review", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**, pp.2892-2923, DOI: 10.1002/jps.21210.

[2] E.A. Kamoun, E.R.S. Kenawy, X. Chen (2017), "A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings", *Journal of Advanced Research*, **8**(3), pp.217-233, DOI: 10.1016/j.jare.2017.01.005.

[3] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, et al. (2000), "Hydrogels in pharmaceutical formulations", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, pp.27-46, DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4.

[4] E. Caló, V.V. Khutoryanskiy (2015), "Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products", *European Polymer Journal*, **65**, pp.252-267, DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.

[5] C.M. Hassan, N.A. Peppas (2000a), "Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods", *Biopolymers PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*, Springer, pp.37-65, DOI: 10.1007/3-540-46414-X_2.

[6] E.A. Kamoun, X. Chen, M.S.M. Eldin, et al. (2015a), "Crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers", *Arabian Journal of Chemistry*, **8**, pp.1-14, DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.07.005.

[7] M. DebMandal, S. Mandal (2011), "Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **4**, pp.241-247, DOI: 10.1016/S1995-7645(11)60078-3.

[8] V.V. Phuoc, P.T.D. Trinh, N.C. Thien (2019), "Hydrogel materials - properties and potential biomedical applications", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **61**(11B), pp.62-68 (in Vietnamese).

[9] J.H. Sung, M.R. Hwang, J.O. Kim, et al. (2010), "Gel characterisation and *in vivo* evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan", *International Journal of Pharmaceutics*, **392**, pp.232-240, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.024.

[10] F. Lotfipour, M.A. Milani, S. Salatin, et al. (2019), "Freeze-thaw-induced cross-linked PVA/chitosan for oxytetracycline-loaded wound dressing: The experimental design and optimization", *Research in Pharmaceutical Sciences*, **14**, pp.175-189, DOI: 10.4103/1735-5362.253365.

[11] J.O. Kim, J.K. Park, J.H. Kim, et al. (2008), "Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone", *International Journal of Pharmaceutics*, **359**, pp.79-86, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.03.021.

[12] E.A. Kamoun, E.R.S. Kenawy, T.M. Tamer, et al. (2015b), "Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: characterization and bio-evaluation", *Arabian Journal of Chemistry*, **8**, pp.38-47, DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.12.003.

[13] F. Yokoyama, I. Masada, K. Shimamura, et al. (1986), "Morphology and structure of highly elastic poly (vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting", *Colloid and Polymer Science*, **264**, pp.595-601, DOI: 10.1007/BF01412597.

[14] C.M. Hassan, N.A. Peppas (2000b), "Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels", *Macromolecules*, **33**, pp.2472-2479, DOI: 10.1021/ma9907587.

[15] S. Noori, M. Kokabi, Z.M. Hassan (2018), "Poly (vinyl alcohol)/chitosan/honey/clay responsive nanocomposite hydrogel wound dressing", *Journal of Applied Polymer Science*, **135**, DOI: 10.1002/app.46311.

[16] A. Basu, K. Heitz, M. Strømme, et al. (2001), "Wound microbiology and associated approaches to wound management", *Clinical Microbiology Reviews*, **14**, pp.244-269, DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.10.085.

[17] A.M.A. Mohsen, A.S. Aly, R. Hrdina, et al. (2011), "Eco-synthesis of PVA/chitosan hydrogels for biomedical application", *Journal of Polymers and The Environment*, **19**, pp.1005-1012, DOI: 10.1007/s10924-011-0334-0.

[18] E.I. Rabea, M.E.T. Badawy, C.V. Stevens, et al. (2003), "Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action", *Biomacromolecules*, **4**, pp.1457-1465, DOI: 10.1021/bm034130m.

Mô tả đặc tính hình thái và sinh học của một số dòng lúa cỏ phổ biến vùng Đồng bằng sông Cửu Long

Nguyễn Thế Cường¹, Đồng Thanh Liêm¹, Viên Phúc Đạt¹, Nguyễn Văn Tuấn Anh¹, Hồ Lệ Thi^{2*}

¹Trung tâm Ứng dụng Công nghệ Sinh học và Nông nghiệp Công nghệ cao, Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long, xã Tân Thạnh, huyện Thới Lai, TP Cần Thơ, Việt Nam

²Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ, khu II, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 30/5/2022, ngày chuyển phản biện 2/6/2022, ngày nhận phản biện 20/6/2022, ngày chấp nhận đăng 24/6/2022

Tóm tắt:

Xu hướng thâm canh tăng vụ, cơ giới hóa, sử dụng giống kém chất lượng và chuyển đổi biện pháp canh tác lúa từ phương pháp cấy sang sạ thẳng nhằm đáp ứng an ninh lương thực và xuất khẩu là những nguyên nhân làm lây lan dịch hại lúa cỏ (*Oryza sativa* f. *spontanea*) ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) trong những năm gần đây. Nghiên cứu và khảo sát các đặc tính nông học, hình thái, sinh lý giúp nhận dạng, phân tích và phân biệt lúa cỏ trên thực tế đồng ruộng là việc làm hết sức cấp thiết. Trong tổng số 28 dòng lúa cỏ được trồng, chọn lọc và quan sát từ 248 mẫu lúa cỏ thu thập tại các vùng sản xuất lúa chính ở ĐBSCL, có 12 dòng lúa cỏ với những đặc điểm hình thái và sinh học khác biệt nhau, có thể phân biệt giữa các dòng lúa cỏ và lúa trồng như: thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, màu sắc và hình dạng lá, màu sắc và dạng thân, hạt có râu/đuôi, màu sắc vỏ trấu, chiều dài hạt, màu vỏ lụa. Những đặc điểm chính này có thể được sử dụng để phân biệt và nhận dạng các dòng lúa cỏ với các giống lúa trồng ở những giai đoạn sinh trưởng khác nhau trên đồng ruộng. Tuy nhiên, có một số dòng lúa cỏ có những đặc điểm hình thái và sinh học quan trọng tương tự lúa trồng như: thời gian sinh trưởng ngắn hoặc tương đương, chiều cao cây thấp hơn hoặc tương đương, có màu vỏ trấu và dạng hạt giống nhau. Những dòng lúa cỏ này sẽ rất khó phân biệt trên đồng ruộng dẫn đến có khả năng trở nên phổ biến và khó kiểm soát trong sản xuất lúa ở ĐBSCL.

Từ khóa: cỏ dại, dịch hại trên lúa, hình thái, lúa cỏ, lúa đỏ.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Lúa cỏ được xem là cỏ dại xung quanh khu vực trồng trọt và là cây không mong muốn của chi *Oryza*. Lúa cỏ gây hại, cạnh tranh với lúa trồng và các cây trồng khác [1]. Ngoài ra, lúa cỏ còn được gọi là “lúa đỏ” do hạt gạo có lớp vỏ lụa mang màu đỏ đặc trưng. Tuy nhiên, ngoài các dạng hạt có màu đỏ, người ta cũng tìm thấy các loại lúa cỏ có hạt mang vỏ lụa màu trắng, đỏ nhạt và xanh nhạt [2]. Do đó, tên gọi lúa cỏ mang tính bao quát và thích hợp hơn lúa đỏ [3]. Các đặc trưng của lúa cỏ là chiều cao lớn hơn, dễ đổ ngã, hạt ngũ đồng mạnh và thường có lớp vỏ lụa mang sắc tố đỏ, nâu, xanh nhạt... Các đặc điểm giống với cỏ dại được ghi nhận ở đa số lúa cỏ là khả năng rụng hạt khá sớm và rất dễ rụng hạt so với lúa trồng, dẫn đến tích lũy một lượng lớn hạt lúa cỏ trong đất. Các hạt lúa cỏ này có hoặc không có tính miên trạng, sức sống vượt trội so với lúa trồng, từ đó làm ảnh hưởng và gây hại cho các vụ mùa tiếp theo. Trong một tuần ở nhiệt độ mát (25°C) hoặc ấm (30°C), lúa cỏ sẽ nảy mầm nhanh hơn và phát triển rễ dài hơn so với các giống lúa trồng. Lúa cỏ cũng có thể mọc lên từ độ sâu trong đất lớn hơn lúa trồng. Điều này cho thấy sức sống của cây con cao và khả năng cạnh tranh với lúa trồng ngay từ thời điểm đầu vụ [3]. Khả năng phát triển của lúa cỏ trong các điều kiện môi trường nông nghiệp bất lợi như ngập sâu, hạn hán, phèn mặn, cũng như khả năng “bất chước” các đặc điểm thích nghi, sinh tồn giống với lúa trồng, gây khó khăn cho việc kiểm soát, nhận dạng và phòng trừ [1].

Lúa là cây trồng quan trọng nhất ở Việt Nam với diện tích trồng lúa khoảng 7,24 triệu ha trong năm 2021, sản lượng trên

43,88 triệu tấn, xuất khẩu 6,24 triệu tấn; trong đó ĐBSCL chiếm 4,17 triệu ha và sản lượng đạt 25,73 triệu tấn (Tổng cục Thống kê, 2021). Việc gia tăng sự xâm lấn và gây hại của lúa cỏ có liên quan mật thiết đến phương pháp canh tác lúa thâm canh sạ thẳng trong nhiều năm trở lại đây. Ở miền Bắc và miền Trung thì lúa cấy chiếm phần lớn diện tích. Trong khi đó ở miền Nam, đặc biệt là ĐBSCL, diện tích lúa sạ thẳng chiếm tới trên 90% diện tích trồng lúa. Việc duy trì và phát triển diện tích lúa sạ thẳng dẫn đến lúa cỏ lây lan và phát triển mạnh ở ĐBSCL, ảnh hưởng đến chất lượng, sản lượng và thu nhập của người nông dân nói riêng, xuất khẩu lúa gạo của Việt Nam nói chung. Từ những năm 1988-1990, đã có một số nghiên cứu về tính rụng hạt trên lúa nổi và lúa hoang ở An Giang và Đồng Tháp. Tuy nhiên, đến năm 1994 thì thuật ngữ lúa cỏ mới được biết đến từ kết quả điều tra thực nghiệm của Viện Lúa ĐBSCL tại Tiền Giang và Long An trong vụ xuân hè đã phát hiện nhiều dòng lúa cỏ tại đây, trong đó có nhiều dòng dễ rụng hạt, có dòng hạt màu nâu sậm hoặc đen, có dòng có râu trên hạt, đặc biệt nguy hiểm có dòng lúa cỏ tiến hóa về chiều cao ngang bằng với chiều cao của lúa trồng nên khi lúa chín rất khó phân biệt, đồng thời hạt trên bông rất dễ rụng khi sạ vào giai đoạn thu hoạch, gây ảnh hưởng đến năng suất cũng như phẩm chất của lúa trồng [4]. Việc sử dụng hạt giống lẫn tạp hạt lúa cỏ là một trong những nguồn gốc xâm nhiễm và lây lan chính của lúa cỏ ở ĐBSCL [5]. Cho đến nay vẫn chưa có một nghiên cứu cụ thể nào về mô tả hình thái lúa cỏ ở Việt Nam nói chung và ở ĐBSCL nói riêng. Do đó, việc nghiên cứu các đặc tính hình thái và nông học giúp nhận dạng lúa cỏ trên đồng ruộng là rất quan trọng.

*Tác giả liên hệ: Email: hlthi@ctu.edu.vn

Morphology and biological characteristics of some popular weedy rices in the Mekong delta of Vietnam

The Cuong Nguyen¹, Thanh Liem Dong¹,
Phuc Dat Vien¹, Van Tuan Anh Nguyen¹, Le Thi Ho^{2*}

¹Center of Applied Biotechnology and High Technology in Agriculture,
Cuu Long Delta Rice Research Institute, Tan Thanh Commune, Thoi Lai District, Can Tho City, Vietnam

²College of Agriculture, Can Tho University,
Area II, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 30 May 2022; revised 20 June 2022; accepted 24 June 2022

Abstract:

The growing trend of cropping intensification, mechanisation, the use of poor-quality rice seeds, and the shift in rice cultivation methods from transplanting to direct sowing to meet food security and export demand are causes of the emergence and spread of weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) in the Mekong delta in recent years. Therefore, it is necessary to study the agronomic, morphological, and physiological characteristics of collected weedy rice lines to help identify, analyse, and distinguish weedy rice in the rice field. Out of a total of 28 weedy rice lines planted, selected, and observed from 248 weedy rice samples collected in the main rice production areas in the Mekong delta, there are 12 weedy rice lines with one or more morphological and biological characteristics that can distinguish among them and with cultivated rice varieties, such as growing duration, plant height, leaf colour and shape, stem colour and shape, awn or without awn, husk colour, seed length, grain colour. These key characteristics can be used to distinguish and identify weedy rice lines from rice varieties grown at different growth stages in the field. However, some weedy rice lines are sharing major morphological features with the cultivated rice variety such as short or similar growing duration, shorter or similar height, similar husk colour, seed shape. Those weedy rice lines are not easy to identify and eliminate on the rice field, leading to the possibility of becoming widespread and difficult to control in rice production in the Mekong delta.

Keywords: morphology, red rice, rice pests, weeds, weedy rice.

Classification number: 4.1

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu lúa cỏ được thu thập ở 3 vùng sinh thái, gồm vùng đất phù sa, nhiễm phèn và nhiễm mặn trong vụ xuân hè, hè thu và thu đông năm 2020. Địa điểm thu thập mẫu lúa cỏ là các vùng sản xuất lúa tập trung (hình 1). Có tổng số 248 mẫu lúa cỏ được thu thập, ký hiệu là LCCT (lúa cỏ thu thập ở Cần Thơ), LCHG (lúa cỏ thu thập ở Hậu Giang) và LCKG (lúa cỏ thu thập ở Kiên Giang) theo sau

bằng số ký hiệu tên mẫu lúa cỏ thu thập được. Danh sách các dòng lúa cỏ và giống lúa trồng được phân loại sử dụng trong nghiên cứu này gồm: LCKG-2, LCKG-4, LCKG-6, LCKG-7, LCCT-9, LCCT-12, LCCT-14, LCCT-66, LCCT-71, LCCT-84, LCHG-51 và giống lúa trồng phổ biến ở ĐBSCL là OM5451.



Hình 1. Địa điểm thu thập mẫu lúa cỏ (dấu sao màu đỏ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu lúa cỏ sau khi thu thập được bảo quản trong bao giấy được sấy khô và phân loại sơ bộ dựa trên quan sát dạng bông, dạng gié, dạng hạt và màu sắc hạt lúa theo tiêu chuẩn đánh giá của Viện Nghiên cứu Lúa quốc tế (IRRI) [6]. Sau khi phân loại, các mẫu lúa cỏ được trồng trong các bể thí nghiệm có diện tích 2,2x3 m, ở nhà lưới trong vụ đông xuân 2020-2021 của Viện Lúa ĐBSCL để tiếp tục quan sát và chọn lọc ra được 28 dòng lúa cỏ có đặc tính hình thái đặc trưng. Trong đó, có 12 dòng khác biệt rất rõ về hình thái và nông học tiếp tục được trồng trong vụ hè thu 2021 để quan sát, phân tích và phân loại về hình thái. Hạt của 12 dòng lúa cỏ được ngâm ủ và cho mọc mầm trên đĩa petri trong tủ ẩm Daichi có kiểm soát nhiệt độ. Sau khoảng 7 ngày, các cây mạ khô được cấy ra bể thí nghiệm có diện tích 2,2x3 m với khoảng cách 20-25 cm. Thí nghiệm được bố trí tuần tự (10 cây mạ/dòng) không nhắc lại. Quy trình chăm sóc các dòng lúa cỏ tương tự như quy trình chăm sóc giống lúa OM5451, với công thức phân bón: 80:60:30 kg NPK/ha.

Quá trình sinh trưởng và phát triển của các dòng lúa cỏ và giống lúa trồng OM5451 được quan sát và ghi lại từ giai đoạn cây con cho đến khi trưởng thành theo Hệ thống đánh giá tiêu chuẩn cho cây lúa của IRRI [6] và Z.P. Hussain và cs (2010) [7]. Các đặc tính hình thái và nông học được quan sát bằng trực quan, đo đếm và ghi lại khi trong giai đoạn 60-80 ngày sau khi cấy (bảng 1). Số liệu đo đếm được từ các dòng lúa cỏ được tính trung bình và so sánh tương đối với các giống lúa trồng.

Bảng 1. Bảng mô tả các đặc điểm hình thái chính của các dòng lúa cỏ và giống lúa trồng được ghi nhận ở giai đoạn 60-80 ngày sau khi gieo (vụ hè thu 2021).

Chỉ tiêu hình thái chính	Mô tả chi tiết các chỉ tiêu hình thái chính
1. Trưởng thành (thời gian sinh trưởng)	Số ngày từ khi cấy con đến khi chín hạt (85% số hạt trên bông chín)
2. Chiều cao cây	Đo từ mặt đất đến ngọn của bông cao nhất tính từ thân chính (cm)
3. Độ dựng đứng trung gian của thân (=45°)	Dạng góc thân khi tăng trưởng: 1: dựng đứng (<30°); 3: trung gian (45°); >5, 7: mở (>60°)
4. Số chồi / bụi	Đếm số chồi hữu hiệu và không hữu hiệu (không mang bông) trên 1 bụi
5. Số bông / bụi	Đếm số chồi hữu hiệu (mang bông) trên 1 bụi
6. Chiều dài lá đồng	Đo chiều dài phiến lá trên cùng (cm)
7. Hàm lượng diệp lục tố	Đo lá trên cùng/lá đồng ở 70 DAS bằng máy đo chỉ số hàm lượng chlorophyll (SPAD) 502 (đọc 5 lần)
8. Kiểu bông	Các bông được phân loại theo chế độ của góc phân nhánh của các cành sơ cấp và mật độ nhánh: 1: đóng gọn; 5: trung gian; 9: mở
9. Chiều dài bông	Tính từ gốc bông đến ngọn (cm)
10. Đặc tính rụng hạt	Dùng nắm tay vuốt nhẹ bông lúa 1. Rất khó rụng (<1% số hạt), 3. Khó rụng (1-5%), 5. Trung gian (6-25%), 7. Dễ rụng (26-50%), 9. Rất dễ rụng (51-100%)
11. Màu vỏ trấu	Quan sát hạt lúa trưởng thành: 0: màu vàng rom; 1: vàng và vàng rãnh trên nền vàng rom; 2: đốm nâu trên nền vàng rom; 3: rãnh nâu trên vàng rom; 4: nâu (hơi nâu); 5: hơi đỏ đến tím nhạt; 6: tím đốm trên nền vàng rom; 7: vết tím trên vàng rom; 8: tím; 9: đen; 10: trắng.
12. Màu sắc hạt gạo lúc	Quan sát hạt gạo lúc: 1: trắng; 2: nâu nhạt; 3: đốm nâu; 4: nâu đậm; 5: đỏ nhạt; 6: đỏ; 7: đốm tím; 8: tím; 9: tím đậm hoặc đen.
13. Chiều dài hạt thóc	Đo khoảng cách từ đế hạt đến đầu hạt (mm) bằng thước chuyên dụng
14. Chiều rộng hạt thóc	Đo bề rộng hạt (mm) bằng thước chuyên dụng
15. Chiều dài râu	Đo trên 5 hạt (mm)
16. Khối lượng 1000 hạt (g)	Được đo bằng cách sử dụng 1000 hạt trưởng thành

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm hình thái chung của các dòng lúa cỏ

Lúa cỏ là loại cây hàng niên, không mong muốn và có cùng họ hàng với lúa trồng, với tên khoa học là *Oryza sativa* f. *spontanea*. Tương tự như lúa trồng, lúa cỏ rất đa dạng về hình thái và xuất hiện ở tất cả các vùng trồng lúa chính trên thế giới, như châu Á, châu Mỹ, châu Phi, châu Âu (bảng 2).

Bảng 2. Tên khoa học và phân loại lúa cỏ.

Tên khoa học	<i>Oryza sativa</i> f. <i>spontanea</i>
Tên tiếng Việt	Lúa cỏ
Tên tiếng Anh	Weedy rice/red rice
Giới (Kingdom)	Plantae
Ngành (Phylum)	–
Lớp (Clade)	Tracheophytes Angiosperms Monocots Commelinids
Bộ (Order)	Poales
Họ (Families)	Poaceae
Chi (Genus)	<i>Oryza</i>
Loài (Species)	<i>Oryza sativa</i>
Loài phụ (Sub-Species)	<i>Oryza sativa</i> f. <i>spontanea</i>
Tên khoa học (Scientific name)	<i>Oryza sativa</i> f. <i>spontanea</i>

Bảng 3. Biến động một số đặc tính nông học của 12 dòng lúa cỏ thu thập so với giống lúa trồng phổ biến OM5451.

Đặc tính sinh học	Lúa cỏ					OM5451
	Trung bình	Cao nhất	Thấp nhất	Sai số chuẩn	Độ lệch chuẩn	
Thời gian sinh trưởng (ngày)	95	106	89	0,9	4,9	106
Chiều cao cây (cm)	106,0	150	70	4,4	23,3	104,0
Chiều dài lá đồng (cm)	35,2	49,8	22,3	1,1	6,0	32,3
Diệp lục tố (SPAD)	40,1	46,3	31,3	0,8	4,0	42,3
Số bông/bụi	16	28	9	1,0	5,1	9
Chiều dài bông (cm)	23,7	29,8	16,7	0,5	2,7	25,8
KL 1000 hạt (g)	21,6	33,5	16,7	0,7	3,9	27,1
Chiều dài hạt lúa (mm)	8,7	9,9	7,6	0,1	0,6	9,96
Chiều rộng hạt lúa (mm)	2,36	2,78	1,79	0,004	0,123	2,12
Chiều dài râu (mm)	15,8	70,0	0,0	3,7	19,8	-
Tổng số hạt/bông	134	194	76	7	34	146
Tổng hạt chắc/bông	106	169	68	5	27	105
Tổng số hạt lép/bông	27	69	5	3	16	42

Kết quả bảng 3 cho thấy:

- Thời gian sinh trưởng: Lúa cỏ có thời gian sinh trưởng trung bình khoảng 95 ngày sau khi cấy, tuy nhiên thời gian sinh trưởng này biến động khá lớn trong các dòng lúa cỏ biến động 89-106 ngày. Phần lớn các dòng thu thập có thời gian sinh trưởng tương đương hoặc chín sớm hơn lúa trồng OM5451 (cây 106 ngày). Đặc tính này của các dòng lúa cỏ ở ĐBSCL tương tự với phát hiện trong nghiên cứu của M. Reagon và cs (2011) [8].

- Chiều cao cây: Các dòng lúa cỏ có chiều cao cây biến động lớn, trung bình 106,0 cm, cao hơn không đáng kể so với chiều cao trung bình giống lúa OM5451 (104,0 cm). Phần lớn các dòng lúa cỏ có chiều cao cây trung bình cao hơn giống lúa trồng OM5451, tuy nhiên có một số dòng lúa cỏ có chiều cao trung bình ngang bằng hoặc thấp hơn. Nghiên cứu của Duong Van Chin và cs (1999) [5] cho thấy các dòng lúa cỏ có chiều cao cây cao hơn giống lúa trồng. Đặc tính này cho thấy lúa cỏ có xu hướng tiến hóa, thích ứng với điều kiện biến đổi khí hậu và môi trường canh tác lúa ở ĐBSCL.

- Hình dạng lá đồng: Một số dòng lúa cỏ có lá rất dài, nhưng lại hẹp về bề ngang và mỏng. Có thể quan sát và phân biệt các dòng lúa cỏ có lá đồng mỏng, dài và hẹp ở giai đoạn sinh trưởng dinh dưỡng. Chiều dài lá đồng của lúa cỏ trung bình là 35,2 cm, dài nhất là 49,8 cm và ngắn nhất là 22,3 cm. Chiều dài lá đồng của OM5451 khoảng 32,3 cm.

- Màu sắc lá lúa: Trong giai đoạn sinh trưởng dinh dưỡng, lá của một số dòng lúa cỏ có màu nhạt hơn lúa trồng, người nông dân có thể phân biệt được giữa lúa cỏ và lúa trồng rất sớm. Diệp lục tố trung bình của các dòng lúa cỏ là 40,1 thấp hơn so với giống lúa trồng OM5451 là 42,3 (n=10) (hình 2).

- Khả năng đẻ nhánh: Các dòng lúa cỏ có khả năng đẻ nhánh rất mạnh so với lúa trồng. Khả năng đẻ nhánh trung bình của các dòng lúa cỏ là 16 bông/bụi so với 9 bông/bụi của giống OM5451. Số nhánh thấp nhất là 9 bông/bụi và cao nhất là 28 bông/bụi. Khả năng đẻ nhánh mạnh của lúa cỏ làm cho chúng có ưu thế hơn trong

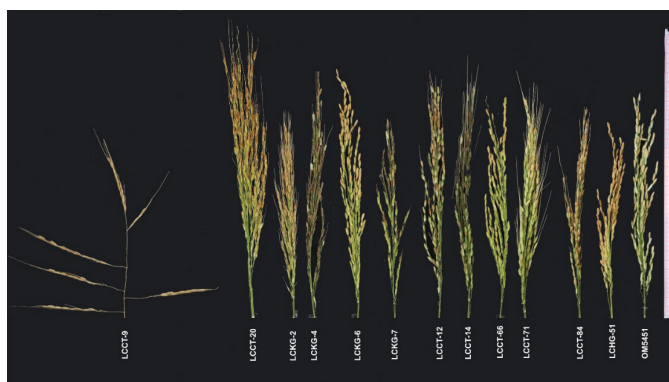
việc cạnh tranh không gian ánh sáng, nước và dinh dưỡng trong ruộng lúa.



Hình 2. Hình dạng lá đồng của một số dòng lúa cỏ tiêu biểu và giống lúa trồng OM5451.

- Hình dạng và màu sắc hạt lúa: Hạt lúa trồng OM5451 thon dài, tỷ lệ dài/rộng lớn hơn 3, màu sắc hạt lúa là vàng rom, gạo lứt màu trắng, khối lượng 1000 hạt lúa biến động từ 25 đến 27 g. Trong khi đó, hình dạng hạt lúa cỏ của các dòng thu thập rất đa dạng: tròn, dài trung bình và dài. Màu sắc hạt lúa cỏ cũng có nhiều dạng như đen, vàng, nâu đen, đôi khi trên cùng một bông lúa cũng có nhiều hạt với những màu sắc khác nhau. Gạo lứt có màu đỏ, nâu đỏ hoặc trắng giống như lúa trồng. Khối lượng 1.000 hạt của các dòng lúa cỏ biến động 16,7-33,5 g do một số dòng chín sinh lý rất sớm và rụng.

- Dạng bông và râu/đuôi trên hạt lúa: Các dòng lúa cỏ rất đa dạng về dạng bông và dạng đuôi trên hạt. Đặc biệt, dòng lúa cỏ LCCT9 có gié bông mở hoàn toàn giống với dạng bông lúa hoang *Oryza rufipogon*. Một số dòng lúa cỏ có đuôi trên hạt với chiều dài đuôi biến động từ 0 đến 70 mm, trong khi đó một số dòng lúa cỏ không có đuôi trên hạt giống như hạt của giống lúa trồng OM5451 (bảng 3, hình 3).



Hình 3. Đặc điểm hình thái bông và hạt của một số dòng lúa cỏ và giống lúa trồng OM5451.

- Đặc điểm rụng hạt: Hầu hết các dòng lúa cỏ rụng hạt trước khi chín sinh lý (80% khối lượng hạt). Tính dễ rụng hạt là nguyên nhân chính gây thất thoát năng suất cho ruộng lúa vì lúa cỏ trên

đồng cũng hấp thu phân bón, ánh sáng, nước và được chăm sóc như lúa trồng. Kết quả khảo sát cho thấy, nhiều dòng lúa cỏ rụng rất sớm sau khi ngâm sữa (khoảng 15 ngày sau khi trở khi hạt lúa vừa vào chắc là bắt đầu rụng), mức độ rụng hạt càng nhiều khi đến gần giai đoạn chín. Tỷ lệ rụng hạt trung bình là 50%, nhiều dòng dễ rụng hạt thì tỷ lệ này đến 90%. Những hạt lúa chắc ở đầu bông đều rụng hết, chỉ để lại một số ít hạt lửng lẹp ở cuối gần cuống bông.

3.2. Đặc điểm hình thái của các dòng lúa cỏ

Dòng lúa cỏ LCKG-2: Dòng này được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình khoảng 89 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng 114,1±2,9 cm. Góc thân có dạng đứng. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 15±3 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, dòng lúa cỏ LCKG-2 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 10±2, chiều dài bông trung bình 21,0±1 cm với kiểu bông đóng gọn. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng 35±1,49 cm. So với giống lúa trồng phổ biến OM5451 và các dòng lúa cỏ khác trong nghiên cứu, LCKG-2 cho khả năng rụng hạt ở mức dễ rụng. Vỏ trấu của dòng lúa cỏ này có màu vàng rom, màu sắc hạt gạo có màu đỏ. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 8,34 mm và chiều rộng khoảng 2,16 mm. Hạt có râu dài 3-52 mm. Khối lượng 1000 hạt trung bình là 14,88 g (bảng 4, hình 4).

Bảng 4. So sánh các đặc tính nông học giữa các dòng lúa cỏ LCKG-2, LCKG-4, LCKG-6 và LCKG-7 với giống lúa OM5451.

	LCKG-2	LCKG-4	LCKG-6	LCKG-7	OM5451
Thời gian sinh trưởng (ngày)	89	84	94	91	101
Chiều cao cây (cm)	114,1±2,9	141,0±2,8	126,8±3,2	111,2±4	114,1±2,7
Dạng góc thân	Dựng đứng	Dựng đứng	Trung gian	Trung gian	Dựng đứng
Số chồi/bụi	15±3	18±1	16±2	17±4	19±2
Số bông/bụi	10±2	12±1	13±1	11±3	13±2
Dài lá đồng	35±1,49	34±1,42	44,3±2,32	29,1±3,38	32,3±3,5
Diệp lục tố (SPAD)	36,5±2,67	41,0±4,48	38,0±1,07	37,6±1,37	39,2±2,43
Kiểu bông	Đóng gọn	Đóng gọn	Đóng gọn	Đóng gọn	Đóng gọn
Chiều dài bông (cm)	21,0±1	26,5±1,9	27,2±1,2	22,8±2,7	23,2±0,9
Đặc tính rụng hạt	Dễ rụng	Dễ rụng	Khó rụng	Dễ rụng	Khó rụng
Màu sắc vỏ trấu	Vàng rom	Đen	Vàng tươi	Đen	Vàng rom
Màu sắc hạt gạo	Đỏ	Trắng	Đỏ	Nâu	Trắng
Dài hạt thóc (mm)	8,34	8,97	6,04	9,44	9,39
Rộng hạt thóc (mm)	2,16	2,56	2,78	2,24	2,12
Dài râu (mm)	3-52	0-46	0	15,6-20	0
Khối lượng 1000 hạt (g)	14,88	22,84	20,22	19,12	25,11



Hình 4. Dòng lúa cỏ LCKG-2.



Dòng lúa cỏ LCKG-4: Dòng lúa cỏ LCKG-4 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình khoảng 84 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng 114,1±2,9 cm. Góc thân có dạng thẳng đứng. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 18±1 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, dòng lúa cỏ LCKG-4 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 12±1, chiều dài bông trung bình là 26,5±1,9 cm với kiểu bông đóng gọn. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng 34±1,42 cm. So với giống lúa trồng phổ biến OM5451 và các dòng lúa cỏ khác trong nghiên cứu, LCKG-2 cho khả năng rụng hạt ở mức dễ rụng. Vỏ trấu của dòng lúa cỏ này có màu đen, màu sắc hạt gạo có màu trắng. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 8,97 mm và chiều rộng khoảng 2,56 mm. Hạt không có râu hoặc có râu dài 0-46 mm. Khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 22,84 g (bảng 4, hình 5).



Hình 5. Dòng lúa cỏ LCKG-4.

Dòng lúa cỏ LCKG-6: Dòng lúa cỏ LCKG-6 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình khoảng 94 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng 126,8±3,2 cm. Góc thân có dạng trung gian. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 16±2 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, dòng lúa cỏ LCKG-6 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 13±1, chiều dài bông trung bình là 27,2±1,2 cm với kiểu bông đóng gọn. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng 44,3±2,32 cm. So với các dòng lúa cỏ khác trong nghiên cứu, LCKG-6 khó rụng hạt hơn. Vỏ trấu của dòng lúa cỏ này có màu vàng tươi, màu sắc hạt gạo có màu đỏ. Chiều dài hạt thóc của dòng lúa cỏ này ngắn hơn hạt thóc lúa trồng, khoảng 6,04 mm và chiều rộng khoảng 2,78 mm. Hạt không có râu, khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 20,22 g (bảng 4, hình 6).



Hình 6. Dòng lúa cỏ LCKG-6.

Dòng lúa cỏ LCKG-7: Dòng lúa cỏ LCKG-7 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình 91 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng 111,2±4 cm. Góc thân có dạng trung gian. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 17±4 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, dòng lúa cỏ LCKG-7 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 11±3,

chiều dài bông trung bình là 22,8±2,7 cm với kiểu bông đóng gọn. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng 29,1±3,38 cm. So với giống lúa trồng phổ biến OM5451 và các dòng lúa cỏ khác trong nghiên cứu, LCKG-2 cho khả năng rụng hạt ở mức dễ rụng. Vỏ trấu của dòng lúa cỏ này có màu đen, màu sắc hạt gạo có màu nâu. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 9,44 mm và chiều rộng khoảng 2,24 mm. Hạt có râu dài 15,6-20 mm. Khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 19,12 g (bảng 4, hình 7).



Hình 7. Dòng lúa cỏ LCKG-7.

Dòng lúa cỏ LCCT-9: Dòng lúa cỏ LCCT-9 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình khoảng 84 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng 102±3,2 cm. Góc thân có dạng trung gian. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 28±3 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, dòng lúa cỏ LCCT-9 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 24±3, chiều dài bông trung bình là 21,6 cm với kiểu bông trung gian. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng 23±3,21 cm. So với các dòng lúa cỏ khác trong nghiên cứu, LCKG-9 cho khả năng rụng hạt ở mức dễ rụng. Vỏ trấu của dòng lúa cỏ này có màu nâu, màu sắc hạt gạo có màu đỏ. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 7,39 mm và chiều rộng khoảng 2,31 mm. Hạt có râu dài 20-41,5 mm, khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 15,58 g (bảng 5, hình 8).

Bảng 5. So sánh các đặc tính nông học giữa các dòng lúa cỏ LCCT-9, LCCT-12, LCCT-14 và LCCT-20 với giống lúa OM5451.

	LCCT-9	LCCT-12	LCCT-14	LCCT-20	OM5451
Thời gian sinh trưởng (ngày)	84	94	91	91	101
Chiều cao cây (cm)	102±3,2	109±3,4	107,2±3,1	150±2,6	114,1±2,7
Dạng góc thân	Trung gian	Mở	Trung gian	Trung gian	Dựng đứng
Số chồi/bụi	28±3	19±3	17±3	13±2	19±2
Số bông/bụi	24±3	13±1	12±2,07	12±2	13±2
Dài lá đồng	23±3,21	35±1,39	40±2,12	33,9±1,58	32,3±3,5
Diệp lục tố (SPAD)	37,5±2,05	37,6±0,75	40,4±2,75	38,1±1,82	39,2±2,43
Kiểu bông	Mở	Đóng gọn	Trung gian	Đóng gọn	Đóng gọn
Chiều dài bông (cm)	21,6	26,5±1,2	25,4±2,2	31,3±2,0	23,2±0,9
Đặc tính rụng hạt	Dễ rụng	Dễ rụng	Khó rụng	Dễ rụng	Khó rụng
Màu sắc vỏ trấu	Nâu	Vàng rom	Đen	Nâu	Vàng rom
Màu sắc hạt gạo	Đỏ	Đỏ	Đỏ	Nâu nhạt	Trắng
Dài hạt thóc (mm)	7,39	8,5	8,93	9,31	9,39
Rộng hạt thóc (mm)	2,31	2,41	2,68	2,67	2,12
Chiều dài râu (mm)	20-41,5	0-36	40-50	34-70	0
Khối lượng 1000 hạt (g)	15,58	16,94	22,32	28,39	25,11



Hình 8. Dòng lúa cô LCCT-9.

Dòng lúa cô LCCT-12: Dòng lúa cô LCCT-12 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình khoảng 94 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng $109 \pm 3,4$ cm. Góc thân có dạng mở. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 19 ± 3 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, dòng lúa cô LCCT-12 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 13 ± 1 , chiều dài bông trung bình $26,5 \pm 1,2$ cm với kiểu bông đóng gọn. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng $35 \pm 1,39$ cm. So với giống lúa trồng phổ biến OM5451 và các dòng lúa cô khác trong nghiên cứu, LCCT-12 cho khả năng rụng hạt ở mức dễ rụng. Vỏ trấu của dòng lúa cô này có màu vàng rom, màu sắc hạt gạo có màu đỏ. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 8,5 mm và chiều rộng khoảng 2,41 mm. Hạt có râu dài 0-36 mm. Khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 16,94 g (bảng 5, hình 9).



Hình 9. Dòng lúa cô LCCT-12.

Dòng lúa cô LCCT-14: Dòng lúa cô LCCT-14 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình khoảng 91 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng $107,2 \pm 3,1$ cm. Góc thân có dạng trung gian. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 17 ± 3 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, dòng lúa cô LCCT-14 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình $12 \pm 2,07$, chiều dài bông trung bình là $25,4 \pm 2,2$ cm với kiểu bông trung gian. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng $40 \pm 2,12$ cm. So với các dòng lúa cô khác trong nghiên cứu, LCCT-14 cho khả năng rụng hạt ở mức khó rụng. Vỏ trấu của dòng lúa cô này có màu đen, màu sắc hạt gạo có màu đỏ. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 8,93 mm và chiều rộng khoảng 2,68 mm. Hạt có râu dài 40-50 mm. Khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 22,32 g (bảng 5, hình 10).



Hình 10. Dòng lúa cô LCCT-14.

Dòng lúa cô LCCT-20: Dòng lúa cô LCCT-20 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình khoảng 91 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng $150 \pm 2,6$ cm. Góc thân có dạng trung gian. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 13 ± 2 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, dòng lúa cô LCCT-20 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 12 ± 2 , chiều dài bông trung bình là $31,3 \pm 2,0$ cm với kiểu bông đóng gọn. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng $33,9 \pm 1,58$ cm. So với các dòng lúa cô khác trong nghiên cứu, LCCT-20 cho khả năng rụng hạt ở mức dễ rụng. Vỏ trấu của dòng lúa cô này có màu nâu, màu sắc hạt gạo có màu nâu nhạt. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 9,31 mm và chiều rộng khoảng 2,67 mm. Hạt có râu dài 34-70 mm. Khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 28,39 g (bảng 5, hình 11).



Hình 11. Dòng lúa cô LCCT-20.

Dòng lúa cô LCCT-66: Dòng lúa cô LCCT-66 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình khoảng 89 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng $114,4 \pm 3,2$ cm. Góc thân có dạng dựng đứng. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 16 ± 3 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, dòng lúa cô LCCT-66 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 12 ± 2 , chiều dài bông trung bình $22,9 \pm 0,7$ cm với kiểu bông đóng gọn. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng $31,5 \pm 2,07$ cm. So với các dòng lúa cô khác trong nghiên cứu, LCCT-66 cho khả năng rụng hạt ở mức dễ rụng hơn. Vỏ trấu của dòng lúa cô này có màu vàng rom, màu sắc hạt gạo có màu trắng. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 9,6 mm và chiều rộng khoảng 2,41 mm. Hạt không có râu, khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 23,74 g (bảng 6, hình 12).

Bảng 6. So sánh các đặc tính nông học giữa dòng lúa cô LCCT-66, LCCT-71, LCCT-84 và LCHG-51 với giống lúa OM5451.

	LCCT-66	LCCT-71	LCCT-84	LCHG-51	OM5451
Thời gian sinh trưởng (ngày)	89	94	87	89	101
Chiều cao cây (cm)	$114,4 \pm 3,2$	$109,1 \pm 4,1$	$104,4 \pm 2,9$	$148,7 \pm 3,0$	$114,1 \pm 2,7$
Dạng góc thân	Dựng đứng	Dựng đứng	Trung gian	Trung gian	Dựng đứng
Số chồi/bụi	16 ± 3	14 ± 2	23 ± 3	20 ± 3	19 ± 2
Số bông/bụi	12 ± 2	10 ± 2	18 ± 1	9 ± 1	13 ± 2
Dài lá đồng	$31,5 \pm 2,07$	$44,9 \pm 2,17$	$41,0 \pm 1,92$	$42,1 \pm 2,85$	$32,3 \pm 3,5$
Diệp lục tố (SPAD)	$40,8 \pm 0,76$	$39,3 \pm 1,92$	$38,8 \pm 2,15$	$33,7 \pm 6,93$	$39,2 \pm 2,43$
Kiểu bông	Đóng gọn	Trung gian	Trung gian	Đóng gọn	Đóng gọn
Chiều dài bông (cm)	$22,9 \pm 0,7$	$25,5 \pm 1,9$	$22,9 \pm 0,7$	$21,8 \pm 0,6$	$23,2 \pm 0,9$
Đặc tính rụng hạt	Dễ rụng	Khó rụng	Dễ rụng	Rụng vừa	Khó rụng
Màu sắc vỏ trấu	Vàng rom	Vàng rom	Đen	Nâu	Vàng rom
Màu sắc hạt gạo	Trắng	Nâu	Nâu	Đỏ	Trắng
Dài hạt thóc (mm)	9,6	8,62	7,73	7,94	9,39
Rộng hạt thóc (mm)	2,41	2,47	2,32	2,47	2,12
Chiều dài râu (mm)	0	15-31	9-42	0	0
Khối lượng 1000 hạt (g)	23,74	18,64	15,96	16,68	25,11



Hình 12. Đồng lúa cô LCCT-66.

Đồng lúa cô LCCT-71: Đồng lúa cô LCCT-71 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình 94 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng $109,1 \pm 4,1$ cm. Góc thân có dạng dựng đứng. Số chồi mỗi bụi trung bình khoảng 14 ± 2 chồi ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, đồng lúa cô LCCT-71 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 10 ± 2 , chiều dài bông trung bình $25,5 \pm 1,9$ cm, với kiểu bông trung gian. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng $44,9 \pm 2,17$ cm. So các đồng lúa cô khác trong nghiên cứu, LCCT-71 khó rụng hạt hơn. Vỏ trấu của đồng lúa cô này có màu vàng rom, màu sắc hạt gạo có màu nâu. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 8,62 mm và chiều rộng khoảng 2,47 mm. Hạt có râu dài khoảng 15-31 mm. Khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 18,64 g (bảng 6, hình 13).



Hình 13. Đồng lúa cô LCCT-71.

Đồng lúa cô LCCT-84: Đồng lúa cô LCCT-84 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình 87 ngày. Chiều cao cây trung bình khoảng $104,4 \pm 2,9$ cm. Góc thân có dạng trung gian. Số chồi mỗi bụi trung bình 23 ± 3 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, đồng lúa cô LCCT-71 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 18 ± 1 , chiều dài bông trung bình $22,9 \pm 0,7$ cm, với kiểu bông trung gian. Chiều dài lá đồng trung bình $41,0 \pm 1,92$ cm. So với giống lúa trồng phổ biến OM5451 và các đồng lúa cô khác trong nghiên cứu, LCCT-71 dễ rụng hạt hơn. Vỏ trấu của đồng lúa cô này có màu đen, màu sắc hạt gạo có màu nâu. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 7,73 mm và chiều rộng khoảng 2,32 mm. Hạt có râu dài 9-42 mm. Khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình là 15,96 g (bảng 6, hình 14).



Hình 14. Đồng lúa cô LCCT-84.

Đồng lúa cô LCHG-51: Đồng lúa cô LCHG-51 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng trung bình 89 ngày. Chiều cao cây trung bình $148,7 \pm 3,0$ cm. Góc thân có dạng trung gian. Số chồi mỗi bụi trung bình 20 ± 3 ở giai đoạn đẻ nhánh. Ở giai đoạn chín, đồng lúa cô LCHG-51 được ghi nhận có số bông mỗi bụi trung bình 9 ± 1 , chiều dài bông trung bình là $21,8 \pm 0,6$ cm, với kiểu bông đóng gọn. Chiều dài lá đồng trung bình được ghi nhận khoảng $42,1 \pm 2,85$ cm. So với giống lúa trồng phổ biến OM5451 và các đồng lúa cô khác trong nghiên cứu, LCHG-51 cho khả năng rụng hạt ở mức trung bình, không quá dễ rụng. Vỏ trấu của đồng lúa cô này có màu nâu, màu sắc hạt gạo có màu đỏ. Trung bình chiều dài hạt thóc khoảng 7,94 mm và chiều rộng khoảng 2,47 mm. Hạt không có râu, khối lượng 1000 hạt được ghi nhận trung bình ở mức 16,68 g (bảng 6, hình 15).



Hình 15. Đồng lúa cô LCHG-51.

4. Kết luận

Qua kết quả theo dõi, quan sát và phân tích các đặc điểm chính của 12 đồng lúa cô đặc trưng và giống lúa trồng phổ biến OM5451 đã cho thấy sự đa dạng về hình thái và sinh học của các đồng lúa cô thu thập ở 3 tỉnh ĐBSCL. Có nhiều đặc điểm hình thái và sinh học giống nhau giữa các đồng lúa cô được quan sát và ghi nhận so với giống lúa trồng phổ biến. Tuy nhiên, cũng có một số đặc điểm điển hình như: chiều cao cây, màu sắc và hình dạng lá, hình dạng thân, hạt có râu/đuôi, màu vỏ trấu... có thể được sử dụng để phân biệt các đồng lúa cô với giống lúa trồng ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau trên đồng ruộng.

Kết quả quan sát và đánh giá chiều cao cây, một nửa các đồng lúa cô trong nghiên cứu có chiều cao cây cao hơn giống lúa OM5451, trừ các đồng LCKG-7, LCCT-9, LCCT-12, LCCT-14,

LCCT-71, LCCT-84 có chiều cao cây thấp hơn. Tất cả các dòng lúa cỏ trong nghiên cứu đều có thời gian sinh trưởng sớm hơn lúa trồng OM5451 (101 ngày), tiêu biểu nhất là các dòng lúa cỏ LCKG-4, LCCT-9 được ghi nhận có thời gian sinh trưởng khoảng 84 ngày. Hầu hết các dòng lúa cỏ trong nghiên cứu đều cho thấy khả năng dễ rụng hạt và rụng hạt sớm. Một số dòng lúa cỏ như LCKG-6, LCCT-14, LCCT-71 được ghi nhận mức độ rụng hạt khó hơn các dòng lúa cỏ khác trong nghiên cứu, nhưng dễ rụng hạt và rụng sớm hơn so với lúa trồng OM5451.

Sự đa dạng cũng như sự tương đồng về đặc tính hình thái và đặc điểm sinh học của các dòng lúa cỏ so với các giống lúa trồng cho thấy sự tiến hóa rất đa dạng; sự thích nghi nhanh chóng của các dòng lúa cỏ với diễn biến của biến đổi khí hậu và các điều kiện canh tác lúa hiện nay. Điều này có thể làm gia tăng sự phát tán và phổ biến của lúa cỏ, dẫn đến khó khăn trong việc kiểm soát lúa cỏ và khả năng gây hại ngày càng tăng cho ngành sản xuất, xuất khẩu lúa gạo ở ĐBSCL nói riêng, cả nước nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Nadir, H.B. Xiong, Q. Zhu, et al. (2017), "Weedy rice in sustainable rice production - A review", *Agronomy for Sustainable Development*, **37**(5), DOI: 10.1007/s13593-017-0456-4.
- [2] P. Prathepha (2009), "Seed morphological traits and genotypic diversity of weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) populations found in the Thai Hom Mali rice fields of north-eastern Thailand", *Weed Biology and Management*, **9**(1), pp.1-9, DOI: 10.1111/j.1445-6664.2008.00312.x.
- [3] L.H. Ziska, D.R. Gealy, N. Burgos, et al. (2015), *An Emerging Constraint to Global Rice Production*, Academic Press, DOI: 10.1016/bs.agron.2014.09.003.
- [4] D.V. Chin (1995), "Weed management in direct-seeded rice in Vietnam", *Omagari*, **4**, pp.79-82.
- [5] D.V. Chin (1999), "Weedy Rice Situation in Vietnam", *FAO Global Report on Red Rice Control*, pp.27-40.
- [6] IRRI (2013), *Standard Evaluation System of Rice*, 56 pp.
- [7] Z.P. Hussain, A. Man, A.S. Othman (2010), "Morphological study of the relationships between weedy rice accessions (*Oryza sativa* complex) and commercial rice", *Trop. Life Sci. Res.*, **21**(2), pp.27-40.
- [8] M. Reagon, C.S. Thurber, K.M. Olsen, et al. (2011), "The long and the short of it: SD1 polymorphism and the evolution of growth trait divergence in U.S. weedy rice", *Molecular Ecology*, **20**(18), pp.3743-3756, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05216.x.

Nghiên cứu phân lập và một số đặc điểm bệnh học của *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá rô phi (*Oreochromis* spp.) tại miền Bắc, Việt Nam

Đoàn Thị Ninh^{1,2}, Trần Thị Trinh¹, Đặng Thị Hóa¹, Nguyễn Ngọc Tuấn¹, Nguyễn Thị Hương Giang³, Kim Văn Vạn¹, Đặng Thị Lệ², Trương Đình Hoài^{1*}

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1, phường Đình Bảng, TP Từ Sơn, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam

³Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, TP Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/2/2022; ngày chuyển phản biện 15/2/2022; ngày nhận phản biện 7/3/2022; ngày chấp nhận đăng 11/3/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, định danh, xác định một số đặc điểm bệnh học và sinh trưởng của vi khuẩn *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá rô phi nuôi ở miền Bắc. Tổng số 138 mẫu cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare* đã được thu từ 34 đợt xuất hiện bệnh ở 21 trại nuôi của 3 tỉnh Hòa Bình, Hà Nam và Hải Dương. Kết quả cho thấy, cá rô phi nhiễm bệnh có biểu hiện đặc trưng như xơ, bạc mang, xuất hiện đốm bạc trắng trên da, xơ vây. Bệnh có thể xuất hiện quanh năm, nhưng tập trung và gây thiệt hại nhiều ở vụ đông xuân. Tỷ lệ chết ở các ao bị bệnh dao động 5-35%. Tổng số 87 chủng vi khuẩn thuần đã được phân lập thành công từ mẫu cá bệnh, 34 chủng đại diện (1 chủng/đợt xuất hiện bệnh) đã được định danh thành công bằng hình thái, đặc tính sinh hóa và kỹ thuật PCR. Các chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường TYES có khuẩn lạc màu vàng, dạng rễ cây, phát triển sau 36-48 giờ nuôi cấy. Vi khuẩn *F. columnare* thuộc nhóm gram âm, dạng sợi mảnh, di động trượt, dương tính với phản ứng catalase, oxidase, có khả năng hấp thụ thuốc nhuộm red congo, tạo sắc tố vàng nâu từ phản ứng flexirubin. Vi khuẩn *F. columnare* phát triển tốt khi nuôi cấy ở nhiệt độ 25-28°C, pH 7-8 và độ mặn dưới 5‰. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin quan trọng hỗ trợ xây dựng biện pháp phòng và điều trị bệnh do *F. columnare* trên cá rô phi.

Từ khóa: đặc điểm dịch tễ, *Flavobacterium columnare*, miền Bắc, rô phi.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

F. columnare là vi khuẩn gram âm, dạng sợi, được xác định là tác nhân gây bệnh trên nhiều đối tượng cá nước ngọt như: nheo mỳ, rô phi, chép, rô đồng, cá tra, cá hồi [1-4]. Bệnh có phân bố ở hầu hết các nước trên thế giới và gây thiệt hại rất lớn cho ngành nuôi thủy sản nước ngọt, gây chết với tỷ lệ cao, đặc biệt là trên cá da trơn [5]. Bệnh do vi khuẩn *F. columnare* có đặc trưng là xuất hiện các vùng tổn thương màu trắng đến xám vàng trên da, mang hoặc trong một số trường hợp gây nhiễm trùng huyết khi vi khuẩn xâm nhập từ các tổn thương bên ngoài vào trong cơ thể [6]. Bệnh thường bùng phát trong điều kiện môi trường nuôi kém như mật độ nuôi cao, tải lượng chất hữu cơ lớn và điều kiện nhiệt độ môi trường nuôi thay đổi [7].

Cá rô phi được xác định là đối tượng nuôi nước ngọt chủ lực ở Việt Nam với mục tiêu sản xuất phục vụ xuất khẩu [8]. Theo định hướng này, các hệ thống nuôi rô phi thâm canh mật độ cao trong lồng ở các hồ chứa, hồ thủy điện, nuôi lồng trên sông và nuôi thâm canh trong ao đất đang mở rộng nhanh chóng ở nhiều tỉnh miền Bắc. Tuy nhiên, hệ thống nuôi thâm canh mật độ cao gây stress cho đối tượng nuôi, tăng tiếp xúc cá thể trong cùng hệ thống, tích lũy nhiều thức ăn thừa và phân thải làm tăng tải lượng hữu cơ [9], là điều kiện thuận lợi để các bệnh do vi khuẩn bùng phát. Trong đó, dịch bệnh do vi khuẩn *F. columnare* gây ra đã được báo cáo ở một số nước trên thế giới như: Brazil [2, 10], Thái

Lan [11]... Tại Việt Nam, nghiên cứu về tình hình dịch bệnh do vi khuẩn này gây ra được thực hiện bởi N.N. Phuoc và cs (2020) [12] đã thu mẫu cá rô phi nhiễm bệnh và phân lập được một số chủng *F. columnare* từ một số ao nuôi ở Thừa Thiên Huế, tuy nhiên những kết quả đạt được còn khá khiêm tốn. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, xác định tác nhân gây bệnh và đánh giá một số đặc điểm xuất hiện bệnh của bệnh do *F. columnare* trên cá rô phi nuôi ở một số tỉnh khu vực miền Bắc.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare* được thu từ các đợt bùng phát bệnh và các chủng vi khuẩn *F. columnare* sử dụng trong nghiên cứu được phân lập trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm. Các trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất phục vụ cho quá trình thu mẫu, nuôi cấy, phân lập, định danh vi khuẩn và đánh giá các đặc tính nuôi cấy của các chủng vi khuẩn.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu, đánh giá đặc điểm xuất hiện bệnh: Các mẫu cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare* (n=138) được thu từ 21 trại/hộ nuôi thuộc 3 tỉnh miền Bắc (7 trại/tỉnh) với 3 hệ thống nuôi: nuôi lồng trên hồ chứa ở Hòa Bình, nuôi lồng trên sông và nuôi thâm canh trong ao ở Hà Nam và Hải Dương (bảng 1). Các dấu hiệu bệnh lý được xác định theo mô tả của A.M. Declercq và cs

*Tác giả liên hệ: Email: tdhoai@vnua.edu.vn

Study on isolation and some pathological characteristics of *Flavobacterium columnare* causing infection in tilapia (*Oreochromis* spp.) cultured in Northern Vietnam

Thi Ninh Doan^{1,2}, Thi Trinh Tran¹, Thi Hoa Dang¹,
Ngoc Tuan Nguyen¹, Thi Huong Giang Nguyen³,
Van Van Kim¹, Thi Lua Dang², Dinh Hoai Truong^{1*}

¹Faculty of Fisheries, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

²Research Institute for Aquaculture No 1,

Dinh Bang Ward, Tu Son City, Bac Ninh Province, Vietnam

³Faculty of Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture,
Lane 64, Ngo Xuan Quang Street, Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 12 February 2022; revised 7 March 2022; accepted 11 March 2022

Abstract:

The study aims to isolate, identify, and determine the pathological characteristics of *Flavobacterium columnare* causing disease in tilapia cultured in Northern Vietnam. A total of 138 samples of tilapia suspected of being infected with *F. columnare* were collected from 34 disease outbreaks at 21 tilapia farms in Hoa Binh, Ha Nam, and Hai Duong provinces. The results showed that infected tilapia exhibited typical symptoms such as fibrous, silver gills, appearance of silvery white spots on the skin, fibrous fins. The outbreaks can occur in tilapia farms anytime, but focusing and much damage in the winter-spring crop with accumulative mortality rates from 5-35%. A total of 87 isolates were retrieved from the fish samples; 34 representative isolates (1 isolate per outbreak) were successfully identified by phenotypic, biochemical tests, and PCR assays. Using TYES medium, the *F. columnare* isolates grew in yellow and rhizoid colonies after 36-48 h of culture. The bacteria were gram-negative, long filamentous, absorbed Congo red dye, produced flexirubin pigment, gliding motility, and were positive to catalase and oxidase tests. *F. columnare* grew well at a temperature of 25-28°C, pH 7-8 and NaCl concentration below 5‰. The present results provide critical information in developing strategies for the prevention and control of *F. columnare* infection in tilapia.

Keywords: epidemiological characterisation, *Flavobacterium columnare*, Northern Vietnam, tilapia.

Classification number: 4.5

(2013) [13] và H. Dong và cs (2015) [11], bao gồm mang xơ trắng, hoặc xám vàng, cơ thể xuất hiện đốm nhạt màu, xơ vảy. Tiến hành thu 3-5 mẫu cá có dấu hiệu bệnh đặc trưng như mô tả ở trên từ mỗi đợt bệnh bùng phát để phục vụ nghiên cứu. Mẫu cá sau thu được vận chuyển về phòng thí nghiệm trong điều kiện bảo quản lạnh đối với mẫu cá mới chết hoặc vận chuyển kín trong các túi PE chứa nước có bơm oxy đối với cá còn sống để thực hiện nghiên cứu. Các thông tin liên quan đến đặc điểm xuất hiện bệnh như thời gian xuất hiện bệnh, tỷ lệ chết ước tính, cỡ cá nhiễm bệnh cũng được thu thập và tổng hợp liên tục vào tất cả các tháng trong năm (bảng 1).

Bảng 1. Thông tin thu mẫu cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare* trong nghiên cứu.

Địa điểm thu mẫu	Mã trại	Hình thức nuôi	Thời điểm thu mẫu	Số mẫu thu (n=138)	Ký hiệu mẫu
Hòa Bình	HB1	L-HC	3/2021	3	Til-HB1-1
			6/2021	5	Til-HB1-2
	HB2	L-HC	4/2021	5	Til-HB2-1
			11/2020	4	Til-HB3-1
	HB3	L-HC	5/2021	5	Til-HB3-2
			6/2021	4	Til-HB3-3
	HB4	L-HC	11/2020	5	Til-HB4-1
			12/2020	4	Til-HB4-2
	HB5	L-HC	2/2021	3	Til-HB5-1
			8/2021	5	Til-HB6-1
	HB6	L-HC	9/2021	3	Til-HB6-2
			11/2020	4	Til-HB6-3
	HB7	L-HC	10/2021	5	Til-HB7-1
Hà Nam	HN1	A	11/2021	3	Til-HN1-1
			2/2020	4	Til-HN1-2
	HN2	L-S	10/2021	3	Til-HN2-1
	HN3	L-S	1/2021	3	Til-HN3-1
			3/2021	3	Til-HN3-2
	HN4	L-S	2/2021	4	Til-HN4-1
	HN5	A	1/2021	5	Til-HN5-1
Hải Dương	HD1	A	11/2020	3	Til-HN6-1
			2/2021	4	Til-HN6-2
	HD2	A	4/2021	4	Til-HN6-3
	HD3	A	9/2021	4	Til-HN7-1
			10/2021	5	Til-HN7-2
	HD4	L-S	4/2021	4	Til-HD1-1
			2/2021	5	Til-HD2-1
	HD5	A	9/2021	3	Til-HD3-1
			9/2021	5	Til-HD4-1
	HD6	A	3/2021	5	Til-HD4-2
			10/2021	3	Til-HD4-3
	HD7	A	2/2021	4	Til-HD5-1
			11/2020	5	Til-HD6-1
	HD8	A	8/2021	4	Til-HD7-1

Ghi chú: L-HC: nuôi lồng trên hồ chứa; L-S: nuôi lồng trên sông; A: nuôi ao đất.

Phương pháp sàng lọc mẫu và nuôi cấy, phân lập vi khuẩn: Sử dụng cồn 70% khử trùng bề mặt cơ thể cá trước khi tiến hành giải phẫu trong điều kiện vô trùng. Tất cả các mẫu cá nghi nhiễm sau thu (138 mẫu) được sàng lọc thông qua bước nhuộm gram mẫu mô ở các vùng tổn thương như: mang, da, vây, xoang miệng, lách, thận để quan sát sự có mặt của vi khuẩn ở các cơ quan này. Những mẫu có sự hiện diện của vi khuẩn gram âm, dạng sợi (n=125) nghi *F. columnare* như mô tả của H. Dong và cs (2015) [11] được đưa vào nuôi cấy.

Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường TYES (Tryptone yeast extract salts) [14], khuẩn lạc sau nuôi cấy có màu vàng, dạng rẽ phát triển sau 36-48 giờ nuôi cấy nghi là các chủng *F. columnare* độc lực theo H. Dong và cs (2015) [11] và H. Kunttu và cs (2011) [15] được tách để nuôi cấy thuần. Các chủng vi khuẩn sau khi nuôi cấy thuần (n=87) được lưu giữ trong môi trường tăng sinh bổ sung glyceron ở điều kiện -80°C.

Phương pháp định danh vi khuẩn bằng xác định hình thái, sinh hóa: Từ bộ chủng vi khuẩn thuần thu được, lựa chọn ngẫu nhiên 1 chủng/đợt bùng phát bệnh để định danh (n=34). Đặc điểm hình thái, sinh hóa của vi khuẩn được xác định theo mô tả của J.F. Bernardet và P.A. Grimont (1989) [16] và N.B. Buller (2004) [17]. Vi khuẩn thuần được quan sát hình thái khuẩn lạc trên đĩa nuôi cấy, xác định hình dạng vi khuẩn qua nhuộm gram và soi tươi xác định đặc tính di động. Phản ứng catalase sử dụng kit thử oxidase H_2O_2 3% (Merck, Darmstadt, Đức); oxidase sử dụng thuốc thử dimethyl-*p*-phenylene diamine (Biomerieux, Pháp); khả năng hấp thụ congo đỏ sử dụng thuốc thử red congo (Merck, Darmstadt, Đức); sự có mặt của sắc tố flexirubin được thử bằng dung dịch KOH 20% (Merck, Darmstadt, Đức). Quy trình thực hiện được tiến hành theo hướng dẫn của kit thử và mô tả kết quả của J.F. Bernardet và cs (2006) [18]. Các chủng vi khuẩn được định danh sơ bộ là *F. columnare* khi có kết quả kiểm tra tương đồng với chủng chuẩn *F. columnare* ATCC 23463.

Phương pháp tách chiết DNA và giám định vi khuẩn bằng sinh học phân tử: Các chủng vi khuẩn sau định danh sơ bộ thành công bằng hình thái, sinh hóa (n=34) được tách chiết DNA để khẳng định bằng phương pháp sinh học phân tử. DNA của vi khuẩn thuần được tách bằng bộ kit InstaGen matrix (Bio-rad, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau tách được lưu ở điều kiện -20°C để sử dụng trong quá trình định danh bằng sinh học phân tử theo mô tả của J.A. Bader và cs (2003) [5].

Tất cả các chủng sau thử sinh hóa được đưa vào giám định bằng PCR, sử dụng primer xác định sự có mặt của gen đích ISR với đoạn mồi xuôi FCISRFL: TGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAGAGACA; mồi ngược FCISRR: TAATYRCTAAAGATGTTCTTTCTACTTGTGTTG, kích cỡ vùng gen đích là 470 bp [19]. Hỗn dịch cho 1 phản ứng PCR có thể tích tổng 20 μ l bao gồm 10 μ l Gotag green Master Mix (Promega, Anh), 1,5 μ l mỗi primer xuôi và ngược, 3 μ l mẫu DNA, 4 μ l nước tách DNA. Hỗn dịch được đưa vào máy luân nhiệt để khuếch đại DNA theo chu trình nhiệt như sau: tiền biến tính ở 94°C trong 5 phút; 40 chu kỳ lặp lại với biến tính ở 94°C trong 30s, gắn mồi ở 55°C trong 45s, kéo dài ở 72°C trong 60s; giai đoạn kéo dài sau cùng ở 72°C trong 7 phút. Đối chứng dương là chủng chuẩn

quốc tế *F. columnare* ATCC 23463, đối chứng âm là mẫu không DNA.

Sản phẩm PCR được phân tích trên máy điện di sử dụng bản gel chứa 1% agarose nhuộm bằng dung dịch Redsafe (Intron, Hàn Quốc). Hình ảnh điện di bản gel được chụp bằng hệ thống Gel imager (Bio-Rad, Mỹ).

Phương pháp cảm nhiễm, khẳng định tác nhân gây bệnh: Để khẳng định vi khuẩn phân lập được có khả năng gây bệnh trên cá rô phi khỏe mạnh, lựa chọn 3 chủng vi khuẩn đại diện đã định danh thành công (FC-HB03, FC-HN04, FC-HD07) từ mỗi tỉnh thu mẫu để tiến hành cảm nhiễm trên cá rô phi. Theo kết quả nghiên cứu của H. Dong và cs (2016) [20], liều ngâm vi khuẩn *F. columnare* 2×10^6 CFU/ml gây chết 100% cá rô phi giống. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của P. Wonmongkol và cs (2018) [21], liều gây chết 50% cá rô phi giống khi ngâm cảm nhiễm *F. columnare* ở mức $1,2 \times 10^6$ CFU/ml. Do vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn nồng độ 2×10^6 CFU/ml để sử dụng trong thí nghiệm cảm nhiễm. Cá cảm nhiễm có kích cỡ 25-30 g, trước khi tiến hành thí nghiệm, cá được nuôi thuần hóa để làm quen với điều kiện bể trong thời gian 1 tuần. Tiến hành nuôi tăng sinh các chủng vi khuẩn bằng môi trường TYES trong 36 giờ. Sử dụng phương pháp cháng cây trên đĩa thạch để xác định mật độ vi khuẩn trong dịch gốc. Bổ sung thêm nước muối sinh lý để điều chỉnh mật độ vi khuẩn gốc của 3 chủng về mức đồng đều khoảng 2×10^8 CFU/ml. Đối với mỗi chủng vi khuẩn, pha loãng 50 ml dịch khuẩn gốc vào 5 l nước sạch để tạo dịch ngâm cảm nhiễm có mật độ vi khuẩn khoảng 2×10^6 CFU/ml. Sử dụng 10 con cá/lô ngâm, lặp lại 2 lần, thời gian ngâm là 2 giờ, sau đó đưa ra nuôi trong các bể 120 l và theo dõi trong 7 ngày. Lô đối chứng thực hiện tương tự với nước ngâm không chứa vi khuẩn. Trong thời gian theo dõi (7 ngày), cá chết hoặc có biểu hiện bệnh sau cảm nhiễm được thu để quan sát triệu chứng bệnh tích, nhuộm gram, soi tươi quan sát sự xuất hiện của vi khuẩn trong mô bào. Một số mẫu cá được nuôi cấy, phân lập lại vi khuẩn và được giám định nhanh bằng PCR để khẳng định tác nhân gây bệnh.

Phương pháp xác định một số đặc tính nuôi cấy của vi khuẩn: Các thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy bao gồm nhiệt độ, độ mặn và pH lên sinh trưởng của vi khuẩn được thực hiện với 3 chủng vi khuẩn đại diện FC-HB03, FC-HN04 và FC-HD07. Dựa trên các thử nghiệm ban đầu của chúng tôi và kết quả nghiên cứu của L.R. Suomalainen và cs (2006a) [22], các khoảng môi trường được thiết lập để thử nghiệm bao gồm nhiệt độ: 10, 15, 20, 25, 28, 30 và 35°C; hàm lượng NaCl: 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 và 15‰; pH: 5, 6, 7, 8, 8,5 và 9. Với các lô thử nghiệm nhiệt độ, vi khuẩn được nuôi cấy trong bể ổn nhiệt (water bath). Bổ sung NaCl để điều chỉnh độ mặn của môi trường nuôi cấy, trong khi sử dụng NaOH, HCl loãng để điều chỉnh pH môi trường nuôi. Với lô thử nghiệm ảnh hưởng của độ mặn và pH, vi khuẩn được nuôi cấy ở 28°C.

Phương pháp đánh giá kết hợp dựa trên nuôi cấy tăng sinh và đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch, sử dụng môi trường TYES. Để tiến hành thử nghiệm, 5 khuẩn lạc vi khuẩn phát triển sau 36 giờ được lấy và đánh tan đồng nhất vào 1 ml PBS tạo vi khuẩn giống, bổ sung 50 μ l vi khuẩn giống vào các ống 5 ml có chứa môi trường tăng sinh TYES với các điều kiện nhiệt độ, NaCl và pH đã được thiết lập như

trên và chằng cấy trên thạch để xác định mật độ vi khuẩn tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm. Sau 36 giờ, 50 μ l dịch khuẩn được chằng cấy trên đĩa thạch TYES và nuôi cấy ở 28°C trong 36 giờ để đánh giá số lượng vi khuẩn mọc và phát triển.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

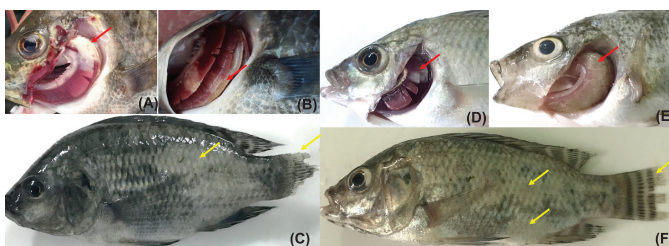
Số liệu về tỷ lệ chết của cá trong quá trình cảm nhiễm, mật độ vi khuẩn phát triển ở các điều kiện môi trường nuôi khác nhau được phân tích thống kê mô tả kết hợp với so sánh giữa các nghiệm thức bằng phân tích ANOVA, sử dụng phép so sánh Turkey Post-Hoc trên phần mềm SPSS20 và Excel 2013.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm xuất hiện bệnh trắng da, bạc mang do vi khuẩn *F. columnare* trên cá rô phi

Kết quả tổng hợp thông tin dịch tễ từ các đợt xuất hiện bệnh cho thấy, bệnh trắng da, bạc mang trên cá rô phi do nhiễm *F. columnare* thường gặp ở kích cỡ cá dưới 300 g, phổ biến nhất ở giai đoạn dưới 100 g ở cả 3 hệ thống nuôi (bảng 1). Các đợt bùng phát bệnh xuất hiện ở hầu hết các tháng trong năm, nhưng tập trung vào khoảng thời gian từ tháng 9 đến tháng 3 năm sau, đặc biệt vào các giai đoạn giao mùa, tháng 9-10 và tháng 3-4 đối với các hệ thống nuôi ao và nuôi lồng trên sông. Ở giai đoạn nuôi thương phẩm, cá rô phi nhiễm *F. columnare* thường chết rải rác, với tỷ lệ chết cao hơn ở giai đoạn nhỏ (dưới 100 g), khi đạt kích cỡ cao hơn, tỷ lệ chết giảm. Đặc biệt, các đợt bùng phát bệnh ở hệ thống nuôi lồng trên sông và hồ chứa thường gây ra tỷ lệ chết cao hơn (20-35%) so với khi nuôi trong ao (5-15%).

Cá nhiễm bệnh xuất hiện các triệu chứng lâm sàng đặc trưng như mòn vẩy, xuất hiện các đốm bạc màu trên da, cơ thể nhợt nhạt, tia mang xơ, bạc trắng hoặc xám vàng từng phần hoặc toàn bộ lá mang, tăng tiết nhớt (hình 1). Tuy cá nhiễm bệnh thể hiện triệu chứng lâm sàng rõ ràng nhưng bệnh tích đại thể không đặc trưng. Những đặc điểm lâm sàng quan sát được trên cá nhiễm *F. columnare* trong nghiên cứu này tương tự với các công bố trước đây trên cá rô phi [2, 11].



Hình 1. Dấu hiệu lâm sàng trên cá rô phi nhiễm *F. columnare*. (A, B, C) Mẫu cá thu từ hệ thống nuôi; (D, E, F) Mẫu cá cảm nhiễm. Cá nhiễm bệnh có dấu hiệu xơ, bạc hoặc xám vàng tia mang (mũi tên đỏ) và bạc da, xơ tia vây (mũi tên vàng).

Bệnh do vi khuẩn *F. columnare* thường bắt đầu từ các lây nhiễm bên ngoài trên da, vây, mang và phát triển thành các khối loét sâu dưới cơ [23]. Vi khuẩn *F. columnare* được cho là sử dụng nhớt cá làm nguồn dinh dưỡng [24]. Trong quá trình phát triển và nhân lên sau khi nhiễm vào ký chủ, vi khuẩn tiết ra nhiều sản phẩm ngoại bào trong đó có enzyme protease ngoại bào, là yếu tố độc lực quan

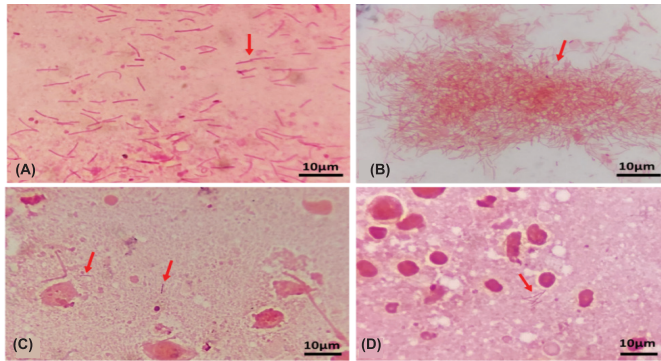
trọng gây ra các tổn thương và hoại tử trên mang và mô biểu bì của cá nhiễm bệnh [25, 26]. Ngoài ra, các vùng tổn thương, hoại tử ban đầu trên da, mang cũng thường dẫn đến các lây nhiễm thứ cấp, bội nhiễm nấm hoặc các nhóm vi khuẩn gây bệnh khác, dẫn đến các tổn thương nặng hơn, gây loét da, hoặc sâu vào các lớp cơ [18, 27, 28]. Khi mang và da bị tổn thương sâu, vi khuẩn dễ xâm nhập vào máu cá gây nhiễm trùng huyết và đi vào các hệ cơ quan nội tạng [29]. Đây cũng là nguyên nhân có sự xuất hiện của vi khuẩn từ nội quan của cá nhiễm bệnh giai đoạn nặng trong nghiên cứu.

Vi khuẩn *F. columnare* có thể gây nhiễm từ cấp tính đến mạn tính với mức độ độc lực phụ thuộc vào từng chủng vi khuẩn [13]. Ngoài ra, giai đoạn độ tuổi của cá nhiễm bệnh cũng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến mức độ nghiêm trọng của các tổn thương và dấu hiệu bệnh. Cá giai đoạn nhỏ bệnh thường phát triển ở dạng cấp tính và gây tổn thương rất nặng ở mang, cản trở hô hấp, hạn chế khả năng thu nhận oxy trong nước, gây chết nhanh, chết cấp tính [13]. Cá giai đoạn trưởng thành có thể nhiễm ở dạng cấp tính, bán cấp tính hoặc mạn tính. Cá nhiễm bệnh ở thể mạn tính thường xuất hiện các vùng hoại tử nghiêm trọng màu vàng xám trên mang [18, 30]. Đây có thể là nguyên nhân gây ra hiện tượng cá giai đoạn nhỏ hơn thường có tỷ lệ chết cao hơn so với giai đoạn lớn ghi nhận được ở các hệ thống nuôi. Tuy nhiên, ở các đợt bùng phát bệnh xảy ra trong nghiên cứu này, cá đều chết rải rác với tỷ lệ chết tích lũy cao nhất ở mức 35%, không quan sát được hiện tượng cá chết cấp tính, chết hàng loạt trong thời gian ngắn. Điều này có thể do kích cỡ cá ở các hộ/trại nuôi đã đủ lớn (trung bình trên 38,4 g), không gây ra các lây nhiễm ở dạng cấp tính như ở giai đoạn cá bột, cá hương.

Ngoài ra, điều kiện môi trường nuôi cũng ảnh hưởng lớn đến bùng phát bệnh do *F. columnare*. Trong số các yếu tố này, hàm lượng chất hữu cơ và các hợp chất chứa nitơ tăng lên, làm tăng stress lên cá nuôi, tăng tiết nhớt, thúc đẩy phát triển của vi khuẩn [7]. Ngoài ra, các hệ thống nuôi thâm canh cũng có đầy đủ các điều kiện tốt để tăng sinh các loại ký sinh trùng và vi khuẩn gây bệnh khác, tăng đồng nhiễm các tác nhân gây bệnh [13]. Đây là nguyên nhân dẫn đến cá thường chết nhiều vào các thời điểm nhiệt độ mát, đặc biệt là các thời điểm giao mùa khi tăng lượng mưa, tăng chất hữu cơ trong hệ thống nuôi. Khi xảy ra dịch bệnh, đối với các hệ thống nuôi trong ao khép kín, các loại tác nhân gây bệnh cơ hội bao gồm ký sinh trùng và vi khuẩn gây bệnh dễ dàng bị tiêu diệt khi sử dụng các loại thuốc sát trùng và kháng sinh điều trị, do đó giảm thiểu tỷ lệ chết. Trong khi đó, các hệ thống nuôi lồng rất khó khử trùng, tiêu diệt tác nhân gây bệnh thứ cấp do nuôi trong hệ thống mở, do vậy khi bùng phát bệnh thường có tỷ lệ chết cao hơn.

3.2. Kết quả phân lập và định danh tác nhân gây bệnh

Quá trình sàng lọc từ 138 mẫu cá rô phi có dấu hiệu bệnh đặc trưng thu từ các đợt bùng phát bệnh đã cho kết quả 125 mẫu có xuất hiện vi khuẩn gram âm, dạng sợi mảnh nghi *F. columnare* ở các vị trí tổn thương trên da, mang và trong xoang miệng. Một số mẫu cá có biểu hiện nhiễm bệnh nặng cũng quan sát được vi khuẩn xuất hiện rải rác trong mô lách, thận trên (hình 2, bảng 2). Tổng số 87 chủng vi khuẩn thuần đã được phân lập thành công trên môi trường TYES. Các đặc tính hình thái, sinh hóa của 34 chủng



Hình 2. Kết quả nhuộm gram mẫu mô tươi từ cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare*. Vi khuẩn gram âm, dạng sợi mảnh (mũi tên đỏ) phân bố rải rác hoặc tập trung thành từng bụi lớn ở các vị trí tổn thương trên mang và da (A, B); xuất hiện rải rác trong xoang miệng (C) và thận (D).

Bảng 2. Thông tin dịch bệnh do vi khuẩn *F. columnare* trên cá rô phi tại miền Bắc.

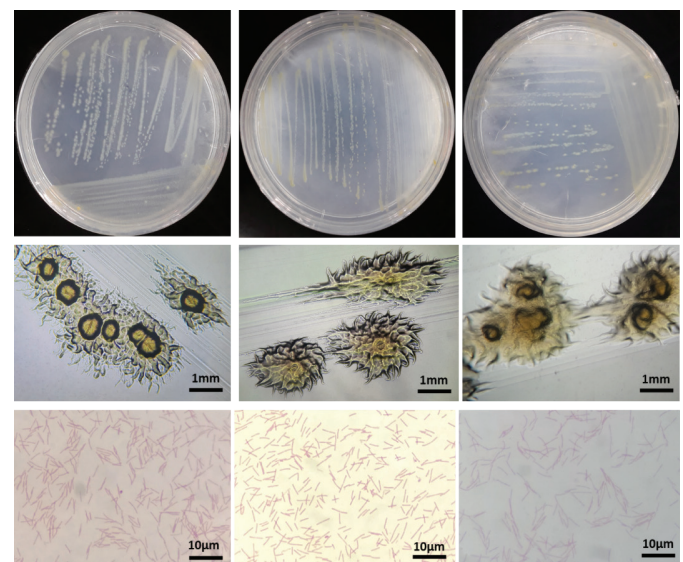
STT	Đợt bùng phát ⁽¹⁾	Hệ thống nuôi ⁽²⁾	Tháng ⁽³⁾	Cỡ cá ⁽⁴⁾	Tỷ lệ chết ⁽⁵⁾	Chủng phân lập	Vị trí phân lập	Giám định PCR
1	HB1-1	L-HC	3	245,7	20-30	FC-HB1	Mang	+
2	HB1-2	L-HC	6	125,2	25-35	FC-HB2	Da	+
3	HB2-1	L-HC	4	302,6	15-20	FC-HB3	Mang	+
4	HB3-1	L-HC	11	215,8	25-30	FC-HB4	Thận	+
5	HB3-2	L-HC	5	264,5	25-30	FC-HB5	Mang	+
6	HB3-3	L-HC	6	176,3	15-20	FC-HB6	Mang	+
7	HB4-1	L-HC	11	85,1	10-15	FC-HB7	Da	+
8	HB4-2	L-HC	12	138,2	25-30	FC-HB8	Da	+
9	HB5-1	L-HC	2	97,8	20-30	FC-HB9	Thận	+
10	HB6-1	L-HC	8	81,6	20-25	FC-HB10	Lách	+
11	HB6-2	L-HC	9	78,2	15-20	FC-HB11	Mang	+
12	HB6-3	L-HC	11	177,6	30-35	FC-HB12	Mang	+
13	HB7-1	L-HC	10	275,3	10-15	FC-HB13	Da	+
14	HN1-1	A	11	38,4	5-10	FC-HN1	Mang	+
15	HN1-2	A	2	47,1	1-5	FC-HN2	Mang	+
16	HN2-1	L-S	10	268,9	10-15	FC-HN3	Da	+
17	HN3-1	L-S	1	151,4	15-20	FC-HN4	Thận	+
18	HN3-2	L-S	3	148,7	10-15	FC-HN5	Mang	+
19	HN4-1	L-S	2	93,1	25-30	FC-HN6	Mang	+
20	HN5-1	A	1	76,3	5-10	FC-HN7	Da	+
21	HN6-1	L-S	11	115,2	15-20	FC-HN8	Mang	+
22	HN6-2	L-S	2	75,1	25-30	FC-HN9	Mang	+
23	HN6-3	L-S	4	81,7	25-20	FC-HN10	Da	+
24	HN7-1	A	9	135,7	1-5	FC-HN11	Da	+
25	HN7-2	A	10	55,7	15-20	FC-HN12	Da	+
26	HD1-1	A	4	72,8	10-15	FC-HD1	Mang	+
27	HD2-1	A	2	42,6	15-20	FC-HD2	Da	+
28	HD3-1	A	9	167,6	1-5	FC-HD3	Lách	+
29	HD4-1	L-S	9	112,4	15	FC-HD4	Mang	+
30	HD4-2	L-S	3	76,3	20-25	FC-HD5	Da	+
31	HD4-3	L-S	10	215,2	10-15	FC-HD6	Lách	+
32	HD5-1	A	2	39,5	10-15	FC-HD7	Mang	+
33	HD6-1	A	11	41,2	15-20	FC-HD8	Da	+
34	HD7-1	A	8	50,4	1-10	FC-HD9	Thận	+

(¹): đợt xuất hiện bệnh; mã trại - đợt bùng phát; HB: Hòa Bình; HN: Hà Nam; HD: Hải Dương; (²): hệ thống nuôi: L-HC: lồng trên hồ chứa; L-S: nuôi lồng trên sông; A: nuôi thâm canh trong ao đất; (³): tháng xuất hiện bệnh; (⁴): khối lượng cá trung bình của các mẫu cá thu; (⁵): tỷ lệ chết ước tính bởi chủ hộ nuôi.

đại diện được lựa chọn (1 chủng/đợt bùng phát bệnh) đều có đặc tính tương đồng nhau và tương đồng với chủng chuẩn *F. columnare* ATCC23463. Khuẩn lạc vi khuẩn có màu vàng, dạng rỗ, đạt kích cỡ 0,5-3,0 mm sau 36 giờ nuôi cấy; vi khuẩn gram âm, dạng sợi mảnh, có chiều dài 2-10 µm. Một số đặc tính sinh hóa khác ghi nhận được bao gồm di động trượt, dương tính với các phản ứng oxidase, catalase, flexirubin, red congo và không phát triển trên môi trường TSA (bảng 3, hình 3). Các đặc điểm ghi nhận được phù hợp với mô tả của J.F. Bernardet và cs (1989) [16] và H. Dong và cs (2015) [11] về chủng *F. columnare* gây bệnh trên cá rô phi. Hầu hết các chủng đều được phân lập từ các vị trí tổn thương trên mang và da, chỉ có một số ít chủng phân lập được từ mẫu thận, lách cá nhiễm bệnh nặng (bảng 2).

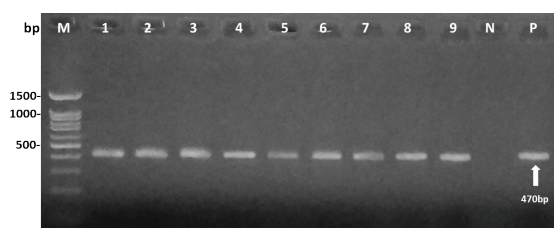
Bảng 3. Kết quả thử một số đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn đại diện phân lập được trên cá rô phi nhiễm bệnh.

Đặc tính sinh thái, sinh hóa	Chủng phân lập từ cá rô phi nhiễm bệnh (n=34)	Chủng chuẩn <i>F. columnare</i> ATCC 23463
Gram	-	-
Phát triển trên TSA	-	-
Hình thái khuẩn lạc trên TYES	rỗ	rỗ
Hình thái vi khuẩn	Sợi mảnh	Sợi mảnh
Di động trượt	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Flexirubin	+	+
Red congo	+	+



Hình 3. Hình thái khuẩn lạc và hình dạng vi khuẩn của 3 chủng đại diện phân lập từ 3 tỉnh nghiên cứu.

Kết quả giám định bằng kỹ thuật PCR khẳng định, 34/34 chủng được định danh là *F. columnare* khi cho kết quả dương tính với đoạn mồi đặc hiệu cho loài *F. columnare*, sản phẩm khuếch đại có kích cỡ 470 bp, trùng với vị trí xuất hiện vạch của chủng đối chứng dương *F. columnare* ATCC23463 (hình 4, bảng 2).

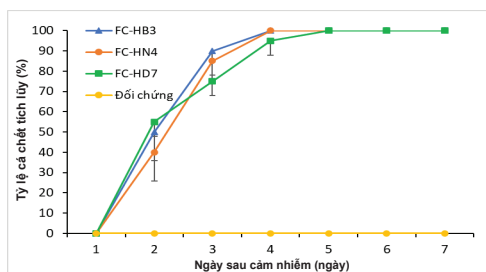


Hình 4. Hình ảnh điện di của 9 chủng đại diện (3 chủng/tinh). M: marker; giếng 1-9: 9 chủng vi khuẩn đại diện phân lập từ cá rô phi nhiễm bệnh; N: đối chứng âm (mẫu không DNA); P: đối chứng dương (chủng *F. columnare* ATCC23463).

3.3. Kết quả cảm nhiễm khẳng định tác nhân gây bệnh

Kết quả ngâm cảm nhiễm liều 2×10^6 CFU/ml vi khuẩn *F. columnare* trong 2 giờ gây chết 100% cá cảm nhiễm sau 48-72 giờ, trong khi lô đối chứng không có cá chết sau 7 ngày tiêm (hình 5). Cá nhiễm bệnh sau cảm nhiễm có các dấu hiệu như cơ thể nhợt nhạt và bạc tia mang từng gốc hoặc toàn bộ cung mang tương đồng với dấu hiệu ghi nhận được trên cá nhiễm bệnh thu từ tự nhiên (hình 1). Các vị trí tổn thương trên cá nhiễm bệnh đều quan sát được sự có mặt của vi khuẩn gram âm, dạng sợi mảnh tương tự như chủng vi khuẩn đưa vào cảm nhiễm. 3 chủng phân lập được đưa vào định danh nhanh bằng PCR đều cho kết quả dương tính với gen đặc hiệu cho loài *F. columnare*.

Kết quả cảm nhiễm khẳng định vi khuẩn *F. columnare* phân lập được là tác nhân gây ra các triệu chứng đặc trưng trên cá nhiễm bệnh thu từ tự nhiên và gây chết cho cá nhiễm bệnh theo quy trình và nguyên lý Koch's về chẩn đoán và khẳng định tác nhân gây bệnh. Hiện tượng chết cấp tính quan sát được trong nghiên cứu tương đồng với kết quả cảm nhiễm trên cá điều hồng giai đoạn nhỏ ở khoảng liều tiêm tương tự được H. Dong và cs (2015) [11] tiến hành trên chủng *F. columnare* thu từ cá rô phi nhiễm bệnh ở Thái Lan.

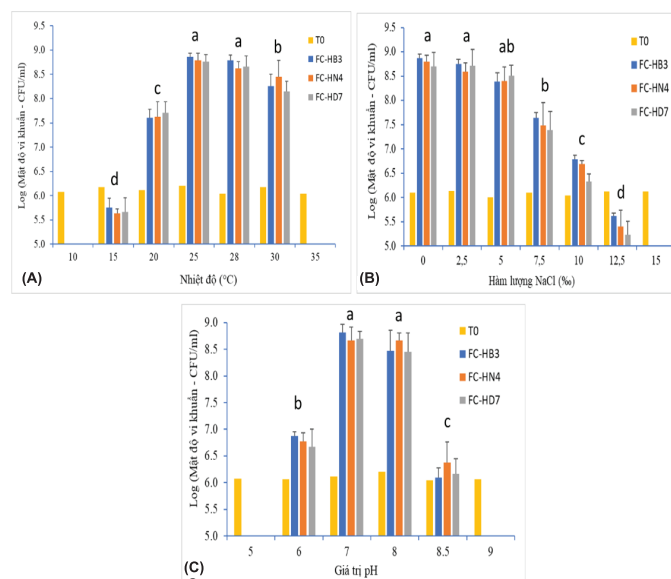


Hình 5. Tỷ lệ chết tích lũy của cá sau ngâm cảm nhiễm.

3.4. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên sự phát triển của vi khuẩn

Xu hướng phát triển của 3 chủng *F. columnare* đại diện phân lập từ cá rô phi nhiễm bệnh trong điều kiện khác nhau về nhiệt độ, hàm lượng NaCl và pH diễn ra tương đối giống nhau. Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng phát triển của vi khuẩn *F. columnare*. Sự phát triển của vi khuẩn không có khác biệt ở nhiệt độ 25-28°C ($p > 0,05$). Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng lên 30°C hoặc giảm xuống 20°C, khả năng nhân lên của vi khuẩn bắt đầu suy giảm ($p < 0,05$) với mức kém hơn ở 20°C so với 30°C. Vi khuẩn

F. columnare vẫn sống sót nhưng không nhân lên ở 15°C và chết hoàn toàn khi nhiệt độ tăng lên 35°C hoặc giảm xuống 10°C (hình 6A).



Hình 6. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng phát triển của 3 chủng vi khuẩn *F. columnare* đại diện. (A) Nhiệt độ; (B) Độ mặn; (C) Giá trị pH; T0: mật độ vi khuẩn tại thời điểm nuôi cấy.

Khả năng sinh trưởng tốt nhất của vi khuẩn này ở điều kiện mát (25-28°C) cũng một phần giải thích cho sự xuất hiện bệnh thường xuyên hơn ở điều kiện thời tiết này trong thực tế. Ngoài khả năng sống sót và nhân lên tốt hơn, ở mức nhiệt này, vi khuẩn còn có khả năng gắn bám tốt hơn vào mô bào vật chủ và mức độ hoạt động của các emzym ngoại bào, các sản phẩm tiết độc lực ở mức cao nhất, làm tăng hiệu quả xâm nhập và gây bệnh A. Decostere và cs (1998, 1999, 2002) [7, 27, 30]. Mặc dù theo J.F. Bernardet và cs (1989) [16], A. Decostere và cs (1998) [27] có những chủng vi khuẩn *F. columnare* phát triển được ở mức nhiệt trên 37°C, nhưng các chủng gây bệnh trên cá rô phi thu được trong nghiên cứu không sống sót khi nhiệt độ tăng đến 35°C.

Khả năng nhân lên của vi khuẩn không có sự khác biệt lớn khi bổ sung thêm NaCl vào môi trường nuôi cấy ở mức 2,5 và 5‰ so với khi không bổ sung thêm NaCl. Tuy nhiên, khả năng nhân lên của vi khuẩn suy giảm lớn khi tiếp tục tăng thêm lượng NaCl lên mức 7,5‰ và hầu như không nhân lên ở độ mặn 10‰. Mức độ mặn 12,5‰, một phần vi khuẩn vẫn sống sót, nhưng chết hoàn toàn ở độ mặn 15‰ (hình 6B). Đối với thử nghiệm thay đổi pH môi trường nuôi cấy, khả năng phát triển của vi khuẩn không có sự khác biệt khi nuôi cấy trong điều kiện môi trường tăng sinh có pH 7, 8 ($p > 0,05$), nhưng suy giảm rõ rệt khi pH tăng lên 8,5 hoặc giảm xuống 6 ($p < 0,05$), với mật độ đạt được ở pH 6 cao hơn ở pH 8,5. Vi khuẩn *F. columnare* không có khả năng sống sót khi pH môi trường nuôi cấy tăng lên 9 hoặc giảm xuống mức 5 (hình 6C). So với các nghiên cứu của L.R. Suomalainen và cs (2006b) [31], ảnh hưởng của độ mặn và pH lên khả năng phát triển của chủng vi

khảo thu được trong nghiên cứu khá tương đồng với chủng phân lập từ cá có vảy ở vùng Finland. Mặc dù chưa có các thí nghiệm đánh giá một cách chính xác nhưng khả năng phát triển kém của vi khuẩn trong điều kiện mặn lợ (>10‰ và pH>8) cũng là cơ sở giải thích cho thực tế không có báo cáo về sự xuất hiện của bệnh này trên cá rô phi khi nuôi trong môi trường mặn lợ ở miền Bắc.

4. Kết luận

F. columnare là tác nhân gây chết cá rô phi nuôi ở 21 trại nuôi tại Hòa Bình, Hà Nam và Hải Dương với các triệu chứng trắng da, bạc mang trên cá nhiễm bệnh. Nghiên cứu đã phân lập và định danh thành công tác nhân gây bệnh bằng phương pháp sinh hóa và giám định bằng sinh học phân tử. Trong điều kiện nuôi cấy, vi khuẩn *F. columnare* phân lập được từ cá rô phi nhiễm bệnh phát triển tốt ở nhiệt độ mát (25-28°C), pH trung tính đến kiềm nhẹ (7-8) và độ mặn dưới 5‰. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin ban đầu về bệnh *F. columnare* trên cá rô phi và là cơ sở trong việc xây dựng chiến lược phòng và điều trị bệnh, giảm thiểu thiệt hại do bệnh gây ra trong thời gian tới.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.05-2020.18. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các nhóm sinh viên Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và các chủ trang trại nuôi cá rô phi ở Hòa Bình, Hà Nam, Hải Dương đã giúp đỡ, tạo điều kiện trong quá trình điều tra, thu mẫu để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Decostere, F. Haesebrouck, G. Charlier, et al. (1999a), "The association of *Flavobacterium columnare* strains of high and low virulence with gill tissue of black mollies (*Poecilia sphenops*)", *Veterinary Microbiology*, **67**(4), pp.287-298, DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00050-4.
- [2] H. Figueiredo, P.H. Klesius, C.R. Arias, et al. (2005), "Isolation and characterisation of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil", *Journal of Fish Diseases*, **28**(4), pp.199-204, DOI: 10.1111/j.1365-2761.2005.00616.x.
- [3] C.A. Shoemaker, O.O. Fuster, C.R. Arias, et al. (2008), "*Flavobacterium columnare* genomovar influences mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)", *Veterinary Microbiology*, **127**(3-4), pp.353-359, DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.09.003.
- [4] B.R. LaFrentz, S.E. LaPatra, C.A. Shoemaker, et al. (2012), "Reproducible challenge model to investigate the virulence of *Flavobacterium columnare* genomovars in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*", *Diseases of Aquatic Organisms*, **101**(2), pp.115-122, DOI: 10.3354/dao02522.
- [5] J.A. Bader, C.A. Shoemaker, P.H. Klesius (2003), "Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16-S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*", *Journal of Microbiological Methods*, **52**(2), pp.209-220, DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00208-7.
- [6] K.S. Roth, W. Yunghans, L.F. Caslake (2002), "Differences in chondroitin AC lyase activity of *Flavobacterium columnare* isolates", *Journal of Fish Diseases*, **25**(11), pp.687-691, DOI: 10.1046/j.1365-2761.2002.00421.x.
- [7] A. Decostere, F. Haesebrouck, J.F. Turnbull, et al. (1999b), "Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches", *Journal of Fish Diseases*, **22**(1), pp.1-11, DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00132.x.
- [8] Ministry of Agriculture and Rural Development (2016), *Decision Approving The Development Plan for Tilapia Farming to 2020, with a Vision to 2030* (in Vietnamese).
- [9] A.B. Dauda, A. Ajadi, A.S.T. Fabunmi et al. (2019), "Waste production in aquaculture: Sources, components and managements in different culture systems", *Aquaculture and Fisheries*, **4**(3), pp.81-88, DOI: 10.1016/j.aaf.2018.10.002.

- [10] G. Barony, G.C. Tavares, G.B.N. Assis, et al. (2015), "New hosts and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from Brazilian native species and Nile tilapia", *Diseases of Aquatic Organisms*, **117**(1), pp.1-11, DOI: 10.3354/dao02931
- [11] H. Dong, B. LaFrentz, N. Pirarat, et al. (2015), "Phenotypic characterization and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from red tilapia, *Oreochromis* sp., in Thailand", *Journal of Fish Diseases*, **38**(10), pp.901-913, DOI: 10.1111/jfd.12304.
- [12] N.N. Phuoc, N.T.H. Linh, N.T.X. Hong (2020), "Initial research on disease caused by *Flavobacterium columnare* bacteria on tilapia (*Oreochromis* sp.) raised in Thua Thien Hue", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **7**, pp. 109-116 (in Vietnamese).
- [13] A.M. Declercq, F. Haesebrouck, W.V. Broeck, et al. (2013), "Columnaris disease in fish: A review with emphasis on bacterium-host interactions", *Veterinary Research*, **44**(1), pp.1-17, DOI: 10.1186/1297-9716-44-27.
- [14] K.D. Cain, B.R. LaFrentz (2007), "Laboratory maintenance of *Flavobacterium psychrophilum* and *Flavobacterium columnare*", *Current Protocols in Microbiology*, **6**(1), DOI: 10.1002/9780471729259.mc13b01s6.
- [15] H. Kunttu, E.I. Jokinen, E.T. Valtonen, et al. (2011), "Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: Characterisation of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene", *Journal of Applied Microbiology*, **111**(6), pp.1319-1326, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05149.x.
- [16] J.F. Bernardet, P.A. Grimont (1989), "Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **39**(3), pp.346-354, DOI: 10.1099/00207713-39-3-346.
- [17] N.B. Buller (2004), *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*, CABI.
- [18] J.F. Bernardet, J.P. Bowman (2006), "The genus *flavobacterium*", *Prokaryotes*, **7**, pp.481-531, DOI: 10.1007/0-387-30747-8_17.
- [19] T.L. Welker, C.A. Shoemaker, C.R. Arias, et al. (2005), "Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*", *Diseases of Aquatic Organisms*, **63**(2-3), pp.129-138, DOI: 10.3354/dao063129.
- [20] H. Dong, S. Senapin, B. LaFrentz, et al. (2016), "Virulence assay of rhizoid and non-rhizoid morphotypes of *Flavobacterium columnare* in red tilapia, *Oreochromis* sp., fry", *Journal of Fish Diseases*, **39**(6), pp.649-655, DOI: 10.1111/jfd.12385.
- [21] P. Womongkol, S. Sukhavachana, K. Ampolsak, et al. (2018), "Genetic parameters for resistance against *Flavobacterium columnare* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)", *Journal of Fish Diseases*, **41**(2), pp.321-328, DOI: 10.1111/jfd.12728.
- [22] L.R. Suomalainen, H. Kunttu, E.T. Valtonen et al. (2006a), "Molecular diversity and growth features of *Flavobacterium columnare* strains isolated in Finland", *Diseases of Aquatic Organisms*, **70**(1-2), pp.55-61, DOI: 10.3354/dao070055.
- [23] B. Austin, D.A. Austin (2016), *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, Springer, DOI: 10.1007/978-3-319-32674-0.
- [24] C.A. Shoemaker, B.R. LaFrentz, E. Peatman et al. (2018), "Influence of native catfish mucus on *Flavobacterium columnare* growth and proteolytic activity", *Journal of Fish Diseases*, **41**(9), pp.1395-1402, DOI: 10.1111/jfd.12833.
- [25] B. Griffin (1991), "Characteristics of a chondroitin AC lyase produced by *Cytophaga columnaris*", *Transactions of the American Fisheries Society*, **120**(3), pp.391-395, DOI: 10.1577/1548-8659(1991)120<0391:COACAL>2.3.CO;2.
- [26] J.C. Newton, T.M. Wood, M.M. Hartley (1997), "Isolation and partial characterization of extracellular proteases produced by isolates of *Flavobacterium columnare* derived from channel catfish", *Journal of Aquatic Animal Health*, **9**(2), pp.75-85, DOI: 10.1577/1548-8667(1997)009<0075:IAPCOE>2.3.CO;2.
- [27] A. Decostere, F. Haesebrouck, L.A. Devriese (1998), "Characterisation of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish", *Veterinary Microbiology*, **62**(1), pp.35-45, DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00196-5.
- [28] C. Michel, S. Messiaen, J.F. Bernardet (2002), "Muscle infections in imported neon tetra, *Paracheirodon innesi* Myers: Limited occurrence of microsporidia and predominance of severe forms of columnaris disease caused by an Asian genomovar of *Flavobacterium columnare*", *Journal of Fish Diseases*, **25**(5), pp.253-263, DOI: 10.1046/j.1365-2761.2002.00364.x.
- [29] I. Dalsgaard (1993), "Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other Cytophaga-like bacteria pathogenic for fish", *Annual Review of Fish Diseases*, **3**, pp.127-144, DOI: 10.1016/0959-8030(93)90032-7.
- [30] A. Decostere (2002), "*Flavobacterium columnare* infections in fish: The agent and its adhesion to the gill tissue", *Verhandelingen-Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van België*, **64**(6), pp.421-430.
- [31] L.R. Suomalainen, H. Reunanen, R. Ijäs, et al. (2006b), "Freezing induces biased results in the molecular detection of *Flavobacterium columnare*", *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(2), pp.1702-1704, DOI: 10.1128/AEM.72.2.1702-1704.2006.

Ảnh hưởng của axit acetic lên hàm lượng kim loại nặng và thành phần dinh dưỡng của thịt sò huyết (*Anadara granosa*)

Nguyễn Phúc Cẩm Tú*

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 5/11/2021; ngày chuyển phản biện 9/11/2021; ngày nhận phản biện 7/12/2021; ngày chấp nhận đăng 13/12/2021

Tóm tắt:

Sò huyết (*Anadara granosa*) là một nguồn thực phẩm quan trọng và là một trong những đối tượng nuôi phổ biến ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Tuy nhiên, sò huyết là một loài động vật hai mảnh vỏ ăn lọc, nên có khả năng tích lũy các kim loại nặng (KLN) từ môi trường nước. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc ngâm cơ thịt sò huyết trong dung dịch axit acetic có nồng độ, thời gian khác nhau lên hàm lượng KLN (Cd và Pb) và thành phần dinh dưỡng trong cơ thịt. Hàm lượng Pb trong thịt sò huyết thu tại huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre cao hơn ngưỡng cho phép theo Quy chuẩn của Cộng đồng châu Âu (EC) và Bộ Y tế (BYT) (1,5 mg/kg). Trong khi đó, hàm lượng Cd trong thịt sò huyết cao hơn tiêu chuẩn của EC (1 mg/kg), nhưng thấp hơn tiêu chuẩn của BYT (2 mg/kg). Kết quả cho thấy, hiệu quả loại bỏ 2 KLN này trong cơ thịt sò huyết của dung dịch axit acetic loãng tăng khi tăng nồng độ và thời gian ngâm. Nồng độ axit acetic 5% và thời gian ngâm 15 phút là hiệu quả nhất để loại bỏ Cd và Pb ra khỏi mẫu sò huyết, đồng thời hàm lượng một số chất dinh dưỡng bị mất đi thấp nhất. Sau quá trình ngâm, hàm lượng Cd và Pb trong thịt sò thấp hơn ngưỡng cho phép theo quy chuẩn của EC và BYT.

Từ khóa: axit acetic, cadimi (Cd), chì (Pb), sò huyết, thành phần dinh dưỡng.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Động vật thân mềm hai mảnh vỏ (ĐV2MV), đặc biệt là sò huyết, là một nguồn thực phẩm quan trọng và là nguồn đạm protein quý, ngoài ra chúng còn cung cấp các khoáng chất cần thiết (Ca, Fe, Zn...) và vitamin (niacin, thiamin, riboflavin) cho bữa ăn hàng ngày của con người [1]. Tuy nhiên, do sò huyết thường được nuôi ở trong ao hoặc bãi triều giàu chất hữu cơ gần các cửa sông có dòng nước ngọt đổ vào, nên nguy cơ bị nhiễm các KLN như Cd và Pb từ nước thải của các khu đô thị và công nghiệp xung quanh. Theo N.P.C. Tu và cs (2011) [2], hàm lượng của các KLN trong sò huyết *Anadara* sp. thu mẫu tại Việt Nam thường khá cao, đặc biệt là sự tích lũy của Cd trong sò huyết ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Cụ thể, có hơn 30% số mẫu sò huyết phân tích có hàm lượng Cd vượt quá tiêu chuẩn EC (1 mg/kg trọng lượng - TL tươi), nhất là các mẫu thu tại Bến Tre, Trà Vinh và Sóc Trăng. Các kết quả giám sát vùng nuôi của Cục Quản lý Chất lượng Nông Lâm sản và Thủy sản (NAFIQAD) [3] cũng đã phát hiện sự tích lũy cao của KLN, đặc biệt là Cd trong ĐV2MV ở khu vực Nam Trung Bộ. Tất cả 67 mẫu ĐV2MV thu trong năm 2014 đều phát hiện thấy dư lượng Cd với hàm lượng từ 92 đến 6.780 mg/kg TL tươi. Trong đó, 13 mẫu cơ thịt thu ở Hàm Tân, Tuy Phong và Phan Thiết (Bình Thuận) có hàm lượng Cd cao hơn tiêu chuẩn EC và 6 mẫu cao hơn tiêu chuẩn Việt Nam (2 mg/kg TL tươi).

Hiện nay, ở các nước châu Âu, Mỹ và Úc, nuôi lọc sạch (depuration) là quy trình bắt buộc để làm giảm bớt mức độ

nhiễm bản vi sinh gây bệnh và chất ô nhiễm trong ĐV2MV thu hoạch làm thực phẩm cho con người [4-7]. Phương pháp này bao gồm việc nuôi giữ ĐV2MV 48 giờ trong nước biển đã được vô trùng (bằng ozone, đèn UV, chlorine, iốt) giàu oxy và không cho ăn. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ có hiệu quả trong việc loại bỏ vi sinh vật gây bệnh, không có khả năng loại bỏ các KLN [4-7]. Có nhiều phương pháp xử lý và tác nhân khác nhau để giảm hàm lượng KLN tích lũy trong thực phẩm thủy sản, trong đó rửa/ngâm trong các dung dịch axit hữu cơ, nhất là axit acetic (dấm ăn) thường được sử dụng do có chi phí thấp, hiệu quả cao, không gây độc cho người và có tác dụng kéo dài thời gian bảo quản [8, 9]. T. Elnimr (2011) [10] nhận thấy, ngâm cơ thịt cá basa và rô phi trong axit acetic 5% có thể giúp giảm từ 29 đến 58% hàm lượng Cd và 24-54% hàm lượng Pb. Tương tự, M.B. Atta và cs (2015) [11] ghi nhận khi ngâm phôi cá đối mục (*Mugil cephalus*) trong dung dịch axit acetic (1-5%) trong thời gian 1-3 phút trước khi nấu giúp giảm hàm lượng Cd và Pb trong cơ thịt cá. Nghiên cứu ngâm vẹm xanh (*Perna viridis*) khô trong dung dịch axit acetic (10, 15, 20 và 25%) trong các khoảng thời gian khác nhau (0, 30, 60 và 90 phút), N.H. Suprapti và cs (2016a) [12] nhận thấy, tăng nồng độ axit và thời gian ngâm sẽ tăng hiệu quả loại bỏ KLN. Tuy nhiên, khi ngâm trong dung dịch dấm ăn có thể ảnh hưởng đến thành phần dinh dưỡng của sản phẩm.

Mục đích của nghiên cứu này là phát triển một phương pháp loại bỏ các KLN ra khỏi cơ thịt sò một cách an toàn. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của

*Email: npctu@hcmuaf.edu.vn

Effects of acetic acid on toxic metal content and proximate composition in the muscle of blood cockle (*Anadara granosa*)

Phuc Cam Tu Nguyen*

Faculty of Fisheries, Nong Lam University,
Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 15 November 2021; revised 7 December; accepted 13 December 2021

Abstract:

Blood cockle *Anadara granosa* is an important food source and one of the most commonly cultured species in the Mekong delta. But, cockle is a filter feeder, it can accumulate toxic metals from the water environment. This study aims conducted to evaluate the soaking effects of acetic acid in different concentrations at different times on the levels of Cd and Pb and proximate nutritional composition in the soft tissues. The levels of Pb in cockle tissue collected from Binh Dai district, Ben Tre province were over the permissible limits set by the European Commission (EC) and the Vietnamese Ministry of Health (MOH) (1.5 mg/kg). Concentrations of Cd in tissue were higher than the EC guideline of 1.0 mg/kg but lower than the MOH guideline of 2.0 mg/kg. The results showed that the removal efficiencies of two metals in cockle tissues with acetic acid were increased with increasing a range of acid concentration and soaking time. The highest removal efficiency of Cd and Pb was achieved with an acetic acid concentration of 5% and soaking in 15 minutes with minimum loss in the nutritive value of cockle tissue. After the soaking process, the levels of Cd and Pb in the tissue of the cockle were below the permissible limits recommended by the EC and the MOH.

Keywords: acetic acid, blood cockle, cadmium, lead, nutritional composition.

Classification number: 4.5

việc ngâm cơ thịt sò huyết trong dung dịch axit acetic có nồng độ khác nhau (2 và 5%) trong thời gian khác nhau (15 và 30 phút) lên hàm lượng KLN (Cd và Pb) và thành phần dinh dưỡng trong cơ thịt trước và sau xử lý.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Mẫu sò huyết được thu từ vùng nuôi ở huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre, chỉ chọn lấy mẫu sò huyết có kích cỡ thương phẩm 100-120 con/kg.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xử lý mẫu: Sò huyết sau khi thu mẫu được rửa sơ bằng nước tại vùng nuôi để loại bỏ chất bẩn bám bên ngoài vỏ. Sau đó được đóng vào bao nylon PE, vận chuyển về phòng thí nghiệm của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh và được bảo quản trong tủ đông (-18°C). Khi tiến hành thí nghiệm, mẫu sò được rửa đông và rửa sạch bên ngoài, tách lấy phần cơ thịt.

Phương pháp thí nghiệm: Thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của 2 nồng độ axit acetic (2 hay 5%) và thời gian ngâm (15 hay 30 phút) lên hàm lượng Cd, Pb và một số chất dinh dưỡng (protein, photpho - P, sắt - Fe) của mẫu trước và sau quá trình xử lý. Mỗi nghiệm thức được tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi lần bố trí 60 mẫu cơ thịt sò (có tổng TL khoảng 200 g) với 500 ml axit acetic trong 1 beaker thủy tinh 1.000 ml. Trước và sau khi thí nghiệm, mẫu cơ thịt sò được rửa sạch bằng nước cất hai lần, xay nhuyễn bằng máy xay thịt gia dụng, được đóng vào bao nylon PE và trữ trong tủ đông (-18°C) trước khi tiến hành phân tích hóa học.

Phương pháp phân tích KLN: Trước khi vô cơ hóa, mẫu được rửa đông ở nhiệt độ phòng. Cân 1 g mẫu cho vào ống COD thủy tinh nắp có lót màng Teflon (đã rửa sạch bằng axit), thêm 2 ml HNO₃ đậm đặc (Emsure®, Merck, 65%) và gia nhiệt bằng bộ phá mẫu (block digester) ở 150°C trong 2 giờ. Sau đó, mẫu được làm nguội ở nhiệt độ phòng, thêm 1 ml H₂O₂ (Emsure®, Merck, 30%) và gia nhiệt tiếp bằng bộ phá mẫu trong 1 giờ ở 150°C cho tới khi dung dịch không màu hoặc có màu vàng nhạt, để nguội. Thêm 1 ml HCl (Emsure®, Merck, 37%) và định mức 25 ml bằng nước cất hai lần. Để xác định hàm lượng Cd và Pb, lấy mẫu đo trực tiếp bằng máy phổ khối lượng plasma cảm ứng cao tần (ICP-MS, Agilent 7700, Mỹ). Các phân tích KLN được thực hiện tại Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

Để kiểm soát chất lượng phân tích, các dung dịch mẫu trắng và mẫu thử kiểm tra (thêm chuẩn) được phân tích song song với các dãy mẫu được phân tích. Độ chính xác của phương pháp phân tích hàm lượng của các KLN trong mẫu sò huyết được đánh giá bằng mẫu chuẩn đối chứng của Hội đồng Nghiên cứu Quốc gia Canada: mẫu protein cá DORM-4, mỗi mẫu được phân tích lặp lại 4-5 lần. Hiệu suất thu hồi của 2 KLN nằm trong khoảng 93-105% giá trị chuẩn đã được công nhận. Giới hạn phát hiện (LOD) của Cd và Pb lần lượt là 0,012 và 0,019 mg/kg.

Phương pháp phân tích dinh dưỡng: Mẫu cơ thịt sò huyết xay nhuyễn được sấy khô ở 60°C trong 48 giờ, nghiền mịn và dùng để phân tích các chỉ tiêu dinh dưỡng là protein, P và Fe. Hàm lượng protein xác định bằng phương pháp Kjeldahl. Để xác định P và Fe, mẫu sò sau khi tro hóa ở 550°C trong 6 giờ được hòa tan trong HCl 6 M, định mức lên 50 ml và lọc. Hàm lượng P và Fe lần lượt được xác định theo phương pháp so màu với acid ascorbic và o-phenanthroline. Thành phần dinh dưỡng được phân tích tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh.

Các kết quả hàm lượng của 2 KLN và dinh dưỡng trong mẫu được biểu diễn trên TL tươi bằng đơn vị mg/kg, trừ protein là %.

Phương pháp phân tích thống kê: Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện theo hướng dẫn của K.A. Gomez và cs (1984) [13] bằng phần mềm SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (IBM). Sự khác biệt về hàm lượng KLN và chất dinh dưỡng giữa các nghiệm thức được thực hiện bằng phân tích phương sai hai yếu tố (two-way ANOVA) với Duncan multiple range test được dùng như kiểm định so sánh đối chiếu. Mức xác suất $p < 0,05$ được chấp nhận như tiêu chuẩn đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hàm lượng KLN và dinh dưỡng trong thịt sò huyết

Hàm lượng KLN và dinh dưỡng trong mẫu sò huyết thu từ huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre được trình bày ở bảng 1. Hàm lượng Cd và Pb trung bình trong thịt sò huyết lần lượt là $1,21 \pm 0,12$ mg/kg và $1,89 \pm 0,29$ mg/kg. Hàm lượng của 2 KLN này trong thịt sò huyết tương tự với kết quả nghiên cứu của N.P.C. Tu và cs (2011) [2] ở Đồng bằng sông Cửu Long và S.M. Yunus và cs (2014) [14] ở Kuala Selangor, Malaysia. Hàm lượng Cd trong thịt sò huyết trong nghiên cứu này cao hơn hàm lượng tối đa cho phép theo khuyến cáo của EC (1 mg/kg) [15], nhưng thấp hơn quy chuẩn của BYT (2 mg/kg) [16]. Trong khi đó, hàm lượng Pb cao hơn giới hạn cho phép theo hướng dẫn của EC và BYT (1,5 mg/kg) [15, 16].

Bảng 1. Hàm lượng KLN và dinh dưỡng trong thịt sò huyết thu tại huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre.

	Cd (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Protein (%)	P (mg/kg)	Fe (mg/kg)
QCVN 8-2:2011/BYT 2	$1,21 \pm 0,12$	$1,89 \pm 0,29$	$11,0 \pm 0,2$	1.400 ± 25	293 ± 8
Tiêu chuẩn EC số 1881/2006	1	1,5			

Hàm lượng protein, P và Fe ban đầu trong thịt sò huyết lần lượt là $11,0 \pm 0,2\%$, 1.400 ± 25 mg/kg và 293 ± 8 mg/kg (bảng 1). Hàm lượng protein trong nghiên cứu này tương đồng với phát hiện của T.T. Nguyen và cs (2017) [17] (11,7-13,9%) thu mẫu ở tỉnh Yeosu, Hàn Quốc, nhưng thấp hơn trong nghiên cứu của N.H. Suprapti và cs (2016b) [18] (21,9%) ở miền Trung Java, Indonesia. T.T. Nguyen và cs (2017) [17] cũng báo cáo hàm lượng P trong thịt sò huyết thu ở tỉnh Yeosu, Hàn Quốc nằm trong khoảng 1.327-1.528 mg/kg. Hàm lượng Fe trong sò huyết của nghiên cứu này cao hơn trong sò huyết thu ở Hàn Quốc (73-86 mg/kg) [17], tỉnh Gorontalo, Indonesia (228-248 mg/kg) [19], nhưng thấp hơn trong sò thu ở Kuala Selangor, Malaysia (530-1.344 mg/kg) [14].

3.2. Ảnh hưởng của axit acetic đến hàm lượng KLN

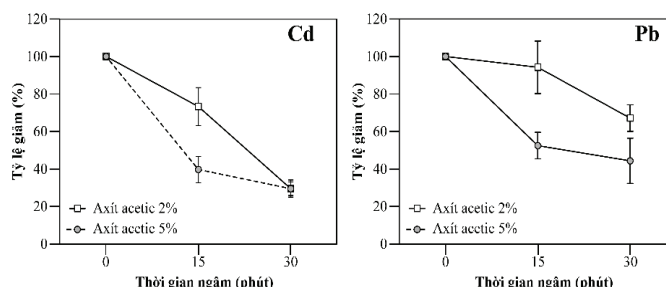
Sau khi ngâm mẫu trong axit acetic ở nồng độ 2 và 5%, chúng tôi đã ghi nhận được những ảnh hưởng của axit acetic trong việc loại bỏ bớt hàm lượng Cd ra khỏi mẫu sò huyết.

Hàm lượng Cd ở tất cả các nghiệm thức đều đã giảm so với hàm lượng ban đầu sau khi ngâm mẫu bằng axit acetic ($p < 0,05$). Cụ thể, với axit acetic nồng độ 2%, sau khi ngâm 15 phút hàm lượng Cd đã giảm từ 1,21 xuống còn 0,880 mg/kg (giảm 27%) và sau 30 phút hàm lượng này chỉ còn 0,352 mg/kg (giảm hơn 70%). Với axit acetic nồng độ 5%, xu hướng giảm càng thể hiện rõ hơn, hàm lượng Cd trong mẫu sau thời gian ngâm 15 và 30 phút chỉ còn lại tương ứng là 0,476 (giảm hơn 60%) và 0,353 mg/kg (giảm khoảng 70%) (bảng 2 và hình 1). Sự khác biệt về hàm lượng Cd trong thịt sò huyết sau khi ngâm trong dung dịch axit 2 (trong 30 phút) và 5% (ở cả 2 nghiệm thức thời gian) không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Nhưng hàm lượng Cd trong thịt sò huyết ở các nghiệm thức này thấp hơn có ý nghĩa so với ngâm trong dung dịch axit 2% (15 phút) và ban đầu ($p < 0,05$).

Bảng 2. Hàm lượng KLN (mg/kg, trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn) trong cơ thịt sò huyết trước và sau khi ngâm axit acetic.

Chỉ tiêu	Ban đầu	Axit acetic (2%)		Axit acetic (5%)	
		15 phút	30 phút	15 phút	30 phút
Cd	$1,21 \pm 0,12^a$	$0,880 \pm 0,120^b$	$0,352 \pm 0,022^c$	$0,476 \pm 0,080^c$	$0,353 \pm 0,008^c$
Pb	$1,89 \pm 0,29^a$	$1,76 \pm 0,05^a$	$1,26 \pm 0,06^b$	$0,978 \pm 0,010^c$	$0,815 \pm 0,115^c$

Các giá trị trung bình trong cùng một hàng có cùng ký tự chữ cái chỉ sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian ngâm axit acetic lên tỷ lệ giảm Cd và Pb (%) trong cơ thịt sò huyết.

Tương tự đối với Pb, sau khi ngâm mẫu bằng axit acetic với 2 nồng độ ở 2 thời điểm khác nhau, hàm lượng trong thịt sò huyết ở tất cả các nghiệm thức đều giảm so với hàm lượng ban đầu (bảng 2). Nhưng so với Cd, tỷ lệ giảm hàm lượng Pb thấp hơn. Ở nồng độ 2%, tỷ lệ giảm hàm lượng Pb chỉ hơn 6% sau 15 phút và 33% sau 30 phút; trong khi đó, ở nồng độ 5% hàm lượng Pb chỉ giảm khoảng 51% sau 15 phút ngâm (hình 1). Khi tăng nồng độ dung dịch axit và thời gian ngâm có tác dụng làm giảm hàm lượng Pb trong thịt sò huyết có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả thí nghiệm cho thấy, dung dịch axit acetic loãng có khả năng làm giảm đáng kể hàm lượng KLN, đặc biệt là Cd ra khỏi mẫu sò huyết. Hàm lượng Cd trong mẫu ở tất cả các nghiệm thức đều có giá trị nhỏ hơn 1 mg/kg (tiêu chuẩn của EC), nhưng hàm lượng Pb trong cơ thịt sò chỉ thấp hơn giới hạn cho phép của EC và BYT (1,5 mg/kg) khi ngâm ở nồng độ 2% trong 30 phút hoặc nồng độ 5% trong 15-30 phút.

Tác động của axit acetic lên việc giảm hàm lượng KLN có thể là do ảnh hưởng của giá trị pH lên quá trình hòa tan của các KLN như thủy giải, tạo phức với các phối tử hữu cơ và vô cơ, phản ứng oxy hóa khử, kết tủa và hấp phụ của các KLN [20]. Ở ĐV2MV như sò huyết, Cd thường liên kết với các protein giống metallothionein (MT), là những protein có TL phân tử thấp (6-8 kDa) giàu cystein. Trong khi đó, Pb thường tạo phức với các polypeptid có TL phân tử thấp giàu cystein [21] và các nhóm chức liên kết kim loại yếu như carboxyl, phenyl cũng như các nhóm chức chứa lưu huỳnh và nitơ liên kết kim loại mạnh [8]. Khi pH dung dịch giảm, các KLN này dễ dàng bị cắt đứt khỏi các liên kết. Khi tăng nồng độ axit sẽ làm tăng năng lượng để cắt đứt các liên kết này và khi kéo dài thời gian ngâm sẽ tăng thời gian tiếp xúc giữa tác nhân tạo phức và các liên kết kim loại [12]. Theo T. Elnimr (2011) [10], hàm lượng KLN giảm trong quá trình ngâm bằng axit acetic có thể là do sự tạo thành các muối acetate không tan của các KLN này.

H. Ren và cs (2008) [22] đã tiến hành nghiên cứu về khả năng loại bỏ dư lượng Cd ra khỏi nội tạng của chuột quạ (*Mimachlamys nobilis*) của dung dịch axit acetic 2%, axit citric 2% và nước ấm, thí nghiệm được thực hiện qua 4 lần rửa. Kết quả cho thấy, axit acetic 2% là hiệu quả nhất giúp làm giảm hàm lượng Cd từ 38,9 mg/kg ban đầu giảm xuống còn 29,3 mg/kg sau lần rửa thứ nhất và sau lần rửa thứ tư chỉ còn 0,6 mg/kg. T. Elnimr (2011) [10] thí nghiệm làm giảm hàm lượng các KLN (Cd, Hg, Mn, Pb, Zn) trong cơ thịt cá ba sa và rô phi. Các mẫu cá được ngâm trong axit acetic 5% trong 15 phút, sau đó rửa bằng nước sạch. Kết quả cho thấy, hàm lượng Cd và Pb trong cơ thịt cá đã giảm đáng kể so với lượng ban đầu. Thịt cá ba sa ngâm trong axit acetic 5%, hàm lượng Cd đã giảm từ 0,12 xuống còn 0,05 mg/kg (gần 60%) và hàm lượng Pb đã giảm từ 0,79 xuống còn 0,41 mg/kg (gần 50%). Ở cá rô phi, xử lý cơ thịt bằng axit acetic đã giảm hàm lượng Cd từ 0,12 xuống còn 0,07 mg/kg (hơn 40%) và hàm lượng Pb đã giảm từ 0,83 xuống còn 0,2 mg/kg (hơn 75%). M.B. Atta và cs (2015) [11] thử nghiệm ngâm phôi cá đối mục (*Mugil cephalus*) trong dung dịch axit acetic (1-5%) trong thời gian 1-3 phút lên hàm lượng Cd và Pb. Hiệu quả xử lý Cd và Pb đạt cao nhất tương ứng là 25 và 31% ở nồng độ 5% sau thời gian ngâm 3 phút. Hiệu suất xử lý thấp là do hàm lượng Cd và Pb ban đầu trong cơ thịt cá đối mục thấp hơn trong sò huyết và thời gian ngâm cũng ngắn hơn (40% Cd, 50% Pb). N.H. Suprapti và cs (2016a) [12] ghi nhận kết quả khi ngâm thịt vẹm xanh khô trong dung dịch axit acetic 25% và thời gian

90 phút, hàm lượng Cd và Pb trong thịt vẹm lần lượt giảm 40 và 50%.

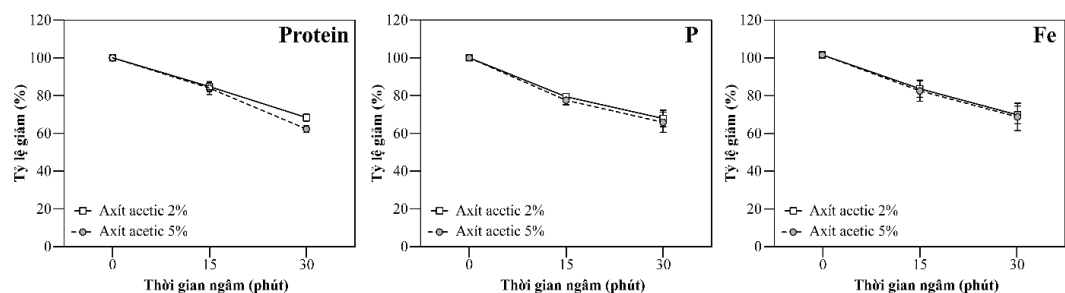
3.3. Ảnh hưởng của axit acetic đến thành phần dinh dưỡng

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, thời gian ngâm có tác động lớn hơn nồng độ axit acetic lên hàm lượng các chất dinh dưỡng. Sau khi ngâm mẫu sò huyết bằng axit acetic 2%, hàm lượng protein đã bị giảm đi ở các khoảng thời gian ngâm khác nhau. Cụ thể, mẫu ban đầu có hàm lượng protein tổng số là 11,0%, sau 15 phút ngâm dung dịch axit acetic 2%, hàm lượng protein đã giảm xuống còn 9,34% và sau 30 phút ngâm, hàm lượng protein chỉ còn 7,53% ($p < 0,05$). Ở nồng độ axit acetic 5%, hàm lượng protein trong mẫu sau thời gian ngâm 15 và 30 phút tương ứng chỉ còn lại 9,24 và 6,86% ($p < 0,05$) (bảng 3 và hình 2).

Bảng 3. Hàm lượng dinh dưỡng (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn) trong cơ thịt sò huyết trước và sau khi ngâm axit acetic.

Chỉ tiêu	Ban đầu	Axit acetic (2%)		Axit acetic (5%)	
		15 phút	30 phút	15 phút	30 phút
Protein (%)	11,0 $\pm$ 0,2 ^a	9,34 $\pm$ 0,44 ^b	7,53 $\pm$ 0,13 ^c	9,24 $\pm$ 0,18 ^b	6,86 $\pm$ 0,11 ^d
P (mg/kg)	1.400 $\pm$ 25 ^a	1.082 $\pm$ 83 ^b	945 $\pm$ 42 ^c	1.047 $\pm$ 13 ^b	902 $\pm$ 27 ^c
Fe (mg/kg)	293 $\pm$ 8 ^a	225 $\pm$ 22 ^b	195 $\pm$ 13 ^{cd}	216 $\pm$ 6 ^{bc}	179 $\pm$ 13 ^d

Các giá trị trung bình trong cùng một hàng có cùng ký tự chỉ sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian ngâm axit acetic lên hàm lượng dinh dưỡng trong cơ thịt sò huyết.

Trong khi đó, với nồng độ axit acetic 2%, sau thời gian ngâm 15 phút, hàm lượng P đã giảm từ 1.400 xuống 1.082 mg/kg (giảm 23%) và sau 30 phút thì tiếp tục giảm xuống còn 945 mg/kg (giảm 32%) ($p < 0,05$). Ở nồng độ axit acetic 5%, hàm lượng P trong mẫu sau thời gian ngâm 15 và 30 phút tương ứng chỉ còn lại 1.047 mg/kg (giảm 23%) và 902 mg/kg (giảm 35%) ($p < 0,05$) (bảng 3 và hình 2). Sự khác biệt về hàm lượng P giữa 2 nồng độ axit acetic sử dụng và thời gian không nhiều.

Tương tự, sự suy giảm hàm lượng Fe trong các mẫu sò huyết trước và sau khi xử lý axit acetic tương đối cao, tỷ lệ giảm khoảng 30-40% (bảng 3 và hình 2). Ở nồng độ axit

acetic 2%, hàm lượng Fe ban đầu trong mẫu là 293 mg/kg, sau thời gian ngâm 15 và 30 phút giảm tương ứng còn 225 và 195 mg/kg. Trong khi đó, ở nồng độ axit acetic 5%, sau thời gian ngâm 15 và 30 phút giảm tương ứng còn 216 và 179 mg/kg (bảng 3).

Như vậy, việc ngâm cơ thịt sò huyết trong dung dịch axit loãng ở các nồng độ axit acetic và thời gian khác nhau đã làm giảm hàm lượng các chất dinh dưỡng trong sò huyết. Các kết quả này cũng tương đồng với các báo cáo trước đây [11, 22]. H. Ren và cs (2008) [22] báo cáo hàm lượng tổng nitơ khi sử dụng axit acetic bị hao hụt thấp hơn khi xử lý bằng axit citric 2%. Sau quá trình xử lý, hàm lượng nitơ trong phụ phẩm sò huyết hầu như không thay đổi. Theo M.B. Atta và cs (2015) [11], nồng độ axit acetic và thời gian ngâm có ảnh hưởng không đáng kể đến hàm lượng protein (không thay đổi) và P (giảm 5%) trong cơ thịt cá.

4. Kết luận

Từ các kết quả của nghiên cứu này có thể kết luận rằng, hiệu quả loại bỏ KLN trong cơ thịt sò huyết của dung dịch axit loãng tăng khi tăng nồng độ và thời gian ngâm. Nồng độ axit acetic 5% và thời gian ngâm 15 phút là hiệu quả nhất để loại bỏ Cd và Pb ra khỏi mẫu cơ thịt sò huyết, đồng thời hàm lượng một số chất dinh dưỡng bị mất đi thấp nhất. Phương pháp xử lý KLN bằng dung dịch axit loãng đơn giản, có chi phí thấp, sản phẩm sau khi xử lý đạt tiêu chuẩn an toàn vệ sinh thực phẩm. Đây có thể được xem là một trong những phương pháp tiềm năng trong việc xử lý các sản phẩm thủy sản bị nhiễm bẩn các KLN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.C. Amiard, C.A. Triquet, L. Charbonnier, et al. (2008), "Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia", *Food and Chemical Toxicology*, **46**(6), pp.2010-2022, DOI: 10.1016/j.fct.2008.01.041.
- [2] N.P.C. Tu, N.N. Ha, T. Agusa et al. (2011), "Trace elements in *Anadara* spp. (Mollusca: Bivalva) collected along the coast of Vietnam, with emphasis on regional differences and human health risk assessment", *Fisheries Science*, **77**(6), pp.1033-1043, DOI: 10.1007/s12562-011-0410-3.
- [3] National Agro-Forestry-Fisheries Quality Assurance Department (NAFIQAD) (2015), *Results of Sanitation Monitoring Program for Bivalve Mollusc Production Areas in 2014 and Plan for Program Implementation in 2015*.
- [4] K.L. Jackson, D.M. Ogburn (1999), *Review of Depuration and Its Role in Shellfish Quality Assurance*, New South Wales Shellfish Quality Assurance Program.
- [5] NSSP (2015), *Guide for The Control of Molluscan Shellfish 2015 Revision (F.a.D.A. US Department of Health and Human Services, National Shellfish Sanitation Program*.
- [6] D. Lees, A. Younger, B. Dore (2010), *Depuration and Relaying, Safe Management of Shellfish and Harvest Waters*.
- [7] Codex Alimentarius Commission (2012), *Code of Practice for Fish and Fishery Products*.

- [8] P. Hajeb, J.J. Sloth, S. Shakibazadeh, et al. (2014), "Toxic elements in food: Occurrence, binding, and reduction approaches", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **13**(4), pp.457-472, DOI: 10.1111/1541-4337.12068.
- [9] H.M. Hyok (2009), *The Effect of Dipping Treatment on Preservation of Fish (Mackerel) Using Chitosan, Sorbate and Acetic Acid*, United Nations University.
- [10] T. Elnimr (2011), "Evaluation of some heavy metals in *Pangasius hypophthalmus* and *Tilapia nilotica* and the role of acetic acid in lowering their levels", *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, **3**(8), pp.151-157.
- [11] M.B. Atta, M.A. Salem, M.E. Elsayed, et al. (2015), "Effect of acetic acid and cooking process on chemical composition and metal contents of polluted grey mullet (*Mugil cephalus*) fish", *Journal of Food and Dairy Sciences, Mansoura University*, **6**(2), pp.159-175, DOI: 10.21608/JFDS.2015.48542.
- [12] N.H. Suprapti, A.N. Bambang, F. Swastawati, et al. (2016a), "Removal of heavy metals from a contaminated green mussel [*Perna viridis* (Linnaeus, 1758)] using acetic acid as chelating agents", *Aquatic Procedia*, **7**, pp.154-159, DOI: 10.1016/j.aqpro.2016.07.021.
- [13] K.A. Gomez, A.A. Gomez (1984), *Statistical Procedures for Agricultural Research*, John Wiley & Sons.
- [14] S.M. Yunus, Z. Hamzah, N.A.N. Ariffin, et al. (2014), "Cadmium, chromium, copper, lead, ferum and zinc levels in the cockles (*Anadara granosa*) from Kuala Selangor, Malaysia", *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, **18**(3), pp.514-521.
- [15] EC (2006), "Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs", *Official Journal of The European Union*, **L364**, pp.5-24.
- [16] Ministry of Health (2011), *National Technical Regulations on Limits of Heavy Metal Contamination in Food (QCVN 8-2:2011/BYT)* (in Vietnamese).
- [17] T.T. Nguyen, Y.J. Choi, Z. Rohmah, et al. (2017), "Seasonal variations of nutritional components in cockles (*Tegillarca granosa*) processed from the Southern Coast of Korea", *Cogent Food & Agriculture*, **3**(1), DOI: 10.1080/23311932.2017.1360102.
- [18] N.H. Suprapti, N. Heru, B. Bambang (2016b), "Analysis of heavy metal content in *Anadara granosa* (Linnaeus, 1758): A case study of 10 markets in Semarang, Central Java, Indonesia", *Jurnal Teknologi*, **78**(4-2), pp.151-157.
- [19] M. Solang, L. Djuna, U. Ramli, et al. (2021), "Assessment of zinc, iron, and microbes concentrations in blood cockles (*Anadara granosa*) as complementary foods and implications for reducing of micronutrition deficiency", *Research Journal of Pharmacy and Technology*, **14**(6), DOI: 10.52711/0974-360X.2021.00591.
- [20] A. Esposito, F. Pagnanelli, F. Vegliò (2002), "pH-related equilibria models for biosorption in single metal systems", *Chemical Engineering Science*, **57**(3), pp.307-313, DOI: 10.1016/S0009-2509(01)00399-2.
- [21] K. Chan, R. Othman, D. Zubir, et al. (2002), "Induction of a putative metallothionein gene in the blood cockle, *Anadara granosa*, exposed to cadmium", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **131**(2), pp.123-132, DOI: 10.1016/S1532-0456(01)00293-9.
- [22] H. Ren, Y. Okamoto, H. Jia, et al. (2008), "Removal of cadmium from scallop processing waste by washing with weak acid solution and utilization of useful constituents for organic fertilizer manufacturing", *Fisheries Science*, **74**(1), pp.187-192, DOI: 10.1111/j.1444-2906.2007.01509.x.

Chọn lọc các tổ hợp lai ngô nếp tím ưu tú bằng phương pháp chọn lọc đa biến MGIDI tại Việt Nam

Phạm Quang Tuấn¹, Nguyễn Trung Đức^{1*}, Nguyễn Thị Nguyệt Anh¹, Vũ Văn Liệt²

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 14/9/2022; ngày chuyển phản biện 17/9/2022; ngày nhận phản biện 10/10/2022; ngày chấp nhận đăng 14/10/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm chọn lọc các tổ hợp lai (THL) ngô nếp tím ưu tú chọn tạo tại Việt Nam bằng phương pháp chọn lọc đa biến bằng chỉ số MGIDI (chỉ số khoảng cách kiểu gen đa tính trạng) dựa trên các tính trạng sinh trưởng, năng suất, chất lượng phục vụ công nhận lưu hành giống ngô nếp tím mới tại các tỉnh phía Bắc Việt Nam. Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ với 3 lần nhắc lại, đánh giá 25 THL triển vọng với 2 giống đối chứng trong 2 vụ xuân và đông 2021 tại Hà Nội. Kết quả chọn lọc THL ngô nếp tím theo MGIDI trong vụ xuân và đông 2021 xác định được 2 THL triển vọng nhất với MGIDI có tiềm năng thương mại hóa là THL01 (D161 x FP1, đặt tên là VNUA261, MGIDI=1,449 trong vụ xuân và 1,869 trong vụ đông) và THL02 (Q2151 x FP1, đặt tên là VNUA191, MGIDI=1,218 trong vụ xuân và 0,404 trong vụ đông) với thời gian thu bắp tươi VNUA261 70-75 ngày, VNUA191 66-73 ngày; năng suất bắp tươi VNUA261 đạt 12,51-13,85 tấn/ha, VNUA191 đạt 12,24-13,56 tấn/ha; chất lượng ăn tươi tốt, vỏ hạt mỏng ($\leq 60 \mu\text{m}$); hàm lượng anthocyanin cao, trong đó VNUA261 đạt 112,93-124,07 mg/100 g hạt khô, VNUA191 đạt 100,33-119,57 mg/100 g hạt khô.

Từ khóa: chọn lọc đa biến, MGIDI, ngô nếp tím, VNUA191, VNUA261.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Ngô nếp tím là nguồn dinh dưỡng tuyệt vời cho sức khỏe với đặc trưng giàu chất kháng oxy hóa anthocyanins ở hạt giúp tăng cường trí nhớ, bảo vệ hệ tim mạch [1, 2]. Tại Việt Nam, ngô nếp tím và sắc tố anthocyanins đã được các nhà khoa học tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam tập trung nghiên cứu từ phát triển dòng, đánh giá khả năng kết hợp, so sánh THL triển vọng, công nhận lưu hành giống, với giống VNUA141 là giống ngô nếp tím lai đơn đầu tiên được chọn tạo bởi các nhà khoa học tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam [3-9]. Kế thừa các dòng ngô triển vọng, nhiều THL ngô nếp tím mới đã được các nhà khoa học tại đây lai tạo, do đó cần tiến hành đánh giá để xác định các THL triển vọng có năng suất, chất lượng cao, thích nghi rất tốt với điều kiện khí hậu miền Bắc Việt Nam thông qua các phương pháp chọn lọc phù hợp để đạt lợi ích di truyền cao nhất.

Gần đây, T. Oliveto và cs (2021) [10] đã giới thiệu MGIDI dễ dàng sử dụng không chỉ chọn lọc hiệu quả kiểu gen ưu tú mà còn có thể đồng thời xem xét nhiều tính trạng và hoặc cũng như đánh giá điểm mạnh và yếu của các kiểu gen được thử nghiệm. Trên thế giới, MGIDI đã được dùng để chọn ra các kiểu gen đầu tây [11] và lúa mạch chịu mặn [12]. Tại Việt Nam, MGIDI đã được đề xuất áp dụng chọn

lọc dòng và THL triển vọng trên cây ngô bởi N.T. Duc và cs (2021) [13] và áp dụng chọn lọc THL ngô lai giữa nếp với đường bởi Nguyễn Thị Nguyệt Anh và cs (2022b) [14]; chọn lọc THL ngô ăn tươi giàu anthocyanin bởi P.Q. Tuan và cs (2022) [8].

Kế thừa các kết quả lai tạo THL từ tập đoàn dòng ngô nếp tím của Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng (NC&PTCT) với 25 THL ngô nếp tím ưu tú, nghiên cứu này tiến hành so sánh các đặc điểm nông học, năng suất, chất lượng trong vụ xuân và đông năm 2021 và áp dụng phương pháp chọn lọc đa biến MGIDI nhằm chọn lọc các THL triển vọng nhất có năng suất cao, chất lượng tốt đưa vào hệ thống khảo nghiệm quốc gia, phục vụ công nhận lưu hành giống ngô nếp tím mới tại các tỉnh phía Bắc Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu gồm 25 THL ngô nếp tím ưu tú kế thừa từ tập đoàn các THL được lai tạo bởi Viện NC&PTCT, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Thí nghiệm so sánh các THL với 2 giống đối chứng là ngô nếp tím Fancy111 (nguồn gốc Thái Lan) và ngô nếp trắng HN88 (nguồn gốc Trung Quốc) (bảng 1).

*Tác giả liên hệ: Email: ntduc@vnua.edu.vn

Selection of elite purple waxy corn hybrids by MGIDI multivariate selection method in Vietnam

Quang Tuan Pham¹, Trung Duc Nguyen^{1*},
Thi Nguyet Anh Nguyen¹, Van Liet Vu²

¹Crops Research and Development Institute, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Agronomy, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 14 September 2022; revised 10 October 2022; accepted 14 October 2022

Abstract:

This study aims to select the elite purple waxy corn hybrids by Vietnam by multivariable selection method by multi-trait genotype-ideotype distance index (MGIDI) based on growth, yield, and quality traits for purple waxy corn varieties commercialisation in the North of Vietnam. The field experiment was arranged in a randomised complete block design with 3 replications and evaluated 25 crosses with two check varieties in the Spring and Winter season of 2021 in Hanoi. The results of the selection of purple waxy corn hybrids by MGIDI in the Spring and Winter 2021 season identified the two most promising hybrid combination having the MGIDI index with a commercial potential as THL01 (D161 x FP1, named VNUA261, MGIDI=1.449 in the Spring season and 1.869 in Winter season), and THL02 (Q2151 x FP1, named VNUA191, MGIDI=1.218 in Spring season and 0.404 in Winter season). The fresh corn harvest time of VNUA261 and VNUA191 ranged from 70-75 days and 66-73 days, respectively. Fresh corn yield of VNUA261 and VNUA191 reached 12.51-13.85 tons/ha and 12.24-13.56 tons/ha, respectively. Corn has good eating quality, thin pericarp ($\leq 60 \mu\text{m}$), and high anthocyanin content, in which VNUA261 reached 112.93-124.07 mg/100 g dry seed, VNUA191 reached 100.33-119.57 mg/100 g dry seed.

Keywords: MGIDI, multivariate selection, purple waxy corn, VNUA191, VNUA261.

Classification number: 4.6

Bảng 1. Danh sách các THL đánh giá và giống đối chứng.

STT	Ký hiệu	THL	Nguồn gốc
1	THL01	D161 × FP1	Viện NC&PTCT
2	THL02	Q2151 × FP1	Viện NC&PTCT
3	THL03	FP1 × Q2251	Viện NC&PTCT
4	THL04	FP1 × Q4373	Viện NC&PTCT
5	THL05	FP1 × NT41	Viện NC&PTCT
6	THL06	FP1 × Q2263	Viện NC&PTCT
7	THL07	FP1 × Q3221	Viện NC&PTCT
8	THL08	FP1 × Q4221	Viện NC&PTCT
9	THL09	FP1 × TL	Viện NC&PTCT
10	THL10	Q2242 × FP1	Viện NC&PTCT
11	THL11	Q2271 × FP1	Viện NC&PTCT
12	THL12	Q2341 × FP1	Viện NC&PTCT
13	THL13	Q2341 × FP2	Viện NC&PTCT
14	THL14	TD × FP1	Viện NC&PTCT
15	THL15	TL × NT41	Viện NC&PTCT
16	THL16	TL × NT62	Viện NC&PTCT
17	THL17	TL × Q2231	Viện NC&PTCT
18	THL18	TL × Q4352	Viện NC&PTCT
19	THL19	UV1 × FP1	Viện NC&PTCT
20	THL20	UV1 × NNT53	Viện NC&PTCT
21	THL21	UV1 × Q3221	Viện NC&PTCT
22	THL22	UV1 × Q4221	Viện NC&PTCT
23	THL23	UV1 × TL	Viện NC&PTCT
24	THL24	UV1 × D119	Viện NC&PTCT
25	THL25	UV1 × D181	Viện NC&PTCT
26	Fancy111	Giống đối chứng	Thái Lan
27	HN88	Giống đối chứng	Trung Quốc

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm đánh giá 25 THL ngô nếp tím và 2 giống đối chứng được bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh (RCBD), 3 lần nhắc lại, diện tích ô thí nghiệm 30 m² (6×5 m) trong vụ xuân và đông năm 2021 tại Viện NC&PTCT (Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội). Để tránh hiệu ứng Xenia - tác động của hạt phấn hoa khác loài đến sự hình thành hạt, ảnh hưởng tới chất lượng bắp tươi, tiến hành thực hiện thụ phấn bằng tay sử dụng bao cách ly nhằm tránh sự tung phấn chéo giữa các THL nghiên cứu. Đánh giá các đặc điểm nông học, năng suất và chất lượng ăn tươi theo quy chuẩn Việt Nam QCVN 01-56:2011/BNNPTNT và QCVN 01-66:2011/BNNPTNT [15, 16]. Đánh giá hàm lượng tổng chất rắn hòa tan (°Brix) vào giai đoạn chín sữa được đo theo phương pháp của M.D. Kleinhenz và cs (2012) [17]. Đo độ dày vỏ hạt bằng vi trắc kế theo phương pháp của E. Choe (2010) [18]. Phân tích hàm lượng anthocyanin tổng số bằng phương pháp pH vi sai theo M.M. Giusti và cs (2001) [19]; H.T.K. Cuc và cs (2004) [20]. Mô tả chi tiết các bước phân tích anthocyanin tổng số được trình bày trong nghiên cứu của Pham Quang Tuan và cs (2016) [3].

2.3. Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel, phân tích phương sai (ANOVA) sử dụng phần mềm Statistix ver. 10.0. Chọn lọc THL triển vọng bằng phương pháp đa biến MGIDI [10] bằng gói “metan” trên phần mềm R 4.1.1 (R Core Team, 2021). THL có chỉ số MGIDI càng thấp thì càng gần với kiểu hình giống lý tưởng. MGIDI có công thức như sau:

$$MGIDI_i = \left[\sum_{j=1}^f (y_{ij} - y_j)^2 \right]^{0.5}$$

trong đó $MGIDI_i$ là chỉ số khoảng cách kiểu gen đa tính trạng cho kiểu gen thứ i ; y_{ij} là điểm của hàng thứ i /kiểu gen/xử lý trong nhân tố thứ j ($i=1, 2, \dots, g$; $j=1, 2, \dots, f$); g là số kiểu gen; f là số yếu tố tương ứng; y_j là điểm thứ j của kiểu cây lý tưởng.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thời gian sinh trưởng, phát triển của các THL ngô nếp tím vụ xuân và đông năm 2021

Thời gian sinh trưởng của ngô được tính từ thời điểm gieo hạt cho đến khi hạt chín sinh lý biểu hiện ở đặc điểm lá bị khô hoặc chân hạt xuất hiện đốm đen và được chia thành hai thời kỳ chính là sinh dưỡng và sinh trưởng sinh thực. Trong mỗi thời kỳ lại chia ra các giai đoạn sinh trưởng khác nhau dựa vào các đặc điểm và yêu cầu sinh thái khác nhau. 25 THL ngô nếp tím và 2 giống đối chứng (Fancy111, HN88) được đánh giá trong vụ xuân và đông năm 2021 tại Gia Lâm, Hà Nội (bảng 2). Kết quả bảng 2 cho thấy, ở vụ xuân thời gian từ gieo đến mọc của các THL tương đối đồng đều nhau, dao động 6-8 ngày, tương tự đối chứng Fancy111 (8 ngày), HN88 (7 ngày). Thời gian từ gieo đến tung phần và phun râu của các THL dao động lần lượt là 51-60 ngày và 53-62 ngày. Đây là giai đoạn cây ngô chuyển từ sinh trưởng sinh dưỡng sang sinh thực, có ảnh hưởng quan trọng đến năng suất và yêu cầu nghiêm ngặt về các yếu tố ngoại cảnh. Tất cả các THL và giống đối chứng có thời gian tung phần, phun râu trùng với chênh lệch giữa 2 thời gian này ngắn (1-3 ngày), phù hợp cho quá trình thụ phấn diễn ra thuận lợi. Việc đánh giá thời gian từ khi gieo đến chín sữa có ý nghĩa đối với các giống ngô thực phẩm do liên quan đến thời gian cho thu hoạch bắp tươi trong thực tế sản xuất. Thời gian cho thu hoạch bắp tươi của các THL ngô nếp tím dao động 73-84 ngày, hầu như không có sai khác giữa các THL và so với 2 giống đối chứng, trừ THL02 (73 ngày) và THL23 (73 ngày) ngắn ngày hơn 2 giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Tương tự, thời gian từ khi gieo đến chín sinh lý của các THL ngô nếp tím dao động 89-99 ngày, trong đó THL23 sinh trưởng ngắn ngày hơn cả 2 giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

Bảng 2. Các giai đoạn sinh trưởng, phát triển của các THL ngô nếp tím vụ xuân và đông năm 2021.

THL	Gieo - mọc (ngày)		Gieo - tung phần (ngày)		Gieo - phun râu (ngày)		ASI (ngày)		Gieo - chín sữa (ngày)		Gieo - chín sinh lý (ngày)	
	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21
THL01	7	5	54	48	56	49	2	1	75	70	91	89
THL02	7	5	52	47	54	48	2	1	73	66	90	84
THL03	7	6	57	49	60	51	3	2	80	72	96	91
THL04	7	5	56	55	58	57	2	2	79	75	94	92
THL05	6	5	56	54	58	55	2	1	80	75	96	94
THL06	7	5	58	50	60	52	2	2	80	73	96	91
THL07	7	5	58	52	60	53	2	1	80	73	95	91
THL08	7	6	59	52	62	53	3	1	82	74	96	91
THL09	7	5	60	57	62	59	2	2	80	78	96	95
THL10	7	5	57	55	59	57	2	2	78	76	92	90
THL11	7	4	57	49	59	50	2	1	81	70	96	87
THL12	8	6	56	47	59	49	3	2	79	70	91	85
THL13	7	5	55	51	57	53	2	2	77	73	91	90
THL14	7	5	56	52	57	54	1	2	78	74	92	90
THL15	7	6	58	53	61	55	3	2	84	76	99	94
THL16	6	4	56	52	59	54	3	2	78	75	93	92
THL17	7	4	58	55	60	57	2	2	79	76	91	90
THL18	7	5	55	53	58	55	3	2	78	76	95	93
THL19	8	5	53	50	56	53	3	3	77	73	90	89
THL20	7	4	58	54	60	56	2	2	79	77	93	90
THL21	6	5	59	50	61	53	2	3	79	73	91	88
THL22	7	5	56	52	58	55	2	3	78	76	93	90
THL23	7	5	51	48	53	50	2	2	73	69	89	86
THL24	7	4	53	48	55	49	2	1	74	68	91	89
THL25	8	5	59	52	61	55	2	3	81	75	97	95
Fancy111	8	6	58	54	60	56	2	2	79	75	95	95
HN88	7	5	59	53	61	56	2	3	83	76	97	93
CI%	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	3	4
LSD _{0.05}	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5

ASI: chênh lệch thời gian tung phần và phun râu; X21: vụ xuân 2021; Đ21: vụ đông 2021.

Vụ đông 2021 có điều kiện thời tiết khắc nghiệt khi đầu vụ nắng nóng cuối vụ mưa liên tục kéo dài 1 tháng cho nên ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh trưởng, phát triển của ngô. Kết quả bảng 2 cho thấy, thời gian từ gieo đến mọc trong vụ đông ngắn ngày hơn so với vụ xuân, dao động 4-6 ngày, tương đương 2 giống đối chứng. Thời gian từ gieo đến tung phần, phun râu cũng ngắn hơn vụ xuân, dao động lần lượt là 47-57 ngày và 48-59 ngày. Trong vụ đông, các THL ngô nếp tím và 2 giống đối chứng vẫn biểu hiện chênh lệch giữa thời gian tung phần và phun râu ngắn (dao động 1-3 ngày). Tương tự, thời gian từ gieo đến thu hoạch bắp tươi của các THL ngô nếp tím trong vụ đông cũng ngắn hơn vụ xuân (dao

động 66-78 ngày) và hầu hết không có sự sai khác giữa các THL và với giống đối chứng, trừ THL23 (69 ngày), THL24 (68 ngày), THL02 (66 ngày) là ngắn ngày hơn 2 giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Thời gian từ gieo đến chín sinh lý của các THL trong vụ đông dao động 84-95 ngày, trong đó có 5 THL sinh trưởng ngắn ngày hơn cả 2 giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% gồm THL21 (88 ngày), THL11 (87 ngày), THL23 (86 ngày), THL12 (85 ngày) và THL02 (84 ngày).

3.2. Các đặc điểm nông học của các THL ngô nếp tím vụ xuân và đông năm 2021

Một số đặc điểm nông học chính liên quan đến hình thái thân lá, bông cờ và bắp của các THL ngô nếp tím được thể hiện ở bảng 3 và 4.

Bảng 3. Một số đặc điểm hình thái thân lá, bông cờ của các THL ngô nếp tím vụ xuân và đông năm 2021.

THL	Chiều cao cây (cm)		Chiều cao bông bắp (cm)		Tỷ lệ chiều cao bông bắp/chiều cao cây (%)		Đường kính thân (cm)		Chiều cao bông cờ (cm)		Số nhánh cờ cấp 1 (nhánh)	
	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21
THL01	184,2	175,3	81,1	76,5	44,0	43,7	3,71	3,62	32,7	30,2	18,7	17,2
THL02	174,3	165,2	73,0	70,9	41,9	42,9	3,50	3,40	39,9	33,9	9,3	9,0
THL03	168,0	160,8	73,8	67,9	43,9	42,3	3,32	3,01	28,6	25,9	13,3	13,6
THL04	188,7	180,3	81,6	78,5	43,3	43,6	3,38	2,79	37,8	34,2	14,0	13,8
THL05	167,0	155,0	71,4	64,7	42,7	41,8	3,35	3,32	37,5	34,8	18,0	16,5
THL06	183,2	178,3	75,2	68,1	41,1	38,2	3,22	3,14	35,2	30,5	9,3	9,4
THL07	162,2	161,1	79,0	72,5	48,7	45,0	2,29	2,07	23,6	20,5	6,7	6,3
THL08	157,0	152,4	58,1	56,3	37,0	36,9	3,13	2,79	41,7	38,7	12,7	11,8
THL09	159,4	153,3	75,5	74,7	47,4	48,7	3,19	3,04	43,4	40,0	16,0	15,3
THL10	186,9	177,6	81,0	77,5	43,3	43,6	3,30	3,24	32,3	25,5	12,0	12,1
THL11	174,6	165,6	77,5	72,8	44,4	44,0	3,30	3,17	40,5	35,3	7,7	7,5
THL12	193,1	180,0	88,4	83,9	45,8	46,6	3,38	3,13	34,7	32,1	15,0	13,4
THL13	188,5	176,1	89,3	84,1	47,4	47,7	3,03	2,64	29,4	27,7	15,3	14,6
THL14	174,4	172,3	68,0	64,2	39,0	37,3	3,24	3,05	42,4	37,0	8,7	8,4
THL15	177,1	170,0	69,8	67,8	39,4	39,9	2,62	2,53	37,1	36,5	11,3	10,7
THL16	184,0	177,1	68,1	64,8	37,0	36,6	3,05	2,84	40,3	39,1	11,4	10,5
THL17	144,2	135,8	59,9	54,3	41,5	40,0	3,14	3,04	40,1	38,7	14,7	13,2
THL18	192,3	182,3	75,4	70,5	39,2	38,7	2,91	2,74	34,5	33,1	12,0	10,1
THL19	162,1	153,9	62,6	58,3	38,6	37,9	2,83	2,71	44,7	44,7	11,7	10,6
THL20	184,2	178,7	77,4	74,3	42,0	41,6	3,42	3,10	33,7	31,0	9,7	10,2
THL21	168,5	159,5	76,8	66,9	45,6	41,9	3,16	3,03	42,0	35,5	17,7	17,9
THL22	176,0	165,8	74,5	68,7	42,3	41,4	3,03	2,72	44,5	43,5	10,7	7,8
THL23	175,2	166,9	77,8	72,3	44,4	43,3	3,79	3,50	41,4	41,1	9,3	8,7
THL24	172,0	168,3	72,3	69,1	42,0	41,0	3,54	3,48	41,4	38,0	10,4	9,9
THL25	168,0	163,6	73,2	70,9	43,6	43,3	2,98	2,33	38,7	38,2	12,3	11,4
Fancy111	207,5	198,0	98,7	90,8	47,6	45,9	3,57	3,48	38,3	33,0	14,3	15,4
HN88	194,5	182,5	90,3	78,5	46,4	43,0	3,45	3,27	39,9	31,2	8,4	8,4
CI%	3,7	8,6	6,7	3,8	-	-	3,56	7,91	5,7	9,1	7,3	5,5
LSD _{0,05}	10,5	23,7	8,3	4,4	-	-	0,19	0,39	3,5	5,1	1,5	1,1

Bảng 4. Một số đặc điểm hình thái bắp của các THL ngô nếp tím vụ xuân và đông năm 2021.

THL	Chiều dài bắp (cm)		Đường kính bắp (cm)		Hình dạng bắp		Độ che kín bắp (điểm 1-5)		Màu sắc hạt	
	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21
THL01	22,23	21,93	5,43	5,36	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL02	22,43	20,12	5,11	4,58	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL03	19,20	17,19	4,41	3,95	Trụ	Trụ	1	2	Tím	Tím
THL04	20,83	17,97	4,73	4,08	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL05	18,93	16,93	4,51	4,04	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL06	17,77	17,04	4,27	4,10	Trụ	Trụ	2	2	Tím	Tím
THL07	18,24	17,52	3,11	2,99	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL08	17,17	16,60	4,66	4,51	Trụ	Trụ	1	2	Tím	Tím
THL09	16,40	15,32	4,40	4,11	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL10	18,30	17,25	4,40	4,15	Trụ	Trụ	2	2	Tím	Tím
THL11	16,87	13,23	4,46	3,50	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL12	19,43	18,15	4,85	4,54	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL13	20,90	18,22	5,48	4,78	Trụ	Trụ	2	2	Tím	Tím
THL14	18,27	16,90	4,32	4,00	Trụ	Trụ	2	2	Tím	Tím
THL15	17,86	16,37	5,14	4,71	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL16	17,57	16,02	4,42	4,03	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL17	16,73	15,57	4,43	4,12	Trụ	Trụ	2	2	Tím	Tím
THL18	18,17	16,09	3,98	3,53	Trụ	Trụ	2	2	Tím	Tím
THL19	18,17	16,98	4,41	4,12	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL20	16,76	15,45	4,18	3,86	Trụ	Trụ	1	2	Tím	Tím
THL21	16,23	15,70	4,42	4,27	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL22	21,83	20,95	5,40	5,19	Trụ	Trụ	1	2	Tím	Tím
THL23	22,97	20,78	5,03	4,55	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
THL24	22,03	17,28	4,73	3,71	Trụ	Trụ	1	2	Tím	Tím
THL25	20,17	18,58	4,99	4,60	Trụ	Trụ	1	1	Tím	Tím
Fancy111	22,53	20,73	4,72	4,34	Trụ	Trụ	2	2	Tím	Tím
HN88	20,87	19,46	4,87	4,54	Trụ	Trụ	1	1	Trắng đục	Trắng đục
CI%	4,51	6,14	4,15	7,39	-	-	-	-	-	-
LSD _{0,05}	1,42	1,77	0,31	0,51	-	-	-	-	-	-

Vụ xuân 2021, các THL có chiều cao cây dao động 144,2-193,1 cm, đều thấp hơn so với đối chứng Fancy111 (207,5 cm), trong đó THL17 (144,2 cm) có chiều cao cây thấp nhất có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Tương tự, chỉ tiêu chiều cao bông bắp của các THL ngô nếp tím (dao động 58,1-89,3 cm) đều thấp hơn so với đối chứng Fancy111 (98,7 cm) có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Xác định chiều cao bông bắp là công việc quan trọng nhằm đánh giá một giống ngô chất lượng về khả năng nhận phân, chống đổ gãy và thu hoạch bắp ngô bằng cơ giới. Vị trí bông bắp thích hợp nhất ở cây ngô là ở khoảng giữa thân (40-50% chiều cao cây). Như vậy, hầu hết các THL có chiều cao bông bắp nằm trong khoảng phù hợp, trừ một số THL có tỷ lệ chiều cao bông bắp thấp (<40%) gồm THL08, THL14, THL15, THL16, THL18 và THL19. Đường kính thân của các THL trong vụ xuân dao động 2,29-3,79 cm, trong đó THL23 (3,79 cm) có đường kính thân lớn hơn hầu hết các THL còn lại (trừ THL01 là 3,71 cm) và 2 giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%; đường kính thân nhỏ nhất ở THL07 (2,29 cm) có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Một số chỉ tiêu về bông cờ của các vật liệu ngô nghiên cứu được đánh giá bao gồm chiều cao bông cờ và số nhánh cờ cấp 1, hai chỉ tiêu này

ở các THL dao động lần lượt trong khoảng 23,6-44,7 cm và 6,7-18,7 nhánh. 3 THL gồm THL01, THL05 và THL21 có số nhánh cỡ cấp 1 nhiều nhất, nhiều hơn so với các THL còn lại và giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

Chiều dài bắp của các THL dao động 16,23-22,97 cm, một số THL có bắp dài tương đương với đối chứng Fancy111 (22,53 cm) gồm THL23 (22,97 cm), THL02 (22,43 cm), THL01 (22,23 cm), THL24 (22,03 cm), THL22 (21,83 cm). Các THL còn lại đều thấp hơn so với đối chứng Fancy111 có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. So với đối chứng HN88, THL23 và THL02 có bắp dài hơn có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Về chỉ tiêu đường kính bắp của các THL dao động 3,11-5,48 cm, một số THL có đường kính bắp lớn hơn so với đối chứng Fancy111 (4,72 cm) và HN88 (4,87 cm) gồm THL13 (5,48 cm), THL01 (5,43 cm), THL22 (5,40 cm). Tất cả các THL đều có bắp hình trụ, màu sắc hạt tím và có lá bị bao kín bắp (điểm 1-2).

Vụ đông 2021, các THL ngô nếp tím có chiều cao cây dao động 135,8-182,3 cm, thấp cây hơn so với vụ xuân. Chiều cao đóng bắp của các THL dao động 54,3-84,1 cm, thấp hơn so với đối chứng Fancy111 (90,8 cm) có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%, một số THL có chiều cao đóng bắp thấp nhất là THL19 (58,3 cm), THL08 (56,3 cm) và THL17 (54,3 cm). Tương tự như vụ xuân, trong vụ đông hầu hết các THL có tỷ lệ chiều cao đóng bắp trên chiều cao cây nằm trong khoảng phù hợp (40-50%), trừ một số THL có tỷ lệ này thấp (<40%) gồm THL06, THL08, THL14, THL15, THL16, THL18 và THL19. Đường kính thân của các THL trong vụ đông dao động 2,07-3,62 cm, đều thấp hơn hoặc tương đương so với 2 giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Chiều cao bông cờ của các THL dao động 20,5-44,7 cm, trong khi số nhánh cỡ cấp 1 dao động 6,3-17,9 nhánh, không có sự chênh lệch đáng kể giữa 2 vụ đánh giá. 3 THL gồm THL01, THL05 và THL21 có số nhánh cỡ cấp 1 nhiều hơn so với các THL còn lại và giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% (tương tự như trong vụ xuân). Chiều dài bắp của các THL dao động 13,23-21,93 cm, một số THL có chiều dài bắp tương đương với đối chứng Fancy111 (20,73 cm) gồm THL01 (21,93 cm), THL22 (20,95 cm), THL23 (20,78 cm) và THL02 (20,12 cm). Đường kính bắp của các THL ngô nếp tím dao động 2,99-5,36 cm, trong đó lớn nhất ở THL01, lớn hơn các THL còn lại (trừ THL22, 5,19 cm) và 2 giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

3.3. Các chỉ tiêu chất lượng của các THL ngô nếp tím vụ xuân và đông năm 2021

Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng cho thấy, các THL ngô nếp tím có chất lượng ăn tươi khá với độ ngọt, độ dẻo và vị đậm điểm 1-3, tương đương với 2 giống đối chứng Fancy111 (bảng 5). Chỉ số độ ngọt hay hàm lượng chất rắn hoà tan ($^{\circ}$ Brix) của các THL ngô nếp tím dao động 11,03-15,93% trong vụ xuân, trong đó THL01 (15,93%), THL02 (15,73%) có độ Brix cao hơn các

THL còn lại và 2 giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Trong vụ đông, độ Brix của các THL dao động 11,57-16,23%, trong đó cao nhất ở THL01 (16,23%), cao hơn hầu hết các THL còn lại và đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% (trừ THL02 là 15,93% và THL23 là 15,23%) (bảng 5).

Bảng 5. Các chỉ tiêu chất lượng của các THL ngô nếp tím vụ xuân và đông năm 2021.

THL	Độ ngọt (điểm 1-5)		Độ dẻo (điểm 1-5)		Vị đậm (điểm 1-5)		Brix (%)		Độ dày vỏ hạt (μ m)		Hàm lượng anthocyanin (mg/100 g)	
	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21
THL01	1	1	1	2	2	1	15,93	16,23	58,93	56,63	112,93	124,07
THL02	2	2	2	2	2	2	15,73	15,93	58,30	56,30	100,33	119,57
THL03	3	2	3	2	2	2	13,07	14,70	72,40	71,63	98,53	102,90
THL04	2	2	2	3	2	2	12,73	13,47	63,57	62,47	80,80	98,67
THL05	3	2	2	2	1	2	11,13	11,57	66,97	62,73	84,67	91,60
THL06	3	3	2	2	2	1	12,60	12,77	77,73	73,80	74,80	96,60
THL07	3	2	2	2	3	2	11,47	12,30	65,83	64,27	80,70	90,17
THL08	2	2	3	3	3	2	12,93	14,90	81,20	78,03	91,33	98,33
THL09	2	3	3	3	2	2	12,43	13,40	75,40	69,97	91,10	107,57
THL10	2	2	2	2	2	2	13,23	13,60	77,13	72,90	105,30	109,73
THL11	3	2	2	2	3	2	13,73	13,87	88,87	84,17	100,97	115,13
THL12	2	1	2	2	3	3	12,20	12,60	85,77	79,77	82,53	93,27
THL13	2	2	2	2	2	1	13,90	14,13	62,90	56,43	94,87	104,50
THL14	2	2	3	2	2	2	13,13	14,87	72,13	66,43	102,97	106,57
THL15	2	2	2	2	2	2	13,07	13,33	73,87	69,50	90,33	98,67
THL16	2	2	2	2	2	2	12,97	13,97	89,87	84,53	98,27	104,90
THL17	3	3	2	3	2	2	11,70	11,87	82,63	77,93	76,37	92,97
THL18	3	2	3	3	2	2	11,03	11,80	91,97	86,83	76,77	83,57
THL19	2	2	3	3	3	2	12,73	13,10	62,67	62,53	85,63	87,80
THL20	2	2	2	2	2	1	12,33	12,73	84,07	81,33	86,90	93,60
THL21	2	2	3	2	2	2	12,27	12,53	74,03	68,97	78,60	83,97
THL22	2	2	3	2	2	2	12,87	13,00	70,07	66,93	92,07	94,33
THL23	2	2	2	2	2	2	14,57	15,23	54,80	54,00	102,17	106,87
THL24	2	2	2	2	2	2	14,03	14,93	58,33	57,13	102,73	116,87
THL25	1	2	3	3	2	2	14,43	14,90	66,50	62,10	97,67	101,67
Fancy111	2	2	3	2	2	2	13,00	13,47	78,50	74,13	99,53	108,03
HN88	2	2	2	2	3	2	12,93	13,97	58,97	57,20	1,70	2,17
CI%	-	-	-	-	-	-	4,36	4,55	2,95	5,61	4,00	3,97
LSD0,05	-	-	-	-	-	-	0,93	1,02	3,50	6,33	5,80	6,35

Cho điểm theo QCVN 01-56:2011/BNNPTNT.

Độ dày vỏ hạt của ngô ăn tươi là một yếu tố được người tiêu dùng quan tâm và là tính trạng mục tiêu quan trọng trong các chương trình chọn tạo giống ngô chất lượng. E. Choe (2010) [18] cũng đề xuất độ dày vỏ hạt phù hợp nhất cho ngô ăn tươi là 35-60 μ m. Xác định độ dày vỏ hạt của các vật liệu ngô nghiên cứu ở 3 vị trí của hạt gồm đỉnh hạt, mặt trước phôi và mặt sau được kết quả trung bình 3 điểm như ở bảng 5. Như vậy, 4 THL có chất lượng vỏ hạt mỏng theo đề xuất của E. Choe (2010) [18] gồm THL01, THL02, THL23 và THL24.

Hàm lượng anthocyanin tổng số có trong hạt của các THL ngô nếp tím được xác định theo phương pháp pH vi sai cho kết quả dao động 74,8-112,93 mg/100 g trong vụ xuân và 83,57-124,07 mg/100 g trong vụ đông. Trong đó, các THL có hàm lượng này cao trên 100 mg/100 g trong cả 2 vụ đánh giá gồm

THL01, THL02, THL10, THL11, THL14, THL23 và THL24. Trong vụ xuân, THL01 (112,93 mg/100 g) có hàm lượng anthocyanin cao hơn đối chứng Fancy111 (99,53 mg/100 g) có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%; trong vụ đông có 4 THL có hàm lượng anthocyanin cao hơn Fancy111 gồm THL01 (124,07 mg/100 g), THL02 (119,57 mg/100 g), THL24 (116,87 mg/100 g) và THL11 (115,13 mg/100 g) có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% (bảng 5).

3.4. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của các THL ngô nếp tím vụ xuân và đông năm 2021

Kết quả nghiên cứu cho thấy, số hàng hạt trên bắp có sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức thí nghiệm ở độ tin cậy 95% trong cả hai vụ xuân và đông 2021 (bảng 6). Trong vụ xuân, số hàng hạt dao động 12,4-17,9 hàng, trong đó THL23 (17,9 hàng), THL01 (17,6 hàng) có số hàng hạt cao hơn hầu hết các THL còn lại (trừ THL02, THL24) và 2 giống đối chứng có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Tương tự trong vụ đông, số hàng hạt trên bắp của các THL dao động 12,6-17,3 hàng, trong đó cao nhất ở THL01 (17,3 hàng), THL23 (17,2 hàng), THL02 (17,2 hàng) có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

Bảng 6. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của các THL ngô nếp tím vụ xuân và đông năm 2021.

THL	Số hàng hạt/bắp		Số hạt/hàng		Khối lượng 1000 hạt (g)		Năng suất hạt khô (tấn/ha)		Năng suất bắp tươi (tấn/ha)		Tỷ lệ bắp loại 1 (%)	
	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21	X21	Đ21
THL01	17,6	17,3	41,1	36,5	248,7	235,2	7,88	6,65	13,85	12,51	92,5	91,4
THL02	17,3	17,2	38,9	34,8	245,0	228,7	6,25	5,80	13,56	12,24	91,9	90,7
THL03	14,4	13,9	36,0	32,0	220,0	197,1	5,07	4,08	9,08	7,44	75,6	66,1
THL04	14,2	13,2	38,0	32,5	217,8	187,9	5,33	3,59	9,77	9,39	80,4	79,4
THL05	14,4	13,9	34,3	30,4	221,0	197,6	4,75	3,95	8,80	8,42	73,6	72,6
THL06	15,0	14,4	34,7	33,2	230,0	220,7	4,99	5,16	10,11	9,54	82,8	78,3
THL07	14,1	13,7	29,5	28,2	170,0	164,4	3,13	2,78	7,85	7,27	77,0	72,5
THL08	15,7	15,2	31,3	30,3	240,0	232,1	5,78	5,17	10,87	10,40	87,1	84,2
THL09	13,7	13,4	35,3	32,9	210,1	196,0	4,97	4,01	10,84	9,07	85,9	77,8
THL10	15,7	14,8	34,0	33,8	240,0	226,4	6,41	4,70	11,27	9,01	87,9	81,1
THL11	12,4	13,6	36,0	27,8	190,2	149,0	3,46	2,41	6,78	5,71	79,4	75,4
THL12	14,4	13,4	35,9	32,8	220,0	205,6	5,28	4,44	10,42	9,53	84,9	80,8
THL13	15,7	15,4	33,3	30,5	210,0	205,4	5,21	4,32	9,59	8,47	79,1	74,2
THL14	14,4	13,4	34,7	32,0	220,0	203,5	5,35	4,16	10,54	8,36	85,8	78,4
THL15	13,0	12,6	36,0	32,8	200,0	183,2	3,87	3,36	7,76	7,29	76,3	69,8
THL16	14,4	14,1	33,3	28,7	220,1	200,9	4,49	3,38	9,09	7,43	75,6	66,2
THL17	14,4	13,5	29,6	27,8	190,0	176,7	3,63	3,23	7,45	6,59	74,1	68,9
THL18	14,0	13,7	33,3	31,6	190,0	184,6	4,42	3,91	8,30	8,17	80,1	72,1
THL19	14,6	13,8	31,0	28,9	223,8	209,2	4,80	3,94	10,63	8,06	86,4	80,0
THL20	13,5	13,5	28,0	25,9	207,9	191,7	3,61	3,17	7,16	6,44	72,1	68,2
THL21	14,4	13,9	37,0	35,7	220,0	212,9	5,29	4,42	10,46	9,78	85,2	83,7
THL22	13,7	13,1	35,6	32,0	210,0	201,6	4,66	3,84	9,57	8,89	79,0	77,4
THL23	17,9	17,2	35,3	33,3	255,5	247,6	7,07	6,11	13,22	12,14	89,4	84,0
THL24	16,5	15,1	37,0	34,5	237,3	223,3	6,74	5,41	12,60	12,04	88,2	84,5
THL25	15,0	13,8	30,3	27,8	229,8	211,9	4,96	3,68	9,95	8,02	79,6	75,1
Fancy111	15,4	14,8	33,7	30,8	251,2	225,9	6,29	4,97	12,55	11,49	87,9	84,1
HN88	14,6	14,7	31,1	28,9	246,2	223,7	5,28	4,67	11,94	11,37	83,6	83,3
CV%	7,4	7,1	8,1	6,2	3,6	7,6	6,17	6,51	5,54	5,47	3,19	4,43
LSD0,05	1,8	1,7	4,5	3,2	13,2	25,7	0,52	0,46	0,92	0,81	4,29	5,64

Chỉ tiêu số hạt trên hàng của các THL ngô nếp tím dao động 28,0-41,1 hạt trong vụ xuân và 25,9-36,5 hạt trong vụ đông, trong cả 2 vụ, THL01 có số hạt trên hàng nhiều nhất, sai khác có ý nghĩa thống kê với hầu hết các THL và giống đối chứng (trừ THL02, THL04, THL21, THL24, THL10). Khối lượng 1000 hạt của các THL ngô nếp tím dao động 170,0-255,5 g trong vụ xuân và 149,0-247,6 g trong vụ đông. Một số THL có khối lượng 1000 hạt tương đương với đối chứng HN88 và Fancy111 trong cả 2 vụ đánh giá gồm THL01, THL02, THL23. Năng suất hạt khô ở vụ xuân của các THL ngô nếp tím dao động trong khoảng 3,13-7,88 tấn/ha, cao nhất ở THL01 (7,88 tấn/ha). Ngoài ra, THL01, THL23 có năng suất hạt khô cao hơn Fancy111 có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Trong vụ đông 2021, năng suất hạt khô của các THL dao động 2,41-6,65 tấn/ha, cao nhất có ý nghĩa thống kê ở THL01 (6,65 tấn/ha); đồng thời THL01, THL02, THL23 có năng suất hạt khô cao hơn đối chứng Fancy111 có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

Năng suất bắp tươi của các THL ngô nếp tím trong vụ xuân 2021 dao động 6,78-13,85 tấn/ha, trong đó THL01 (13,85 tấn/ha), THL02 (13,56 tấn/ha) cao hơn các THL, giống đối chứng còn lại có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% (trừ THL23 là 13,22 tấn/ha). Tương tự trong vụ đông 2021, năng suất bắp tươi của các THL dao động 5,71-12,51 tấn/ha, trong đó THL01 (12,51 tấn/ha) cao hơn đối chứng Fancy111 (11,49 tấn/ha) và HN88 (11,37 tấn/ha) có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Tỷ lệ bắp loại 1 của các THL ngô nếp tím trong vụ xuân 2021 dao động 72,1-92,5% và trong vụ đông 2021 dao động 66,1-91,4%. Một số THL có tỷ lệ bắp loại 1 trên 85% trong cả 2 vụ đánh giá gồm THL01 và THL02.

3.5. Chọn lọc THL ngô nếp tím triển vọng

Chỉ số chọn lọc tuyến tính Smith-Hazel đã được sử dụng trong chọn lọc trên cây trồng trong gần một thập kỷ qua. Một điểm yếu của các chỉ số lựa chọn tuyến tính là vấn đề đa cộng tuyến thường được quan sát thấy trong tập hợp các tính trạng được đánh giá, có thể làm sai lệch các hệ số của hồi quy bội và do đó làm xói mòn lợi ích lựa chọn. Phương pháp chọn lọc đa biến MGIDI đã được T. Olivoto và cs (2021) [10] đề xuất để chọn lọc các kiểu gen vượt trội dựa trên tập dữ liệu đa tính trạng, vượt trội hơn so với các phương pháp cổ điển Smith-Hazel do khắc phục được vấn đề đa cộng tuyến, do đó giúp các nhà chọn giống đưa ra quyết định chính xác hơn. Ngoài ra, MGIDI còn dễ sử dụng, đưa ra kết quả nhanh, trực quan và được tích hợp vào gói “metan” trên phần mềm R. Trên thế giới, MGIDI đã được dùng để chọn ra các kiểu gen đầu tây ưu tú [11], lúa mạch chịu mặn [12] và lúa mì chịu hạn [21]. Chọn lọc các THL ngô nếp tím triển vọng áp dụng MGIDI được thực hiện trên 10 tính trạng và mục tiêu chọn lọc tương ứng (bảng 7).

Bảng 7. Các tính trạng và mục tiêu chọn lọc THL triển vọng.

TT	Tên tính trạng	Ký hiệu	Đơn vị	Mục tiêu chọn lọc
1	Gieo - chín sữa	CS	ngày	Thấp
2	Gieo - chín sinh lý	CSL	ngày	Thấp
3	Tỷ lệ đổ rể	DR	%	Thấp
4	Đốm lá nhỏ	DLN	Điểm	Thấp
5	Dày vỏ hạt	DVH	μm	Thấp
6	Năng suất hạt khô	NSTT	tấn/ha	Cao
7	Năng suất bắp tươi	NSBT	tấn/ha	Cao
8	Tỷ lệ bắp loại 1	BL1	%	Cao
9	Chỉ số °Brix	BRIX	°Brix	Cao
10	Hàm lượng anthocyanin	AN	mg/100 g hạt khô	Cao

Giá trị của MGIDI và xếp hạng của các THL ngô nếp tím chọn lọc trong vụ xuân và đông 2021 được trình bày ở bảng 8. Kết quả cho thấy, MGIDI dao động 1,218-5,495 trong vụ xuân 2021 và 0,404-4,987 trong vụ đông 2021. Kết quả xếp hạng 5 THL tốt nhất trong vụ xuân 2021 theo thứ tự gồm THL02>THL01>THL24>THL19>THL23 và trong vụ đông 2021 gồm THL02>THL23>THL24>THL01>THL12.

Bảng 8. Chỉ số MGIDI của các THL ngô nếp tím chọn lọc trong vụ xuân và đông 2021.

THL	Vụ xuân 2021		Vụ đông 2021	
	MGIDI	Xếp hạng	MGIDI	Xếp hạng
THL01	1,449	2	1,869	4
THL02	1,218	1	0,404	1
THL03	3,807	18	3,491	13
THL04	2,711	8	3,585	15
THL05	3,651	13	4,132	23
THL06	3,703	15	3,504	14
THL07	4,070	22	3,827	19
THL08	4,350	25	3,013	7
THL09	4,060	21	4,247	25
THL10	2,722	9	3,046	8
THL11	3,971	20	3,778	18
THL12	4,199	23	2,559	5
THL13	2,483	6	3,415	11
THL14	3,654	14	3,313	9
THL15	4,283	24	4,206	24
THL16	3,798	17	4,075	21
THL17	3,765	16	4,124	22
THL18	4,668	26	4,376	26
THL19	2,048	4*	3,421	12
THL20	3,863	19	4,050	20
THL21	2,876	10	2,964	6
THL22	2,896	11	3,375	10
THL23	2,311	5	0,998	2
THL24	1,642	3	1,854	3
THL25	2,641	7	3,609	16
Fancy111	3,238	12	3,639	17
HN88	5,495	27	4,987	27

Như vậy, kết hợp kết quả chọn lọc THL ưu tú trong cả 2 vụ xuân và đông 2021, xác định được 2 THL ngô nếp tím triển vọng nhất gồm THL02 (hình 1A) và THL01 (hình 1B). Các THL này có nhiều đặc điểm nông học tốt như thời gian sinh trưởng ngắn (gieo đến thu bắp tươi 66-75 ngày, gieo đến chín sinh lý 84-91 ngày); chống chịu tốt với sâu bệnh và đổ gãy (nhiễm đốm lá nhỏ điểm 0-1); năng suất hạt khô (5,80-7,88 tấn/ha), năng suất bắp tươi (12,24-13,85 tấn/ha) và tỷ lệ bắp loại 1 cao (>90%), chất lượng ăn tươi tốt, vỏ hạt mỏng ($\leq 60 \mu\text{m}$), hàm lượng anthocyanin cao (100,33-124,07 mg/100 g).

**Hình 1. Hai THL ngô nếp tím ưu tú. (A) VNUA191 (THL02); (B) VNUA261 (THL01).**

4. Kết luận

Các THL ngô nếp tím thí nghiệm có thời gian sinh trưởng tương đối ngắn ngày với giai đoạn từ gieo đến thu bắp tươi 73-84 ngày trong vụ xuân, 66-78 ngày trong vụ đông và hầu như không có sai khác giữa các THL và so với 2 giống đối chứng (Fancy111, HN88). Hầu hết các THL ngô nếp tím có chất lượng ăn tươi tốt (độ ngọt, dẻo, vị đậm điểm 1-3), °Brix 11,03-16,23%, 4 THL có chất lượng vỏ hạt mỏng (THL01, THL02, THL23, THL24), 4 THL có hàm lượng anthocyanin cao hơn đối chứng Fancy111 (THL01, THL02, THL24, THL11). Năng suất bắp tươi và tỷ lệ bắp loại 1 của các THL ngô nếp tím dao động 6,78-13,85 tấn/ha, 72,1-92,5%, tương ứng trong vụ xuân và 5,71-12,51 tấn/ha, 66,1-91,4%, tương ứng trong vụ đông.

Nghiên cứu đã xác định được 2 THL triển vọng nhất theo MGIDI gồm THL01 (D161 x FP1 - VNUA261) và THL02 (Q2151 x FP1 - VNUA191) có tiềm năng thương mại hóa với thời gian thu bắp tươi VNUA261 70-75 ngày, VNUA191 66-73 ngày; năng suất bắp tươi VNUA261 đạt 12,51-13,85 tấn/ha, VNUA191 đạt 12,24-13,56 tấn/ha, chất lượng ăn tươi tốt, vỏ hạt mỏng ($\leq 60 \mu\text{m}$) và hàm lượng anthocyanin cao, trong đó VNUA261 đạt 112,93-124,07 mg/100 g hạt khô, VNUA191 đạt 100,33-119,57 mg/100 g hạt khô. 2 THL này đã được gửi khảo nghiệm để chọn THL tốt nhất phục vụ công nhận lưu hành giống ngô nếp tím mới tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này thuộc đề tài “Nghiên cứu, chọn tạo giống ngô nếp tím và ngô đường siêu ngọt cho các tỉnh phía Bắc”, mã số ĐTĐL.CN-09/21. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L.A. Chatham, M. Paulsmeyer, J.A. Juvik (2019), “Prospects for economical natural colorants: Insights from maize”, *Theoretical and Applied Genetics*, **132**(11), pp.2927-2946, DOI: 10.1007/s00122-019-03414-0.
- [2] R. Mattioli, R. Mattioli, A. Francioso, et al. (2020), “Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases”, *Molecules*, **25**(17), DOI: 10.3390/molecules25173809.
- [3] P.Q. Tuan, N.T. Duc, N.T.N. Anh, et al. (2016), “Evaluation of purple waxy corn lines for hybrid variety development”, *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **14**(3), pp.328-337.
- [4] P.Q. Tuan, N.T. Hung, N.V. Long, et al. (2018a), “Results of breeding and testing hybrid purple sticky corn variety VNUA141 in the Red River Delta and North Central region”, *Journal of Agriculture and Rural Development*, **11**, pp.17-28 (in Vietnamese).
- [5] P.Q. Tuan, N.T. Hung, N.V. Long, et al. (2018b), “Improving the sweetness of sticky corn lines by backcrossing method”, *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **16**(3), pp.197-206 (in Vietnamese).
- [6] P.Q. Tuan, N.T. Hung, N.V. Long, et al. (2021), “Assessment of agronomic characteristics, environmental impact and economic efficiency of purple sticky corn variety VNUA141 and white sticky corn variety VNUA69 in Hai Duong”, *Journal of Agriculture and Development Rural*, **418**, pp.64-75 (in Vietnamese).
- [7] N.T.N. Anh, M.T. Duc, V.V. Liet, et al. (2022a), “Heterosis and combining ability for yield and quality of some purple waxy corn and sweet corn inbred lines”, *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **20**(5), pp.563-575 (in Vietnamese).
- [8] P.Q. Tuan, N.T. Hung, N.V. Long, et al. (2022), “Development and selection of anthocyanin-rich fruit corn lines”, *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **20**(7), pp.853-862 (in Vietnamese).
- [9] P.Q. Tuan, N.T. Hung, N.V. Long, et al. (2022), “Heterosis, combining ability on yield, yield components, and quality of purple sweet corn”, *Journal of Southern Agriculture*, **53**(5), pp.1193-1206.
- [10] T. Oliveto, M. Nardino (2021), “MGIDI: Toward an effective multivariate selection in biological experiments”, *Bioinformatics*, **37**(10), pp.1383-1389, DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa981.
- [11] E. Barth, J.T.V. Resende, K.H. Marigule, et al. (2022), “Multivariate analysis methods improve the selection of strawberry genotypes with low cold requirement”, *Scientific Reports*, **12**(1), DOI: 10.1038/s41598-022-15688-4.
- [12] A.P. Aboughadareh, S. Sanjani, H.N. Chamanabad, et al. (2021), “Identification of salt-tolerant barley genotypes using multiple-traits index and yield performance at the early growth and maturity stages”, *Bulletin of The National Research Centre*, **45**(1), DOI: 10.1186/s42269-021-00576-0.
- [13] N.T. Duc, P.Q. Tuan, N.T.N. Anh, et al. (2021), “New technologies in maize research: Potential and application”, *International Conference: “Sustainable exploitation of maize genetic resources and application of new technologies in the development of vegetable and forage maize resilience to climate change” Organized by Vietnam National University of Agriculture*, pp.244-269.
- [14] N.T.N. Anh, V.V. Liet, P.Q. Tuan et al (2022b), “Agronomic characteristics, yield and quality of hybrid corn combinations between purple sticky corn and sweet corn”, *Journal of Agriculture and Rural Development*, **426+427**, pp.11-21 (in Vietnamese).
- [15] Ministry of Agriculture and Rural Development (2011a), *QCVN01-56:2011/BNNPTNT: National Technical Regulations on Testing The Cultivation Value and Use Value of Corn Varieties* (in Vietnamese).
- [16] Ministry of Agriculture and Rural Development (2011b), *QCVN01-66:2011/BNNPTNT on Testing for Distinctness, Uniformity and Stability of Corn Varieties* (in Vietnamese).
- [17] M.D. Kleinhenz, R.N. Bumgarner (2012), *Using °Brix as an Indicator of Vegetable Quality Instructions for Measuring °Brix in Cucumber, Leafy Greens, Sweet corn, Tomato, and Watermelon*, The Ohio State University.
- [18] E. Choe (2010), *Marker Assisted Selection and Breeding for Desirable Thinner Pericarp Thickness and Ear Traits in Fresh Market Waxy Corn Germplasm*, Doctoral dissertation, University of Illinois.
- [19] M.M. Giusti, R.E. Wrolstad (2001), “Characterisation and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy”, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, **1**, DOI: 10.1002/0471142913.faf0102s00.
- [20] H.T.K. Cuc (2004), “Determination of anthocyanin content in some fruit and vegetable ingredients by differential pH method”, *Journal of Science and Technology, University of Danang*, **3**(7), pp.47-54 (in Vietnamese).
- [21] M. Nardino, E.C. Perin, B.C. Aranha, et al. (2022), “Understanding drought response mechanisms in wheat and multi-trait selection”, *PLOS ONE*, **17**(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0266368.

Tạo chồi *in vitro* sạch virus cây chanh dây bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Trần Hiếu^{1,2}, Trương Hoài Phong¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Hoàng Đức Khải¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Vũ Quốc Luận¹, Lê Ngọc Triệu³, Nguyễn Bá Nam³, Hoàng Thị Như Phương³, Bùi Văn Thế Vinh^{4*}, Dương Tấn Nhựt^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Phân hiệu Ninh Thuận, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, 8 Yên Ninh, thị trấn Khánh Hải, huyện Ninh Hải, tỉnh Ninh Thuận, Việt Nam

³Trường Đại học Đà Lạt, 1 Phù Đổng Thiên Vương, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

⁴Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, 475A Điện Biên Phủ, phường 25, quận Bình Thạnh, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/12/2021; ngày chuyển phản biện 23/12/2021; ngày nhận phản biện 17/1/2022; ngày chấp nhận đăng 21/1/2022

Tóm tắt:

Chanh dây là cây trồng mang lại giá trị kinh tế cao. Hiện nay, diện tích trồng cây chanh dây ở Lâm Đồng đang giảm bởi sự lây lan dịch bệnh do virus gây ra. Mục đích của nghiên cứu này là tạo nguồn vật liệu chồi *in vitro* sạch virus phục vụ cho quy trình nhân giống chanh dây sạch bệnh. Chồi đỉnh của chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims.) và vàng (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) thu tại huyện Đam Rông (T1 và V1) và Đức Trọng (T2 và V2) không khử trùng bề mặt được sử dụng làm vật liệu cho nuôi cấy mô phân sinh đỉnh. Mô phân sinh đỉnh (0,2 mm) của cây chanh dây các giống được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BA. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ sống và tái sinh đều đạt trên 45,0%. Chồi được tái sinh, sinh trưởng, phát triển mạnh, hình thành các chồi đơn rõ rệt, lá xanh sau 10 tuần nuôi cấy. Những chồi tái sinh này được kiểm tra sạch bệnh đối với 3 loại virus (CMV, ToRSV và Potyvirus) bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả cho thấy, trong số 4 mẫu kiểm tra, chỉ có 1 mẫu V1 bị nhiễm Potyvirus. Như vậy, những chồi *in vitro* sạch virus này được sử dụng làm vật liệu cho quy trình nhân giống chanh dây tím và vàng sạch virus, góp phần giải quyết nhu cầu giống chanh dây sạch bệnh hiện nay.

Từ khóa: chanh dây, chồi *in vitro* sạch virus, nuôi cấy mô phân sinh đỉnh, tái sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Chanh dây là một cây trồng quan trọng và được trồng thương mại ở một số quốc gia bao gồm Thái Lan, Úc, Brazil, Hoa Kỳ và Nam Mỹ [1]. Ở Việt Nam, cây chanh dây được du nhập vào khoảng đầu thế kỷ XX nhưng đến những năm gần đây, đối tượng này mới được xác định là loại cây trồng mang lại giá trị kinh tế cao [2]; năng suất bình quân của cây chanh dây đạt 70-100 tấn/ha/năm và quả chanh dây xuất khẩu được xếp hạng ở vị trí thứ 10 về các loại trái cây xuất khẩu trên thế giới. Tại Việt Nam, cây chanh dây được trồng khắp các tỉnh từ Bắc vào Nam, trong đó chủ yếu tập trung ở Lâm Đồng, Gia Lai, Kon Tum, Kiên Giang, Cần Thơ. Tuy nhiên, ở Lâm Đồng, việc trồng cây chanh dây hiện nay vẫn còn phân tán, với quy mô nhỏ. Hơn nữa, diện tích trồng cây chanh dây đang dần bị suy giảm, chủ yếu do dịch bệnh lây lan rộng trên cây chanh dây, trong đó có một số bệnh do virus gây ra, đặc biệt là CMV, ToRSV và Potyvirus [3, 4].

Một số bệnh ở cây chanh dây liên quan đến virus thuộc chi Potyvirus đã được mô tả ở các vùng khác nhau trên thế giới. Potyvirus đầu tiên được phát hiện lây nhiễm trên cây chanh dây là Passion fruit woodiness virus (PWV). Potyvirus chủ yếu lây do sự chích hút của rệp [5]. Virus CMV lần đầu tiên được tìm thấy liên quan đến cây chanh dây ở Úc [6]; cây chanh dây nhiễm virus CMV biểu hiện lốm đốm màu vàng tươi trên lá và trên quả, bắt đầu từ các điểm ngẫu nhiên trên lá ở phần dưới của cây và giảm dần về phía ngọn [5]. Trong khi đó, virus ToRSV gây bệnh trên cây chanh

dây được báo cáo lần đầu tiên ở Peru; tác nhân truyền bệnh virus này được xác định bởi tuyến trùng *Xiphinema americanum*. Virus này gây ra chủ yếu là các đốm và vòng trên lá hoặc thân khi cây bị nhiễm trùng hoặc làm cây bị hoại tử [5]. Hiện nay, các bệnh hại cây trồng do virus gây ra chưa có thuốc đặc trị trên thị trường. Vì vậy, nhu cầu về giống cây chanh dây sạch bệnh virus là cần thiết.

Kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh là kỹ thuật đã được sử dụng lâu đời trong công tác nhân giống vô tính cây trồng sạch bệnh virus [7]. Kỹ thuật này cũng đảm bảo sự ổn định di truyền vốn có trong thực vật. Chồi phát triển trực tiếp từ mô phân sinh mà không qua hình thành mô sẹo bảo đảm ổn định di truyền và giảm thiểu biến dị soma. Vì vậy, kỹ thuật này đã ứng dụng thành công trong việc tạo giống cây trồng sạch bệnh trên nhiều đối tượng như tỏi, dâu tây, khoai tây... [8-10]. Quá trình nuôi cấy mô phân sinh đỉnh không phải lúc nào cũng tạo cây sạch virus. Do đó, chồi hoặc cây con được tạo ra từ kỹ thuật này cần phải được kiểm tra tình trạng sạch virus bằng các kỹ thuật phân tích như ELISA và RT-PCR [8]. Trong một nghiên cứu trước đây đối với cây chanh dây tím, bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh và cùng với việc sử dụng kỹ thuật ELISA trong xác định chồi sạch virus PWV, S. Prammanee và cs (2011) [1] đã tạo ra giống cây chanh dây sạch bệnh virus này.

Giống chanh dây trồng ở nước ta hiện nay chủ yếu được nhập từ Đài Loan, Trung Quốc với giá thành cao và nguồn cung không ổn định. Bên cạnh đó, người trồng thường sử dụng các phương pháp truyền thống với hệ số nhân thấp như gieo hạt, giâm hom,

*Tác giả liên hệ: Email: duongtannhut@gmail.com, bvt.vinh@hutech.edu.vn

Production of passion fruit virus-free *in vitro* shoots by apical meristem culture

Hieu Tran^{1,2}, Hoai Phong Truong¹, Thi Nhu Mai Nguyen¹,
Dac Khai Hoang¹, Thanh Tung Hoang¹, Manh Cuong Do¹,
Quoc Luan Vu¹, Ngoc Trieu Le³, Ba Nam Nguyen³,
Thi Nhu Phuong Hoang³, Van The Vinh Bui^{4*}, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology,
116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Ninh Thuan Campus, Nong Lam University - Ho Chi Minh City,

8 Yen Ninh Street, Khanh Hai Town, Ninh Hai District, Ninh Thuan Province, Vietnam

³Da Lat University, 1 Phu Dong Thien Vuong Street,

Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

⁴Ho Chi Minh City University of Technology,

475A Dien Bien Phu Street, Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 21 December 2021; revised 17 January 2022; accepted 21 January 2022

Abstract:

Passion fruit is a high economic value crop. Currently, the cultivated area of passion fruit in Lam Dong is decreasing due to the spread of viral diseases. The main aim of this study is to generate disease-free *in vitro* shoots for propagation purposes. The apical shoots of purple (*Passiflora edulis* Sims.) and yellow (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) passion fruit cultivars collected at Dam Rong (T1 and V1) and Duc Trong (T2 and V2) districts, without surface sterilisation, were used as materials for apical meristem culture. The apical meristems (0.2 mm) of passion fruit plants were cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA. After 4 weeks of culture, the survival and regeneration rate reached over 45.0%. Single shoots with green leaves were formed and regenerated after 10 weeks of culture. These regenerated shoots were tested for the presence of 3 viral groups (CMV, ToRSV and Potyvirus) by RT-PCR. The results showed that only 1 of 4 tested samples (V1) was infected with Potyvirus. Thus, these virus-free *in vitro* shoots will be used as materials for propagation to meet the requirement for disease-free purple and yellow passion fruit plants.

Keywords: apical meristem culture, passion fruit, shoot regeneration, virus-free *in vitro* shoots.

Classification number: 4.6

ghép... khiến chất lượng cây giống và độ đồng đều giảm, mức độ thoái hóa và tỷ lệ nhiễm bệnh lại tăng lên. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh để tái sinh chồi cây chanh dây tím và vàng. Bên cạnh đó, kỹ thuật RT-PCR đã được ứng dụng để kiểm tra tính sạch virus Potyvirus, CMV và ToRSV đối với chồi được tái sinh.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu chồi đỉnh của cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims.) và cây chanh dây vàng (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) 2 tháng tuổi thu nhận tại huyện Đam Rông và Đức Trọng, tỉnh Lâm

Đồng được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu cho nuôi cấy mô phân sinh đỉnh.

Môi trường nuôi cấy là MS bổ sung 1,0 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [1]. Môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút.

2.2. Tái sinh chồi thông qua kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Những chồi đỉnh giống chanh dây tím và vàng được thu nhận vào mùa khô (từ tháng 12 năm trước đến tháng 4 năm sau) ở 2 khu vực huyện Đam Rông (T1 và V1) và Đức Trọng (T2 và V2) thuộc tỉnh Lâm Đồng. Sau đó, chúng được cắt, rửa sạch với nước vô trùng và được sử dụng trực tiếp để tách mô phân sinh đỉnh (không thông qua khử trùng bề mặt vì sau khi khử trùng mẫu chồi mềm, dễ bị tổn thương và việc tách mô phân sinh gặp khó khăn) dưới kính hiển vi soi nổi (tách bỏ các vảy lá chỉ còn mô phân sinh đỉnh); mô phân sinh đỉnh được cắt với kích thước khoảng 0,2×0,2 mm và được cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l BA [1].

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại với 20 mẫu. Các chỉ tiêu: tỷ lệ nhiễm (%), tỷ lệ sống (%) và tỷ lệ tái sinh chồi (%) được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy; trong khi đó, số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm) và hệ số tái sinh chồi (%) được ghi nhận sau 10 tuần nuôi cấy. Hệ số tái sinh chồi được tính bằng công thức theo phương pháp của J. Dobránszki và J.A. cs (2013) [11] như sau:

$$\text{Hệ số tái sinh chồi} = R_s (\%) \times S \times N$$

trong đó R_s : tỷ lệ tái sinh chồi (%); S : số mẫu; N : số chồi/mẫu.

Sau đó, chồi thu nhận từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l BA trong 4 tuần để gia tăng chất lượng chồi.

2.3. Kiểm tra virus trong các chồi có nguồn gốc từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Thu mẫu và tách chiết ribonucleic acid (RNA) tổng số: Mẫu lá thu nhận từ 20 chồi ở mỗi giống chanh dây (V1, V2, T1 và T2 có nguồn gốc từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh); tương ứng đại diện cho 20 mẫu ngẫu nhiên được trộn lại với nhau để tạo thành mẫu gộp cho mỗi giống/mỗi lần lặp lại thí nghiệm điện di, sau đó cho vào ống ly tâm 2 ml. Mẫu lá mỗi giống chanh dây *in vitro* trong các ống ly tâm được sử dụng để tiến hành tách chiết RNA tổng số. Một bộ kit “*ExiPrep*™ Plus Plant” (Bioneer, Hàn Quốc) được sử dụng cho tách chiết RNA tổng số. Đối với mẫu V1, tiến hành thêm các bước: tinh sạch DNA từ gel bằng bộ Kit AccuPrep® Gel Purification của Hãng Bioneer (Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất; tiến hành gửi mẫu đi giải trình tự theo phương pháp Sanger, sử dụng ngay chính cặp môi khuếch đại PCR để làm môi giải trình tự; từ kết quả giải trình tự có được, sử dụng công cụ BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) để tìm các trình tự có tính tương đồng cao, từ đó xác định loài virus của Potyvirus.

Kiểm tra virus dựa trên kỹ thuật RT-PCR: Các cặp môi đặc hiệu và chu trình nhiệt sử dụng cho từng loại virus được sử dụng như ở bảng 1.

Bảng 1. Môi và chu trình nhiệt tương ứng với virus cần kiểm tra.

TT	Virus	Môi sử dụng (5'-3')	Chu trình nhiệt	Kích thước sản phẩm RT-PCR đặc hiệu cho virus
1	CMV	Mỗi xuôi AM180922: GCATTCTAGATGGACAAATCTGAATC Mỗi ngược AM180923: GCATGGTACCTCAAAGTGGGAGCAC	45°C-20 phút 94°C-5 phút 94°C-45 giây (1) 52°C-1 phút (2) 72°C-1 phút (3) 72°C-10 phút 4°C-trữ (1-3)-35 chu kỳ	657 bp [12]
2	ToRSV	Mỗi xuôi U1: GACGAAGTTATCAATGGCAGC Mỗi ngược D1: TCCGTCCAATCACGCGAATA	45°C-20 phút 95°C-5 phút 95°C-15 giây (1) 55°C-45 giây (2) 72°C-1 phút (3) 72°C-10 phút 4°C-trữ (1-3)-35 chu kỳ	449 bp [13]
3	Potyvirus	Mỗi xuôi MJ1(F): ATGGTHTGGTGYATHGARAAYGG Mỗi ngược MJ2(R): TGCTGCKGCYTTCATYTG	50°C-15 phút 94°C-2 phút 94°C-30 giây (1) 50°C-1 phút (2) 72°C-1 phút (3) 72°C-10 phút 4°C-trữ (1-3)-35 chu kỳ	327 bp [14]

Bộ kit sử dụng để chạy One-step RT-PCR thuộc bộ Mytaq One-step RT-PCR Kit (Bioline, Vương quốc Anh). Tổng thể tích phản ứng 25 µl được sử dụng chung cho tất cả các loại virus gồm: 12,5 µl 2x Mytaq Onestep Mix (1x625 µl), 1 µl mỗi xuôi (10 pmol/µl), 1 µl (10 pmol/µl), 0,5 µl Reverse Transcriptase (1x12,5 µl), 1 µl Rnase inhibitor (10 u/µl), 2 µl Template (100 ng/µl) và 7 µl H₂O.

Sản phẩm của phản ứng RT-PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2% ở hiệu điện thế 60 V sau 2 giờ. Sau khi điện di, gel agarose được nhuộm bằng ethidium bromide. Hình ảnh điện di được chụp dưới tác động của tia UV để ghi nhận các vạch của sản phẩm tương ứng với kích thước thiết kế sẵn ở trên.

2.4. Điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* được thực hiện tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên với nhiệt độ khoảng 25±2°C, độ ẩm 55-60%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày và cường độ chiếu sáng khoảng 40-45 µmol.m⁻².s⁻¹ dưới ánh sáng huỳnh quang.

2.5. Phương pháp xử lý thống kê

Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0 theo phép thử Duncan với p<0,05 [15].

3. Kết quả

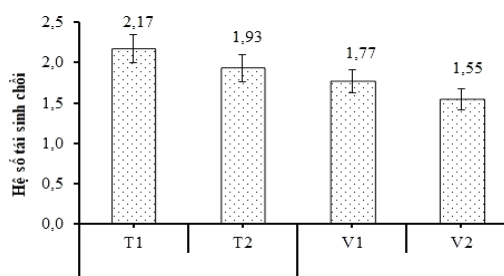
3.1. Tái sinh chồi *in vitro* thông qua kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Mẫu mô phân sinh đỉnh được tách ra từ những chồi không thông qua khử trùng và được nuôi cấy trên môi trường tái sinh, kết quả sau 4 tuần cho thấy, tỷ lệ nhiễm của mẫu ở tất cả các nghiệm thức giống chanh dây tím thu thập tại khu vực huyện Đam Rông (T1) và Đức Trọng (T2); cũng như giống chanh dây vàng thu thập tại khu vực huyện Đam Rông (V1) và Đức Trọng (V2) đều cho tỷ lệ nhiễm khá cao (trên 50%). Khi so sánh giữa 2 nghiệm thức T1 và T2 của giống chanh dây tím và giữa V1 với V2 của giống chanh dây vàng về các chỉ tiêu theo dõi như tỷ lệ sống, tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ tái sinh chồi, số chồi và chiều cao chồi sau 4 tuần và 10 tuần nuôi cấy cho thấy không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với p<0,05 theo phép thử Duncan (bảng 2). Kết quả này cũng được ghi nhận tương tự đối với hệ số tái sinh chồi giữa 2 nghiệm thức ở cả 2 giống chanh dây (biểu đồ 1). Đặc biệt ở tuần thứ 4, quan sát những mẫu sống không nhiễm cho thấy tất cả mô phân sinh đỉnh đều cảm ứng tái sinh cụm chồi với các chồi có kích thước rất nhỏ (<1 mm) và cụm chồi bắt đầu sinh trưởng mạnh thành các chồi đơn với lá xanh và chồi hình thành rõ rệt sau 10 tuần nuôi cấy (hình 1). Như vậy, kết quả thu được trong nghiên cứu này bước đầu khẳng định hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh trong tái sinh chồi *in vitro* ở cây chanh dây mà không thông qua khử trùng mẫu bằng các chất khử trùng thông dụng. Sau đó, những chồi được tái sinh từ mô phân sinh đỉnh của tất cả nghiệm thức T1, T2, V1 và V2 được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l BA sau 4 tuần để nhân chồi và chồi này được sử dụng làm vật liệu cho kiểm tra tính sạch virus.

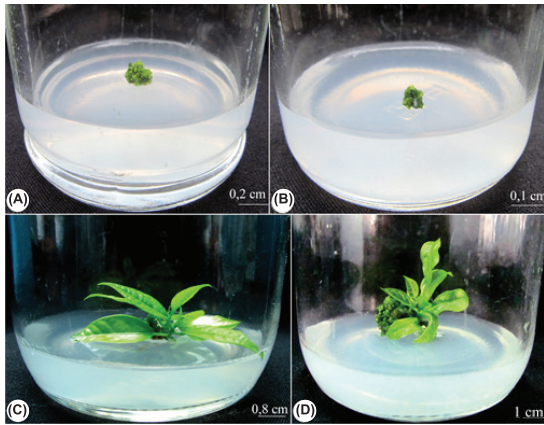
Bảng 2. Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh giống chanh dây tím và vàng sau 4 và 10 tuần nuôi cấy.

NT	4 tuần			10 tuần	
	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi	Chiều cao chồi (cm)
T1	50,00a*	50,00a	50,00a	4,33a	1,53a
T2	48,33a	51,67a	48,33a	4,00a	1,43ab
V1	48,33a	51,67a	48,33a	3,67a	1,37b
V2	46,67a	53,33a	46,67a	3,33a	1,47ab

NT: nghiệm thức; *: những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 theo phép thử Duncan.



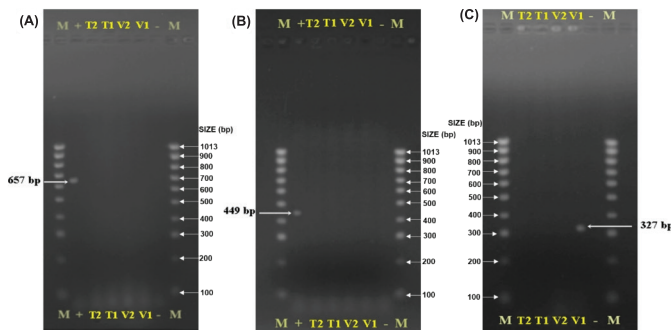
Biểu đồ 1. Hệ số tái sinh chồi thông qua nuôi cấy mô phân sinh đỉnh sau 10 tuần.



Hình 1. Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh giống chanh dây tím và vàng. (A, C) Chồi giống chanh dây tím cấy ứng sau 4 và 10 tuần nuôi cấy; (B, D) Chồi giống chanh dây vàng cấy ứng sau 4 và 10 tuần nuôi cấy.

3.2. Kiểm tra sự có mặt của virus trong chồi có nguồn gốc từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Lấy 20 chồi của mỗi giống (V1, V2, T1 và T2) trộn lại tạo thành 4 mẫu gộp (V1, V2, T1 và T2 tương ứng). Lá thu nhận từ 4 mẫu gộp được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của 3 loại virus: CMV, ToRSV và Potyvirus bằng phương pháp RT-PCR. Kết quả điện di trên gel agarose của các mẫu đối với 3 loại virus gây bệnh cho thấy, cả 3 mẫu thử nghiệm: V2, T1 và T2 đều không phát hiện bằng vạch DNA đặc hiệu của 3 loại virus khảo sát; duy nhất chỉ có mẫu V1 xuất hiện bằng vạch DNA có kích thước tương đương 327 bp của Potyvirus, không phát hiện các băng vạch DNA đặc hiệu của CMV, ToRSV. Hơn nữa, đối chứng âm trên kết quả điện di đều không hiển thị các băng vạch DNA đặc hiệu của các virus CMV, ToRSV và Potyvirus; đối chứng dương đều hiển thị bằng vạch DNA đúng kích thước với các băng vạch DNA đặc hiệu của các virus CMV, ToRSV (657 và 449 bp tương ứng) (hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose kiểm tra độ sạch virus của các mẫu giống chanh dây tím và vàng. (A) Kết quả kiểm tra virus CMV; (B) Kết quả kiểm tra virus ToRSV; (C) Kết quả kiểm tra virus Potyvirus. M: thang HyperLadder 100 bp (Hãng Bioline); "-": đối chứng âm; "+": đối chứng dương; 657 bp: kích thước băng vạch DNA đặc trưng của virus CMV; 449 bp: kích thước băng vạch DNA đặc trưng cho virus ToRSV; 327 bp: kích thước băng vạch DNA đặc trưng cho Potyvirus.

Đối với Potyvirus, vì không có chứng dương (sử dụng môi tổng quát để kiểm tra các loại Potyvirus) nên đối với mẫu V1 tiến hành tinh sạch DNA từ gel bằng bộ kit AccuPrep® Gel Purification của Hãng Bioneer (Hàn Quốc) và tiến hành gửi mẫu đi giải trình tự theo phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự thu được đoạn DNA có độ dài 344 nucleotide, trong đó xác định rõ 326 nucleotide. Đoạn DNA xác định rõ trình tự được tiến hành BLAST trên NCBI và cho kết quả như hình 3. Kết quả hình 3 cho thấy, trình tự Potyvirus trong mẫu V1 tương đồng hoàn toàn (100%) với trình tự dòng virus có mã truy cập trên NCBI FR694183, tương đồng 99,08% với các dòng MK110656, FR694182, FR694181 và FJ896002. Xem xét các trình tự với mã truy cập như trên, kết quả như sau: các trình tự FR694183, FR694182 và FR694181 được xác định thuộc về PWV thuộc nhóm Potyvirus; các trình tự MK110656 và FJ896002 thuộc về Potyvirus gây bệnh trên chanh dây ở Ugandan chưa xác định được loài (unclassified Potyvirus). Như vậy, chỉ có mẫu V1 bị nhiễm Potyvirus, khả năng cao thuộc về PWV.

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 14 sequences selected									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	Per. Ident	Acc. Len	Accession		
Potyvirus fruit woodiness virus partial gene for polyprotein, CP gene region, strain Ugandan isolate DSMZ PV-0707	Potyvirus fruit wo...	603	603	100%	36-168	100.00%	1681	FR694183.1	
Ugandan Passiflora virus isolate KHT-1, complete genome	Ugandan Passifl...	586	586	100%	36-163	99.08%	9670	MK110656.1	
Potyvirus fruit woodiness virus partial gene for polyprotein, CP gene region, strain Ugandan isolate 69c	Potyvirus fruit wo...	586	586	100%	36-163	99.08%	1720	FR694182.1	
Potyvirus fruit woodiness virus partial gene for polyprotein, CP gene region, strain Ugandan isolate 61	Potyvirus fruit wo...	586	586	100%	36-163	99.08%	1720	FR694181.1	
Ugandan Passiflora virus isolate UGA-73 polyprotein gene, partial cds	Ugandan Passifl...	586	586	100%	36-163	99.08%	1718	FJ896002.1	
Potyvirus fruit woodiness virus partial gene for polyprotein, CP gene region, strain Ugandan isolate 64	Potyvirus fruit wo...	580	580	100%	26-161	98.77%	1719	FR694180.1	
Ugandan Passiflora virus isolate UGA-15 polyprotein gene, partial cds	Ugandan Passifl...	580	580	100%	26-161	98.77%	1718	FJ896000.1	
Ugandan Passiflora virus isolate UGA-17 polyprotein gene, partial cds	Ugandan Passifl...	410	410	100%	36-128	92.64%	1718	FJ896003.1	
Potyvirus fruit woodiness virus isolate NG43 coat protein gene, partial cds	Potyvirus fruit wo...	451	451	99%	16-122	91.69%	668	KY204619.1	
Bambusa groundnut collyvirus 1 isolate ER07 coat protein gene, partial cds	Bambusa ground...	233	233	63%	56-57	86.96%	780	U8987197.1	
Bean common mosaic necrosis virus mRNA for coat protein, partial cds, strain DCMV	Bean common m...	217	217	57%	56-52	87.63%	789	AB725585.1	
Bean common mosaic necrosis virus mRNA for coat protein, partial cds, strain A	Bean common m...	217	217	57%	56-52	87.63%	788	AB734777.1	
Zucchini yellow mosaic virus isolate TM40 polyprotein gene, complete cds	Zucchini yellow...	161	161	65%	26-35	80.73%	9547	KY225556.1	
Zucchini yellow mosaic virus isolate TM50 polyprotein gene, complete cds	Zucchini yellow...	161	161	65%	26-35	80.73%	9556	KY225544.1	

Hình 3. Kết quả đoạn DNA xác định rõ trình tự được tiến hành BLAST trên NCBI (ngân hàng gen).

4. Bàn luận

Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh được xem là một kỹ thuật được ứng dụng thành công trong nhân giống cây trồng sạch bệnh virus [7]. Một trong những giai đoạn quyết định thành công trong quy trình nhân giống *in vitro* sạch virus đó là khử trùng mẫu để tạo nguồn vật liệu *in vitro*. Chất khử trùng thường gây độc đối với mô thực vật khi mẫu tiếp xúc với dung dịch khử trùng (đặc biệt là thủy ngân) trong thời gian khá lâu, làm mẫu chết, giảm tỷ lệ sống; do đó loại, nồng độ, thời gian tiếp xúc và loại bỏ tồn dư của chất khử trùng trong mẫu trở nên quan trọng trong quy trình khử trùng mẫu [16, 17]. Hơn nữa, khử trùng bề mặt không loại bỏ các tác nhân gây nhiễm nội sinh có thể tồn tại bên trong mô [18]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, mô phân sinh đỉnh được thu nhận từ các chồi đỉnh của những cây chanh dây lấy trực tiếp từ ngoài đồng ruộng và không thông qua khử trùng bề mặt. Kết quả ghi nhận tỷ lệ nhiễm trên 50% và với phương pháp không khử trùng bề mặt thì kết quả này đã mang lại thành công cao trong khử trùng mẫu. Kết quả của nghiên cứu ghi nhận tương tự như kết quả của H.Y. Reyl và cs (2003) [19]

trên cây *Arachis pintoi*, mẫu nhiễm ghi nhận với tỷ lệ khoảng 60% khi những chồi đỉnh được thu nhận trực tiếp từ những cây trồng ngoài đồng ruộng mà không thông qua khử trùng bằng các hóa chất.

Một số virus gây bệnh trên cây chanh dây toàn thế giới bao gồm, PWV, passiflora ringspot virus (PRV), passiflora latent virus (PLV), passion fruit yellow mosaic virus (PaYMV), cucumber mosaic virus (CMV), cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), tomato ringspot virus (ToRSV), passion fruit mottle virus (PaMV), purple granadilla mosaic virus (PGMV), passion fruit vein clearing virus và một Potyvirus liên quan đến bệnh khảm trên quả chanh dây đã được báo cáo từ Puerto Rico và Cộng hòa Dominica [20]. Tại Lâm Đồng, có khoảng 3 virus gây hại chính cây chanh dây bao gồm: CMV gây đốm trên lá và trên quả; ToMRV làm lá bị khảm vàng, quả bị biến dạng; quả có hiện tượng bị hóa gỗ do PWV thuộc Potyvirus gây ra [3, 4]. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật RT-PCR được sử dụng để kiểm tra 3 loại virus CMV, ToRSV và Potyvirus gây bệnh cây chanh dây tại Lâm Đồng trên những mẫu chồi chanh dây tím và vàng có nguồn gốc từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh. Kết quả cho thấy, chỉ có mẫu V1 bị nhiễm Potyvirus, trong khi 3 mẫu T1, T2 và V2 sạch bệnh đối với cả 3 loại virus gây bệnh được kiểm tra. Một nghiên cứu trước đây của S. Prammanee và cs (2011) [1], sử dụng kỹ thuật ELISA để xác định tính sạch bệnh đối với virus PWV gây bệnh trên cây chanh dây ở tỉnh Chiang Mai, Thái Lan từ những chồi có nguồn gốc nuôi cấy mô phân sinh đỉnh.

Nghiên cứu này là công trình đầu tiên về tạo giống chanh dây sạch bệnh virus (CMV, ToRSV và Potyvirus) ở Việt Nam bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh không thông qua khử trùng mẫu. Để tạo giống chanh dây hoàn toàn sạch virus gây bệnh trên cây chanh dây hiện nay là vấn đề cần được quan tâm; nên cần kiểm tra tính sạch virus đối với nhiều loại virus gây bệnh hiện nay. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này cũng đã đáp ứng một phần về tạo vật liệu chồi *in vitro* chanh dây tím và vàng sạch bệnh virus trong quy trình nhân giống chanh dây sạch bệnh virus. Tóm lại, nuôi cấy mô phân sinh đỉnh đã khẳng định được vai trò trong tạo giống sạch bệnh virus đối với cây chanh dây trong nghiên cứu này và có thể mở rộng ứng dụng cho các đối tượng cây trồng khác hiện nay.

5. Kết luận

Qua nghiên cứu trên, chúng tôi đã thu nhận được những chồi *in vitro* chanh dây tím và vàng sạch virus CMV, ToRSV và Potyvirus bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh không thông qua khử trùng bề mặt sau 10 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BA. Đây là kết quả bước đầu tạo vật liệu chồi sạch virus phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo trong quy trình vi nhân giống chanh dây tím và vàng sạch virus. Góp phần giải quyết vấn đề nhu cầu về giống chanh dây sạch bệnh virus cho nông dân tỉnh Lâm Đồng nói riêng và cả nước nói chung.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.01-2020.10. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Prammanee, S. Thumjamras, P. Chiemsombat, et al. (2011), "Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants", *Crop Protection*, **30**(11), pp.1425-1429, DOI: 10.1016/j.cropro.2011.07.008.
- [2] L.V.T. Huan, P.Q. Vu (2010), "In vitro asexual propagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) using stem segments bearing axillary buds", *Journal of Biotechnology*, **8**(3), pp.379-385.
- [3] T. Hieu, T.H. Phong, H.D. Khai, et al. (2022), "Efficient production of vigorous passion fruit rootstock for *in vitro* grafting", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **148**(1), pp.1-14, DOI: 10.1007/s11240-021-02220-1.
- [4] M.O. Ssemakula, T. Sengooba, J.J. Hakiza, et al. (2012), "Characterisation and distribution of a Potyvirus associated with passion fruit woodiness disease in Uganda", *Plant Disease*, **96**(5), pp.659-665, DOI: 10.1094/PDIS-03-11-0263.
- [5] J.H. Fischer, J.A.M. Rezende (2008), "Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.)", *Pest Technology*, **2**(1), pp.1-19.
- [6] R.H. Taylor, K.A. Kimble (1964), "Two unrelated viruses which cause woodiness of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.)", *Australian Journal of Agricultural Research*, **15**(1), pp.560-570, DOI: 10.1071/AR9640560.
- [7] K. Mori, D. Hosokawa (1977), "Localisation of viruses in apical meristem and production of virus-free plants by means of meristem and tissue culture", *Acta Horticulturae*, **78**, pp.389-396, DOI: 10.17660/ActaHortic.1977.78.49.
- [8] M.A. Miassar, D.S. Hassawi, S.M.A. Romman (2011), "Production of virus free potato plants using meristem culture from cultivars grown under Jordanian environment", *The American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, **11**(4), pp.467-472.
- [9] H. Taskin, G. Baktemur, M. Kurul, et al. (2013), "Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR", *The Scientific World Journal*, **2013**, DOI: 10.1155/2013/781282.
- [10] A.B. Whitehouse, C.L. Govan, K.J. Hammond, et al. (2011), "Meristem culture for the elimination of the strawberry crown rot pathogen *Phytophthora cactorum*", *Journal of Berry Research*, **1**(3), pp.129-136, DOI: 10.3233/BR-2011-014.
- [11] J. Dobránszki, J.A.T.D. Silva (2013), "In vitro shoot regeneration from transverse thin cell layers of apple leaves in response to various factors", *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **88**(1), pp.60-66, DOI: 10.1080/14620316.2013.11512936.
- [12] S. Kumar, M.S. Khan, S.K. Raj, et al. (2009), "Elimination of mixed infection of Cucumber mosaic and Tomato aspermy virus from *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture", *Scientia Horticulturae*, **119**(2), pp.108-112, DOI: 10.1016/j.scienta.2008.07.017.
- [13] J.A. Griesbach (1995), "Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction", *Plant Disease*, **79**(1), pp.1054-1056.
- [14] D.R. Wulandari, T.M. Ermayanti (2011), "Detection of Potyvirus using RT-PCR and ACP-ELISA of *Dioscorea* species and *in vitro* shoot multiplication of the virus free plants", *Annales Bogorienses*, **15**(2), pp.1-8.
- [15] D.B. Duncan (1955), "Multiple range and multiple F test", *Biometrics*, **11**, pp.1-42, DOI: 10.1016/j.soilbio.2006.03.024.
- [16] K. Manvir, H.S. Dhaliwal, T. Anirudh, et al. (2015), "In vitro plantlet formation in Carrizo citrange: A promising citrus rootstock", *Indian Journal of Horticulture*, **72**(1), pp.1-6, DOI: 10.5958/0974-0112.2015.00001.8.
- [17] N. Srivastava, B. Kamal, V. Sharma, et al. (2010), Standardization of sterilization protocol for micropropagation of *Aconitum heterophyllum* - An endangered medicinal herb, *Academic Arena*, **2**(6), pp.62-66.
- [18] A.V. Roberts (2003), "Cell, tissue and organ culture: Micropropagation", *Encyclopedia of Rose Science*, University of East London, pp.57-66.
- [19] H.Y. Reyl, L.A. Mroginski (2003), "Regeneration of plants from apical meristem tips and nodal segments of *Arachis pintoi*", *Peanut Science*, **30**(2), pp.75-79, DOI: 10.3146/pnut.30.2.0001.
- [20] A. Brunt, K. Crabtree, A. Gibbs (1990), *Viruses of Tropical Plants*, Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK, 707pp.

Nghiên cứu thử nghiệm nuôi tảo *Chaetoceros calcitrans* trong hệ thống quang sinh vận hành bằng khí

Nguyễn Đức Bách^{1,2*}, Phạm Tài Minh³, Vũ Lê Diệu Hương², Phí Thị Cẩm Miện^{1,2}

¹Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Vi tảo và Dược mỹ phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

³Sở Khoa học và Công nghệ Nam Định, 1A Trần Tế Xương, phường Vị Hoàng, thành phố Nam Định, tỉnh Nam Định, Việt Nam

Ngày nhận bài 19/7/2021; ngày chuyển phản biện 22/7/2021; ngày nhận phản biện 18/8/2021; ngày chấp nhận đăng 23/8/2021

Tóm tắt:

Chaetoceros calcitrans là loài tảo silic nước mặn, kích thước nhỏ, có hàm lượng dinh dưỡng cao, được sử dụng phổ biến làm nguồn thức ăn cho ấu trùng các loài thủy sản. Ở Việt Nam, tảo *C. calcitrans* được nhân giống từ các bình nhỏ, sau đó nâng dần thể tích nuôi tới các bể hồ lớn. Mặc dù tảo *C. calcitrans* được nuôi ở nhiều cơ sở sản xuất giống thủy sản nhưng quá trình nuôi vẫn gặp nhiều khó khăn, như tảo phát triển không ổn định, mật độ thấp hoặc dễ bị tàn lụi, nguyên nhân do tạp nhiễm, chất lượng giống ban đầu không đồng đều, khuấy trộn khí chưa hiệu quả và nhiệt độ không ổn định. Nghiên cứu này thử nghiệm hệ thống quang sinh vận hành bằng khí đẩy (Air-lift photobioreactor - ALPBR) để nhân giống *C. calcitrans*. Hệ thống ALPBR được lắp đặt bằng các ống thủy tinh có đường kính 32 mm và tổng chiều dài 18 m, thể tích 14,5 l. Điều kiện vận hành của hệ thống ở mật độ tiếp giống $0,5-0,75 \times 10^6$ tế bào/ml, tốc độ dòng 40 cm/giây và cường độ ánh sáng 12,5 klux ở nhiệt độ 26-28°C. Mật độ tảo *C. calcitrans* đạt cao nhất ở mức $7,65 \times 10^6$ tế bào/ml. Kết quả thử nghiệm ban đầu cho thấy có thể áp dụng hệ thống ALPBR để nhân giống và sinh khối tảo *C. calcitrans* làm thức ăn cho nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: *Chaetoceros calcitrans*, cường độ ánh sáng, hệ thống quang sinh vận hành bằng khí, ôxy hoà tan, tốc độ dòng chảy.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Tảo *C. calcitrans* thuộc nhóm tảo silic, tế bào có kích thước nhỏ, sinh trưởng nhanh, hàm lượng dinh dưỡng cao, đặc biệt chứa axit béo không no đa nối đôi (PUFAs) [1, 2]. Chính vì vậy, tảo *C. calcitrans* được nuôi phổ biến để làm thức ăn cho ấu trùng thủy sản, đặc biệt là nhóm giáp xác và nhuyễn thể [3, 4]. Về mặt hình thái, tế bào tảo *C. calcitrans* có kích thước nhỏ (2-8 μ m), dạng hình hộp lồng, tế bào hình vuông hoặc chữ nhật ở 4 góc có 2 cặp gai (seta) tương đối dài [5]. Các nghiên cứu về *C. calcitrans* và *C. muelleri* ở Việt Nam tập trung vào phân lập và xác định ảnh hưởng của môi trường, các điều kiện nuôi đến sự sinh trưởng của tảo [3-7]. Thực tế, tảo giống *C. calcitrans* thường được nuôi trong các môi trường lỏng như F/2, Walne hoặc Conway sử dụng các bình nhựa hay thủy tinh nhỏ, sau đó được nhân tiếp trong các bình lớn hơn (từ 5 đến 10 l) trong phòng thí nghiệm hoặc phòng mát 20-28°C, sử dụng ánh sáng trắng, cường độ từ 2 đến 5 klux và sục khí với mật độ đạt được dao động từ 10^6 đến 5×10^6 tế bào/ml [3-7]. Hiện nay ở Việt Nam, các cơ sở nhân giống thủy sản quy mô vừa và nhỏ thường nhân tảo giống trong phòng, sau đó tiếp tục nuôi trong các túi nylon, bình, xô nhựa lớn (thể tích từ 30 đến 100 l), cuối cùng sẽ nhân sinh khối trong các bể lớn thể tích 2-10 m³ hoặc lớn hơn, đặt ngoài trời dưới mái che cắt sáng bằng lưới nylon đen hoặc nuôi trong nhà để làm thức ăn tươi cho ấu trùng.

Mặc dù quá trình nuôi tảo *Chaetoceros* sp. trong nước hiện nay đã đạt được nhiều kết quả [3-8]. Tuy nhiên, khi khảo sát thực tế tại các trại, cơ sở sản xuất giống thủy sản ở Nam Định, Ninh Bình, Hà Nam, Hải Phòng vẫn thường gặp một số vấn đề khó khăn như chưa chủ động được nguồn giống ban đầu, mức độ tạp nhiễm tăng dần theo thời gian, quy trình nuôi chưa ổn định, các điều kiện nuôi như nhiệt độ, ánh sáng và khuấy trộn (sục khí) chưa được chuẩn hoá nên tảo sinh trưởng chậm, mật độ nuôi sinh khối còn thấp hơn nhiều so với khi nuôi trong phòng. Hiện tượng tảo bị tàn lụi đột ngột hoặc mật độ thấp vẫn thường xảy ra nên chưa đáp ứng được nhu cầu thức ăn cho ấu trùng, dẫn đến thiệt hại kinh tế và công sức cho người làm giống. Do đó, cần thực hiện các nghiên cứu và thử nghiệm để tìm ra giải pháp kỹ thuật và mô hình nuôi mới, nhằm ổn định quy trình nuôi, nâng cao mật độ, độ đồng đều và chất lượng sinh khối tảo.

Đến nay, nhiều hình thức nuôi tảo sử dụng túi polyetylen, bình polycarbonate, bể raceway hoặc các hệ thống quang sinh (Photobioreactor - PBR) dạng cột (bubble column) hoặc dạng ống (tubular PBR) được sục khí hoặc đẩy bằng bọt khí để khuấy trộn hay tạo dòng chảy để làm thức ăn cho thủy sản [9, 10]. Trong đó, hệ thống PBR đã được nghiên cứu và thử nghiệm ở các quy mô khác nhau tại nhiều quốc gia trên thế giới [11-15]. Mặc dù chi phí lắp đặt tương đối cao

*Tác giả liên hệ: Email: ndbach@vnua.edu.vn

A cultivation trial of *Chaetoceros calcitrans* in an air-lift photobioreactor

Duc Bach Nguyen^{1,2*}, Tai Minh Pham³,
Le Dieu Huong Vu², Thi Cam Mien Phi^{1,2}

¹Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

²Institute for Microalgae and Pharmacocosmetics, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

³Nam Dinh Department of Science and Technology,
1A Tran Te Xuong Street, Vi Hoang Ward, Nam Dinh City, Nam Dinh Province, Vietnam

Received 19 July 2021; revised 18 August 2021; accepted 23 August 2021

Abstract:

Chaetoceros calcitrans is a marine planktonic diatom with small-sized and high-nutrient commonly used as a feed for larvae of aquatic species. In Vietnam, *C. calcitrans* is often cultivated from small vessels and subsequently gradually increased the culture volume to large open tanks. Although *C. calcitrans* is widely cultured in aquaculture hatcheries, the cultivation process is still facing many difficulties such as unstable growth, low density or collapse due to the high risk of contamination, low quality of seeding, insufficient mixing or aeration and the control of ambient conditions. This study investigated the airlift photobioreactor systems (ALPBR) for seedling cultivation of *C. calcitrans*. The ALPBR was constructed by using transparent glass tubes with a diameter of 32 mm, a total length of 18 m, and volume 14.5 l. The system was optimally operated at an inoculation of $0.5\text{--}0.75 \times 10^6$ cell.mL⁻¹, the flow rate at 40 cm.s⁻¹ and the solar light intensity at 12.5 klux at a temperature of 26–28°C. The highest cell density was at 7.65×10^6 cells.mL⁻¹. The obtained results may develop a model scale-up for algae seeding and biomass production as feed for aquaculture.

Keywords: air-lift photobioreactor, *Chaetoceros calcitrans*, dissolved oxygen, flow rates, light intensity.

Classification number: 4.6

và vận hành phức tạp nhưng các hệ thống PBR có nhiều ưu điểm như rút ngắn thời gian sinh trưởng của tảo do tận dụng ánh sáng tối đa, mật độ tảo cao hơn các hệ thống nuôi khác và giảm nguy cơ tạp nhiễm [16–18]. Các hệ thống PBR vận hành bằng bơm ly tâm thường gây áp lực, stress cho tảo trong đường ống, có thể làm gãy roi, hư hại tế bào và ảnh hưởng đến sinh trưởng của tảo [19–21]. Tuy nhiên, hệ thống ALPBR sử dụng khí nén sẽ tạo bọt để đẩy dòng chảy giúp hệ thống vận hành một cách nhẹ nhàng, giảm áp lực và tác động cơ học lên tảo, do đó phù hợp với các loài tảo có lông roi như *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*

[19–21]. Hệ thống ALPBR về cơ bản được thiết kế tương tự như các hệ thống PBR dạng ống kín và tuần hoàn, tuy nhiên thay vì sử dụng bơm đẩy/hút để huyền phù vi tảo di chuyển trong các ống thủy tinh thì sử dụng khí qua bộ phận tạo bọt để làm giảm áp suất cục bộ tại vị trí đưa khí vào trong lòng ống. Việc tạo áp suất giảm cục bộ sẽ tạo lực kéo làm cho dòng huyền phù vi tảo di chuyển, đồng thời không gây áp lực cơ học lên đường ống cũng như vi tảo, do đó phù hợp đối với các loài tảo có lông roi hoặc mẫn cảm với các tác động cơ học. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu và ứng dụng hệ thống ALPBR để nhân giống và sinh khối vi tảo [19–21].

Việc mở rộng diện tích nuôi trồng thủy sản dẫn đến nhu cầu nguồn thức ăn cho con giống thủy sản sẽ ngày càng tăng, chính vì vậy việc nghiên cứu phát triển các mô hình nuôi tảo khép kín, trong đó có đó hệ thống ALPBR để nhân giống và sản xuất sinh khối vi tảo ở quy mô lớn là nhu cầu của thực tiễn. Đến nay, việc nghiên cứu và ứng dụng hệ thống ALPBR ở Việt Nam còn hạn chế, do đó với mục tiêu phát triển hệ thống nuôi tảo theo mô hình ALPBR, nghiên cứu này đã thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự sinh trưởng của tảo *C. calcitrans* trong hệ thống ALPBR ở quy mô thí nghiệm, bao gồm tốc độ dòng chảy, cường độ ánh sáng, nồng độ ôxy hoà tan (DO). Nghiên cứu tạo cơ sở ban đầu để áp dụng lắp đặt các hệ thống nhân giống tảo khép kín liên tục hoặc bán liên tục ở quy lớn nhằm khắc phục nhược điểm của các hệ thống nuôi hở theo mô hình hiện nay, hướng tới chủ động sản xuất tảo giống và sinh khối cho các cơ sở sản xuất giống thủy sản.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

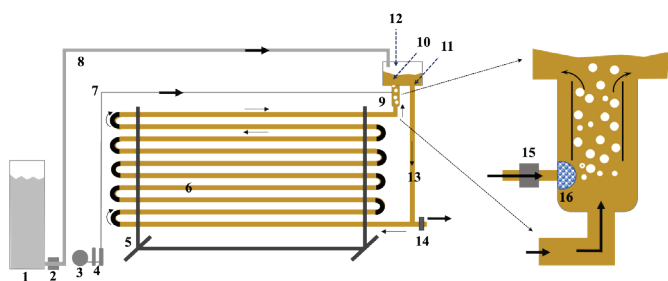
Chủng giống: Tảo *C. calcitrans* (Paulsen) Tanako 1968 từ Đại học Tsukuba Nhật Bản với mã chủng CCMP1315 được lưu giữ trong môi trường thạch bán lỏng (4% agar) trong môi trường Erdscheiber cải tiến [22, 23].

Môi trường bảo quản chủng giống: Môi trường Erdscheiber cải tiến với các thành phần (mg/l): NaNO₃ (196,35), Na₂HPO₄·7H₂O (17,69), CaCO₃ (0,00025), FeCl₃·6H₂O (2,35), MnCl₂·4H₂O (0,432), ZnSO₄·7H₂O (0,264), CoCl₂·6H₂O (0,048), NaMoO₄·2H₂O (0,003), Na₂EDTA·2H₂O (12), vitamin B₁₂ (0,00113), pH 7,5 [22]. Môi trường được bổ sung 50 ml dịch chiết đất/l. Dịch chiết đất được chuẩn bị bằng cách lấy 200 g đất khô nghiền thành bột và khuấy đều với 1 l nước cất, sau đó được lọc và hấp vô trùng. Môi trường bán lỏng được bổ sung 4 g agar/l và vô trùng ở 121°C trong 30 phút. Môi trường được bảo quản trong tối ở nhiệt độ 4°C cho tới khi sử dụng (vitamin B₁₂ bổ sung ngay trước khi dùng). Tảo được giữ ở nhiệt độ 15–17°C, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang 18 W Rạng Đông (Model: FL T8-18W Deluxe) ở cường độ 700 lux theo chu kỳ sáng tối 16/8.

Môi trường nuôi lỏng: Môi trường Conway cải tiến được sử dụng cho hệ thống ALPBR gồm các thành phần (g/l): KNO_3 (100), Na_3PO_4 (20), $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (45), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,3), ZnCl_2 (4,2), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,36), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4,0), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4,0), $(\text{NH}_4)_4\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,8), H_3BO_3 (33,4), ThiaminHCl (0,2), Cyanocobalamin/ B_{12} (0,01), pH 7,5 [23]. Muối biển nhân tạo ORiTA (ORiTA Salt, Aquaculture™) bổ sung với hàm lượng 25 g/l, muối silicate $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ được bổ sung vào với hàm lượng 30 mg/l. Để loại bỏ các yếu tố tạp nhiễm, môi trường Conway sau khi pha được bổ sung chlorine $\text{Ca}(\text{OCl}_2)$ ở nồng độ 20 ppm trong 120 phút sau đó trung hoà bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 20 ppm. Môi trường sau đó được cho chảy qua lớp bông lọc và chứa vào bình để sử dụng.

Đèn LED và chế độ chiếu sáng: Trong nghiên cứu này, đèn LED T8 Deluxe 22 W 1,2 m, bóng thủy tinh, nguồn rời (Model: BD TT01 NR M11/22Wx1, độ sáng 2500 lm, nhiệt độ màu 5000 K) của Công ty Cổ phần bóng đèn phích nước Rạng Đông được sử dụng để chiếu sáng cho tảo trong phòng thí nghiệm. Thời gian chiếu sáng 16:8 và cường độ chiếu sáng được sử dụng từ 2 klux ở giai đoạn mới tiếp giống và được điều chỉnh tăng lên 5 klux sau 3 ngày tính từ thời điểm tiếp giống. Đối với hệ thống ALPBR, sử dụng ánh sáng tự nhiên, cường độ ánh sáng được điều tiết bằng lưới cắt sáng.

Thiết kế và vận hành hệ thống ALPBR: Hệ thống được thiết kế và lắp đặt dựa trên cơ sở tham khảo nhiều công bố nước ngoài [24, 25]. Khung của hệ thống được thiết kế bằng kim loại có chiều dài 195 cm, rộng 110 cm để đỡ các ống thủy tinh. Mô hình thí nghiệm gồm 10 ống thủy tinh dài 1200 mm, đường kính trong 32 mm, độ dày 0,5 mm được nối với nhau bằng nút nhựa PVC với 2 đầu cuối được đặt trong bể chứa bằng nhựa lắp đặt cao hơn so với ống ở trên cùng 200 mm. Chiều dài toàn bộ đường ống 18 m và tổng thể tích của hệ thống đạt 14,5 l. Hệ thống được vận hành bằng khí nén (Pegasus TM-OF600-25L) điều chỉnh bằng van điều áp. Sơ đồ cấu tạo và nguyên lý hoạt động của hệ thống được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ lắp đặt và vận hành hệ thống ALPBR.

Ghi chú: (1) Bình chứa môi trường nuôi tảo; (2) Bơm ly tâm đẩy môi trường; (3) Máy nén khí; (4) Cột lọc khí; (5) Giá đỡ hệ thống quang sinh; (6) Ống thủy tinh đường kính 32 mm; (7) Ống dẫn khí; (8) Ống dẫn môi trường nuôi tảo; (9) Bộ phận trộn khí và lát cắt ngang được phóng to; (10) Vị trí đầu ra của dòng chảy; (11) Vị trí đầu vào của dòng chảy; (12) Bể xả khí; (13) Ống dẫn xuống; (14) Vị trí mở lấy tảo ra khỏi hệ thống sử dụng trong trường hợp nuôi bán liên tục; (15) Van khí 1 chiều; (16) Bộ phận tạo bọt khí. Chiều mũi tên thể hiện chiều dòng chảy hoặc đường đi của dòng khí.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khí đẩy sau khi đi qua màng lọc được dẫn vào bộ phận tạo bọt khí để đẩy dòng chất lỏng hướng lên trên đi vào bể chứa. Bể chứa có tác dụng xả khí ôxy và kết nối giữa phần đầu vào và đầu ra của hệ thống tạo vòng khép kín. Toàn bộ hệ thống được đặt trong nhà lưới có mái che và lưới đen để cắt sáng, nhiệt độ được điều tiết bằng phun hơi nước. Cường độ ánh sáng được điều chỉnh bằng cách sử dụng lưới che cắt sáng trong phạm vi từ 2,5 đến 20 klux. Trong điều kiện nuôi ở nhà lưới, cường độ ánh sáng trung bình ở giai đoạn 2 ngày đầu tiên từ khi bắt tiếp giống ở mật độ 0,5 triệu tế bào/ml được điều chỉnh trung bình khoảng 3-4 klux [5, 6]. Từ ngày thứ 3 sau khi tiếp giống, khi mật độ tế bào tăng lên, cường độ ánh sáng được điều chỉnh bằng lưới che ở mức tối đa 20 klux.

Xác định mật độ của tảo: Mật độ tế bào được xác định bằng buồng đếm Improved Neubauer. Mật độ được tính theo công thức: $C = (5N_1 + 1/2N_0) \times 5 \times 201 \times 10^4$ (tế bào/ml). Trong đó, C là mật độ tế bào/ml; N_1 là tổng số tế bào trong 5 ô lớn của buồng đếm (không tính những tế bào dính vào phần biên ngoài); N_0 là số lượng tế bào ở 4 cạnh của 5 ô lớn [26].

Đồ thị tương quan giữa mật độ tế bào và mật độ quang học A_{680} : Để đánh giá tốc độ sinh trưởng của tảo, đồ thị tương quan giữa độ hấp thụ quang học ở bước sóng 680 nm (A_{680}) và mật độ tế bào được xây dựng [27]. Cụ thể, huyền phù tảo ở các mức độ pha loãng khác nhau được đồng thời đếm tế bào và đo độ hấp thụ quang học A_{680} trong khoảng từ 0,2 đến 0,8 để xây dựng đồ thị tương quan bằng phần mềm Excel.

Xác định tốc độ sinh trưởng riêng (μ): Được xác định ở pha sinh trưởng logarit theo công thức sau:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

trong đó: N_2 và N_1 là mật độ tế bào ở thời điểm t_2 và t_1 ; t là thời gian (ngày). Thời gian nhân đôi hay thời gian thế hệ (doubling time) $T_d = \ln(2)/\mu$ (ngày).

Xác định mối tương quan giữa lưu lượng khí và tốc độ dòng chảy trong hệ thống: Để xác định tốc độ dòng chảy phù hợp trong quá trình nuôi tảo, đồ thị tương quan giữa tốc độ dòng chảy và lưu lượng khí được xây dựng. Tốc độ dòng chảy được xác định thông qua cách đo độ dẫn điện dùng nước khử ion để chạy trong hệ thống và dung dịch NaCl bão hoà (360 g/l hay 6,15 M) được dùng làm chất đánh dấu [28]. Độ dẫn điện được đo liên tục bằng máy đo độ dẫn điện (Hanna Instruments HI993301-02, điện cực EC HI7630, Rumani). Khi hệ thống chạy ổn định ở một lưu lượng khí nhất định, điện cực của máy đo độ dẫn điện được đặt ở phần đầu ra bộ tách khí lỏng để đo độ dẫn điện, sau khi giá trị đo với nước khử ion trong hệ thống ổn định, 10 ml

dung dịch NaCl bão hoà được bơm vào đầu vào của hệ thống và giá trị độ dẫn điện được đo liên tục. Khoảng thời gian ($\Delta t = T_0 - T_1$) được tính từ thời điểm NaCl bão hoà (T_0) được bổ sung ở vị trí đầu vào của hệ thống cho tới khi xác định được độ dẫn điện cực đại tại đỉnh (T_1). Khoảng thời gian dòng chất lỏng đi qua hết chiều dài đường ống được gọi là thời gian chạy 1 vòng hay chu kỳ. Quá trình đo được lặp lại ít nhất 3 lần để thu được giá trị ổn định ở mỗi lưu lượng khí đẩy vào hệ thống.

Xác định nồng độ oxy hoà tan trong ống: Nồng độ oxy hoà tan (DO, mg/l) được đo bằng máy đo DO (Hana instruments HI98193, điện cực DO HI764073). Nồng độ DO tạo ra do quang hợp được xác định trong điều kiện chiếu sáng bằng ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới với các cường độ từ 2,5 đến 20 klux (tương đương 135 đến 1080 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) [29]. Nhiệt độ tại thời điểm thí nghiệm dao động điều chỉnh trong phạm vi 26-28°C sử dụng lưới đen và phun hơi nước làm mát.

Xác định mối tương quan giữa cường độ ánh sáng và nồng độ DO: 4 mức cường độ ánh sáng khác nhau từ 2,5 đến 20 klux được sử dụng trong quá trình nuôi tảo. Cường độ ánh sáng được đo bằng máy Milwaukee, Rumani-Eu, MW700. Nhiệt độ nuôi hệ thống đặt nhà lưới được kiểm soát trong phạm vi 26 đến 28°C. Mẫu tảo được lấy ra đo độ hấp thụ quang ở A_{680} nm sau mỗi ngày nuôi [27].

Xác định mối tương quan giữa tốc độ dòng chảy và nồng độ DO: Nồng độ DO tích lũy trong quá trình quang hợp (oxygen evolution) tương ứng ở mỗi tốc độ dòng chảy tại một giá trị cường độ ánh sáng nhất định được xác định bằng cách đo trực tiếp tại đầu ra của hệ thống.

Xác định mối tương quan giữa tốc độ dòng chảy và tốc độ sinh trưởng của tảo: Tốc độ sinh trưởng của tảo ở các tốc độ dòng chảy khác nhau được xác định dựa vào giá trị A_{680} . Đồ thị tương quan giữa tốc độ sinh trưởng riêng (μ) và tốc độ dòng chảy (v) được xây dựng tại cường độ ánh sáng tối ưu, tại đó nồng độ oxy sinh ra trong quang hợp là lớn nhất.

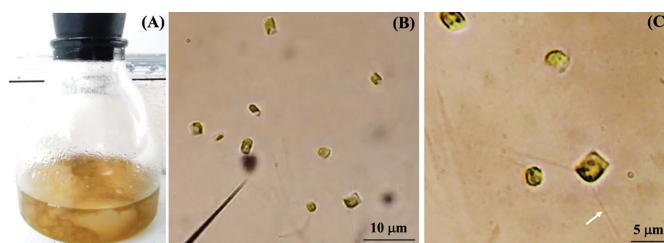
Phân tích số liệu: Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD). Chương trình Microsoft Excel (2016)

được sử dụng để vẽ các đồ thị. Các giá trị đo ở các thí nghiệm được kiểm tra phân phối chuẩn dựa vào đánh giá hàm mật độ có tính đối xứng qua giá trị trung bình và trung vị. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được xác định bằng phân tích phương sai (ANOVA) với mức ý nghĩa $p=0,05$. Hậu kiểm (Tukey's test) được áp dụng để xác định sự khác nhau giữa cặp các giá trị trung bình trong các công thức thí nghiệm.

3. Kết quả và bàn luận

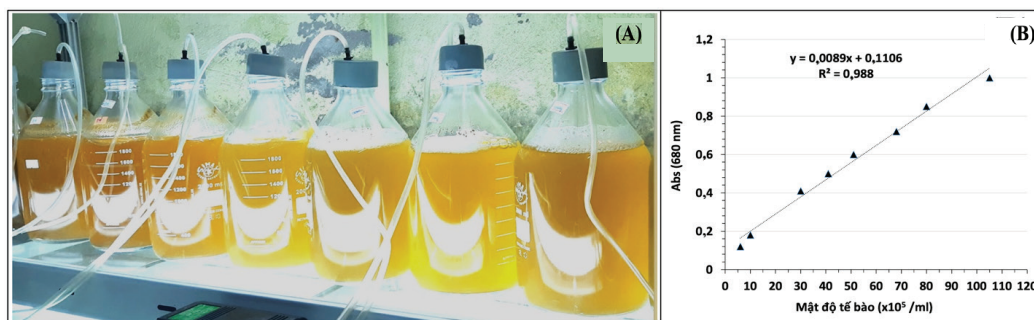
3.1. Nhân giống tảo

Tảo *C. calcitrans* được giữ trong môi trường thạch bán lỏng ở nhiệt độ 15°C được nhân từng bước trong môi trường Erdschreiber, tế bào tồn tại chủ yếu ở dạng hợp chữ nhật có kích thước 3×5 mm và có 4 roi (gai) đặc trưng tại 4 góc của tế bào (hình 2A). Hình 2B và 2C thể hiện hình thái tế bào tảo chụp ở độ khuếch đại 100X và 400X. Mũi tên trắng chỉ roi ở góc tế bào.



Hình 2. Giống tảo *C. calcitrans* sử dụng trong nghiên cứu.

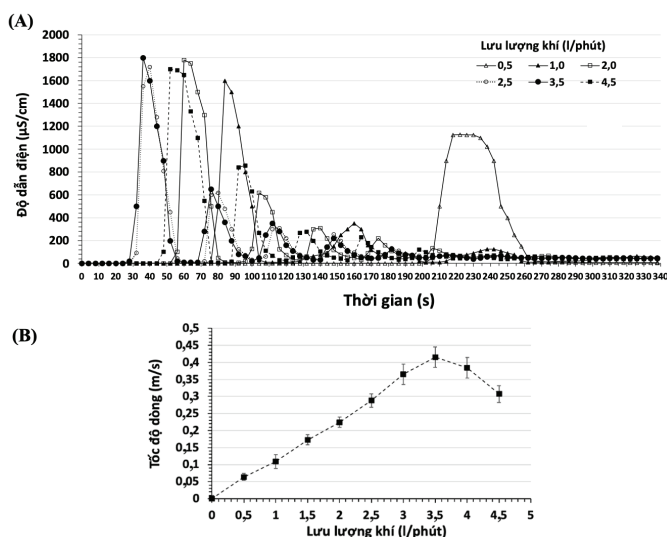
Quá trình nhân tảo *C. calcitrans* được thực hiện bằng cách san giống và bổ sung môi trường Erdschreiber lỏng cải tiến theo tỷ lệ 1:3 (thể tích giống/môi trường). Trong điều kiện phòng thí nghiệm, khi mới san giống, tảo được chiếu sáng ở cường độ 3-5 klux. Sau 3 ngày, tảo được chiếu sáng ở cường độ 5 klux bằng đèn huỳnh quang cả phía trên và dưới các bình nuôi (hình 3A). Mật độ tảo đạt cực đại sau 8 ngày nuôi ở mức $4,2 \times 10^6$ tế bào/ml. Mối tương quan giữa mật độ tế bào và độ hấp thụ quang học tại bước sóng 680 nm được thể hiện ở hình 3B.



Hình 3. Nhân giống tảo *C. calcitrans* trong phòng thí nghiệm.

3.2. Xác định tốc độ dòng chảy

Tốc độ dòng chảy trong lòng ống phụ thuộc vào tốc độ hay lưu lượng dòng khí được đẩy vào trong hệ thống ALPBR. Trong nghiên cứu này, các mức độ lưu lượng khí được thử nghiệm, cho thấy, ở lưu lượng khí đẩy vào thấp hơn 0,3 l/phút không đủ khả năng tạo lực nâng đủ để đẩy dung dịch bên trong ống vào bình xả khí, do đó gần như không có dòng chảy bên trong lòng ống. Bằng cách đo độ dẫn điện khi sử dụng dung dịch NaCl bão hòa, ở mức lưu lượng khí từ 0,5 l/phút, thời gian cho 1 chu kỳ dòng chảy (giá trị cao nhất của độ dẫn điện) tại đầu ra của hệ thống là 230 giây (3,83 phút) với tốc độ dòng chảy đạt khoảng 6,3 cm/giây (hình 4A). Khi tăng dần lưu lượng khí đẩy vào trong hệ thống, tốc độ dòng chảy tăng nhanh. Kết quả phân tích cho thấy, khi tăng lưu lượng khí đẩy vào hệ thống ở các mức từ 1,0, 2,0, 2,5 và 3,5 l/phút, các đỉnh có độ dẫn điện tương ứng theo thời gian quy đổi tương đương 84, 60, 40, 36 giây (hình 4A). Khi tiếp tục tăng lưu lượng khí đến 4,0 l/phút, tốc độ dòng chảy trong ống giảm và thời gian cho 1 chu kỳ chạy toàn bộ hệ thống khoảng 47 giây. Nguyên nhân là do lượng bọt khí và kích thước bọt khí tạo ra quá nhiều, dẫn đến hiệu quả nâng dòng chảy vào bể thoát khí kém hiệu quả. Ở lưu lượng khí 3,5 lít/phút, tốc độ dòng chảy trong hệ thống đạt mức cao nhất khoảng 0,45 m/s (hình 4B). Thực tế lưu lượng khí đưa vào hệ thống ALPBR cũng đã được nhiều nhóm nghiên cứu thử nghiệm [30, 31], điển hình khi nghiên cứu nuôi tảo *Scenedesmus obliquus* (CCAP 276/3A), A. Massart và cs (2014) [32] đã khảo sát các mức lưu lượng khí đưa vào hệ thống từ 0,5 đến 7,0 l/phút ảnh hưởng đến năng suất sinh khối, mật độ tế bào, tốc độ sinh trưởng riêng. Bằng cách sử dụng dung dịch NaCl làm chất đánh dấu đã xác định được mối tương quan giữa tốc độ dòng chảy và lưu lượng khí đẩy vào trong hệ thống.

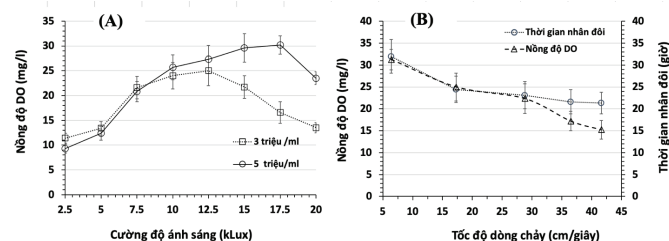


Hình 4. Mối tương quan giữa tốc độ dòng chảy và lưu lượng khí đẩy. (A) Động học dòng chảy thông qua đo độ dẫn điện theo thời gian; (B) Tương quan lưu lượng khí và tốc độ dòng chảy trong hệ thống ALPBR.

3.3. Xác định các đặc điểm sinh trưởng của tảo trong hệ thống ALPBR

Trong quá trình quang hợp, oxy sẽ được giải phóng và hoà tan vào trong huyền phù tảo. Do đó, nồng độ DO sẽ tỷ lệ với cường độ quang hợp và trạng thái sinh lý của tảo. Trong nghiên cứu này, các mức cường độ ánh sáng từ 2,5 đến 20 klux được thử nghiệm để đánh giá khả năng quang hợp của tảo trong hệ thống ALPBR. Kết quả cho thấy, ở mật độ $3,0 \times 10^6$ tế bào/ml giá trị DO cao nhất đo được ở cường độ ánh sáng 12,5 klux (25,4 mg/l) và thấp nhất ở 2,5 klux (12,2 mg/l). Khi tăng cường độ ánh sáng vượt mức 15 klux, giá trị DO đo được giảm (hình 5A). Ở mật độ $5,0 \times 10^6$ tế bào/ml, cường độ ánh sáng cho giá trị DO cao nhất ở mức 17,5 klux đạt 30,2 mg/l (hình 5A). Các nghiên cứu cho thấy, nồng độ DO liên quan trực tiếp tới mật độ tảo vì ảnh hưởng bởi mức độ che khuất ánh sáng tạo ra khi mật độ tảo tăng lên, đồng thời tốc độ dòng chảy trong ống cũng là một yếu tố quyết định [15, 33].

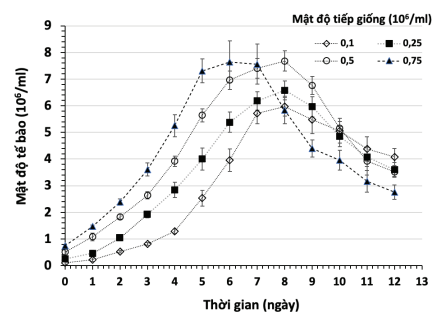
Trong điều kiện thí nghiệm, tảo sinh trưởng tốt nhất ở tốc độ dòng chảy 36,5 đến 41,6 cm/giây và cường độ ánh sáng (phụ thuộc vào mật độ tảo), tuy nhiên ở ngưỡng 12,5 đến 15,0 klux là phù hợp vì đường kính của ống thủy tinh sử dụng trong nghiên cứu có đường kính 32 mm cho phép ánh sáng đi qua tất cả các chiều ngay cả khi tảo ở mật độ cao 7×10^6 tế bào/ml. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, hệ thống được lắp đặt bằng cách gắn các ống thủy tinh sử dụng các nút nối bằng nhựa PVC, do đó quá trình quang hợp vẫn bị ngắt quãng một phần bởi các vị trí nối ống, vì vậy thời gian tiếp xúc với ánh sáng bị mất đi một phần (khoảng 17,85%, tổng chiều dài 14,5 m đường ống có 2,5 m bị che khuất bằng ống PVC). Trong trường hợp toàn bộ đường ống được làm bằng thủy tinh (kể cả các đầu nối) thì cường độ ánh sáng tối ưu sẽ thay đổi. Tuy nhiên, đối với hệ thống sử dụng trong nghiên cứu này, cường độ ánh sáng tối ưu dao động trong phạm vi từ 12,5 đến 15,0 klux. Khi cường độ ánh sáng cao hơn (15 đến 20 klux), tốc độ sinh trưởng của tảo giảm mạnh do hiệu ứng ức chế quang hợp bởi cường độ ánh sáng quá cao (hình 5A). Một số nghiên cứu cho thấy, tảo có khả năng phục hồi sau khi giảm cường độ ánh sáng về mức tối ưu, tuy nhiên khả năng phục hồi sau khi bị ức chế phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc với cường độ ánh sáng cao [14, 16].



Hình 5. Mối liên hệ giữa các yếu tố liên quan đến sự sinh trưởng của tảo. (A) Tương quan giữa cường độ ánh sáng và nồng độ DO đo ở 2 mức mật độ 3 và 5 triệu tế bào/ml; (B) Tương quan giữa tốc độ dòng chảy và nồng độ DO với tốc độ dòng chảy được xác định ở mật độ $5,0 \times 10^6$ tế bào/ml, cường độ chiếu sáng 12,5 klux; tương quan giữa tốc độ dòng chảy và thời gian (thể hệ) nhân đôi của tế bào được xác định ở mật độ tiếp giống $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml, cường độ chiếu sáng 12,5 klux.

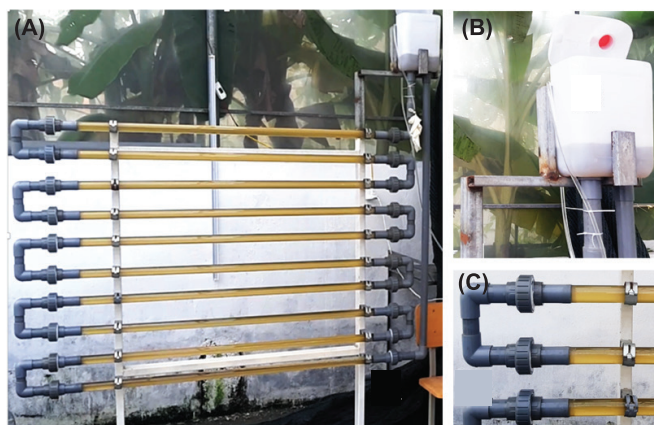
Nghiên cứu ảnh hưởng giữa tốc độ dòng chảy và nồng độ DO cho thấy, tốc độ dòng chảy tỷ lệ nghịch với nồng độ DO. Ở tốc độ dòng chảy thấp 6,4 cm/giây giá trị DO đo được ở mức 31,25 mg/l (tại mật độ tảo 5×10^6 tế bào/ml và cường độ ánh sáng 12,5 klux), tuy nhiên khi tăng tốc độ dòng chảy lên khoảng 40 cm/giây, nồng độ DO giảm còn 15,23 mg/l (hình 5B). Mặc dù thời gian và ngưỡng chịu đựng nồng độ DO của tảo *C. calcitrans* trong hệ thống PBR vẫn chưa được đề cập một cách cụ thể, nhưng một số nghiên cứu cho thấy, khi lượng oxy vượt quá 35 mg/l sẽ gây độc cho hầu hết các loài tảo [34, 35] và nồng độ DO cao hơn 300% mức bão hoà trong không khí (mức bão hoà DO trong không khí khoảng 8 mg/l) sẽ ức chế quang hợp và sinh trưởng của tảo [27]. Ngoài ra, tỷ lệ CO_2 và oxy cũng ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme Rubisco (Ribulose-1, 5-diphosphate carboxylase oxygenase) liên quan đến khả năng cố định CO_2 ở cả vi tảo và thực vật [36, 37]. Chính vì vậy, đối với hệ thống PBR việc loại bỏ bớt oxy khi nồng độ vượt quá cao là cần thiết vì oxy sẽ gây độc cho tảo. Ở tốc độ dòng chảy 6,4 cm/giây giá trị DO đo được ở mức 31,25 mg/l sẽ gây ức chế sự sinh trưởng của tế bào trong điều kiện ánh sáng mạnh. Tuy nhiên khi tốc độ dòng chảy đạt 40 cm/giây, nồng độ DO đo được nằm trong khoảng 15-17 mg/l, ở mức không gây ảnh hưởng đến quang hợp và gây độc tế bào (hình 5B). Kết quả này cũng tương ứng với nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ dòng chảy đến tốc độ sinh trưởng riêng (m) và thời gian nhân đôi (thế hệ) của tảo khi nuôi trong hệ thống này. Thời gian nhân đôi của tảo giảm đáng kể từ 32 giờ ở tốc độ 6,4 cm/giây xuống còn 21,3 giờ ở tốc độ 40 cm/giây (hình 5B). Từ kết quả nghiên cứu thu được, có thể suy luận rằng đối với hệ thống PBR có chiều dài đường ống lớn thì ngoài việc điều chỉnh tốc độ dòng chảy trong ống, việc loại bỏ oxy đi kèm với bổ sung CO_2 sẽ làm thay đổi tỷ lệ CO_2 và oxy trong ống. Nhờ đó, có thể duy trì điều kiện sinh trưởng tối ưu cho tảo trong hệ thống ALPBR khi nâng lên quy mô lớn. Ngoài ra, cần hiệu chỉnh các tham số cường độ ánh sáng nhằm tránh hoặc hạn chế hiện tượng ức chế quang hợp (photo-inhibition) và hiện tượng oxy hoá (photo-oxidation) bởi ánh sáng mạnh [33, 15].

Trên cơ sở kết quả thử nghiệm, đường cong sinh trưởng của tảo *C. calcitrans* được xây dựng với các mật độ tiếp giống từ 0,1 đến $0,75 \times 10^6$ tế bào/ml trong điều kiện tốc độ dòng khoảng 40 cm/giây, cường độ chiếu sáng từ 12 đến 15 klux. Kết quả cho thấy, ở mật độ tiếp giống $0,75 \times 10^6$ tế bào/ml, tảo sinh trưởng nhanh và hầu như không trải qua pha tiềm phát (pha lag) và đạt mật độ tảo tối đa ở mức $7,65 \pm 0,75 \times 10^6$ tế bào/ml sau 7 ngày (hình 6).



Hình 6. Đường cong sinh trưởng của tảo ở các mật độ tiếp giống khác nhau. Các thí nghiệm được thực hiện ở trong hệ thống ALPBR đặt trong nhà lưới che mái nylon và cắt sáng bằng lưới đen. Tốc độ dòng chảy dao động trong khoảng 40 cm/giây và cường độ chiếu sáng điều tiết ở mức 12-15 klux, nhiệt độ dao động 26-29°C.

Ở các mức tiếp giống ban đầu $0,5 \times 10^6$ và $0,75 \times 10^6$ tế bào/ml, thời gian tảo đạt mật độ tối đa tương ứng là $7,65 \pm 0,42 \times 10^6$ tế bào/ml sau 6 ngày và $7,68 \pm 0,38 \times 10^6$ tế bào/ml sau 8 ngày. Không có sự sai khác có ý nghĩa về mật độ tảo cực đại ở 2 mức tiếp giống này ($\alpha=0,05$), tuy nhiên xét về thời gian, mật độ tiếp giống cao hơn rút ngắn được thời gian nuôi trong hệ thống ALPBR đáng kể. Ở mức tiếp giống 0,1 và $0,25 \times 10^6$ tế bào/ml, mật độ tối đa đạt được tương ứng $5,96 \pm 0,53$ và $6,58 \pm 0,38 \times 10^6$ tế bào/ml sau 8 ngày nhưng mật độ tảo cực đại thấp (hình 6). Kết quả phân tích tốc độ sinh trưởng riêng (μ /ngày) tại thời điểm từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6 trong pha sinh trưởng logarit đạt 0,254, 0,317 và 0,325, tương ứng ở các mật độ tiếp giống $0,75 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ và $0,25 \times 10^6$ tế bào/ml. Trên cơ sở phân tích quan hệ giữa mức độ tiếp giống ban đầu, tốc độ sinh trưởng riêng, thời gian đạt mật độ tối đa và mật độ tảo tối đa, mật độ tảo ban đầu $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml là phù hợp trong mô hình hệ thống ALPBR (hình 7). So với điều kiện nuôi trong bình thủy tinh 2 l trong phòng thí nghiệm chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang ($4,2 \times 10^6$ tế bào/ml), mật độ tối đa của tảo nuôi trong hệ thống ALPBR cao hơn 1,7 lần.



Hình 7. Tảo *C. calcitrans* được nuôi trong hệ thống ALPBR. (A) Hệ thống ALPBR; (B) Bình xả khí; (C) Hình ảnh chụp khí tảo đang sinh trưởng ở mật độ 3×10^6 tế bào/ml.

4. Kết luận

Tảo *C. calcitrans* sinh trưởng tốt trong mô hình hệ thống ALPBR lắp đặt bằng các ống thủy tinh, vận hành bằng khí nén và chiếu sáng bằng ánh sáng tự nhiên. Trong phạm vi nghiên cứu này, ở mật độ tiếp giống $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml, cường độ ánh sáng 12-15 klux, mật độ tối đa đạt $7,68 \pm 0,38 \times 10^6$ tế bào/ml sau 8 ngày. Kết quả nghiên cứu ban đầu này có thể tham khảo, làm cơ sở để thử nghiệm mở rộng và phát triển các hệ thống nhân giống tảo khép kín liên tục hoặc bán liên tục ở quy lớn hơn cho loài vi tảo, đặc biệt các loài có lông roi như *C. calcitrans* ở các cơ sở sản xuất giống thủy sản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ Đề tài tiềm năng của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn giai đoạn 2020-2021. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. Sathasivam, R. Radhakrishnan, A. Hashem, et al. (2017), "Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine", *Saudi Journal of Biological Sciences*, **26**(4), pp.709-722, DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.11.003.
- [2] P. Han, Q. Lu, L. Fan, et al. (2019), "A review on the use of microalgae for sustainable aquaculture", *Appl. Sci.*, (9), DOI: 10.3390/app9112377.
- [3] N.T.T. Mai, T.H. Khai, Đ.V. Tri, N.V. Hung (2009), "Research on isolation, invitro culture of marine microalgae (*Chaetoceros calcitrans* Paulsen, 1905) and it's application as food for white shrimps (*Penaeus vannamei*)", *Science & Technology Development*, **12**(13), pp.28-36 (in Vietnamese).
- [4] T.A. Thu, V.T. Guong, N.V. Hoa, et al (2008), "The development of diatom algae (*Chaetoceros calcitrans*) under the interaction of soil and water in Artemia pond", *Journal of Science, Can Tho University*, **10**, pp.126-134 (in Vietnamese).
- [5] T.D. Chi, N.H. Hiep, N.T. Huong, et al (2003), "Initially investigating the effects of nutritional environment and temperature on growth and photosynthesis of 3 strains of microalgae of the genus *Chaetoceros* isolated in Vietnam", *VNU Journal of Science*, **8**, pp.6-16 (in Vietnamese).
- [6] N.T.K. Dung, B.T. Tam, L.A. Tung (2016), "Effects of nutrient content N, P, Si on the growth of the alga *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968 under laboratory conditions", *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development, Topical number: 55 years of Seafood Research Institute*, pp.194-198 (in Vietnamese).
- [7] N.T.T. Lien, L.T.T. Nhan, N.H. Son (2017), "Biomass and lipid production of marine diatom *Chaetoceros* ChTA at different nutrient concentrations", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **15**(1), pp.113-120 (in Vietnamese).
- [8] T.V. Phuong, N.V. Khanh, L.T.T. Nhan, et al (2017), "Effects of nutritional environment and initial density on the growth of two seaweed species *Chaetoceros muelleri* and *Tetraselmis suecica* and testing biomass culture under natural light conditions", *Hue University Journal of Science*, **126**(3D), pp.119-129, DOI: 10.26459/hueuni-jard.v126i3D.4300.
- [9] H.F. Kaspar, E.F. Keys, N. King, et al. (2016), "Continuous production of *Chaetoceros calcitrans* in a system suitable for commercial hatcheries", *Aquaculture*, **420-421**, pp.1-9, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.10.021.
- [10] K. Lee, W. Chen, H. Shen, et al. (2013), "Chapter 3: Basic culturing and analytical measurement techniques", *Handbook of Microalgae Culture Applied Phycology and Biotechnology*, Wiley, 736pp, DOI: 10.1002/9781118567166.ch3.
- [11] Dang Diem Hong (2019), "Nutritious microalgae and technology for cultivating them in the world and in Vietnam", *Cultivating nutritious microalgae as functional food for humans and animals in Vietnam*, Natural Science and Technology Publishing House, 750 pages (in Vietnamese).
- [12] D.D Kim, T.V. Tua, D.T. Thuy, et al. (2018), *Microalgae production and application technology*, Natural Science and Technology Publishing House, 380 pages (in Vietnamese).
- [13] M. Placzek, A. Patyna, S. Witzak (2017), "Technical evaluation of photobioreactors for microalgal cultivation", *E3S Web of Conferences*, **19**, DOI: 10.1051/e3sconf/20171902032.
- [14] Q. Huang, F. Jiang, L. Wang, et al. (2017), "Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms", *Engineering*, **3**(3), pp.318-329, DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.020.
- [15] F.G. Acien-Fernández, E. Molina, A. Reis, et al. (2013), "Photobioreactors for the production of microalgae", *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, (12), pp.131-151, DOI: 10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7.

- [16] B. Wang, C.Q. Lan, M. Horsman (2012), "Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses", *Biotechnology Advances*, **30**(4), pp.904-912, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.019.
- [17] I. Dogaris, M. Welch, A. Meiser, et al. (2016), "A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae", *Bioresour. Technol.*, **198**, pp.316-324, DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.030.
- [18] J. Pruvost, F.L. Borgne, A. Artu, et al. (2016), "Chapter five - industrial photobioreactors and scaleup concepts", *Advances in Chemical Engineering*, **48**, pp.257-310, DOI: 10.1016/bs.ache.2015.11.002.
- [19] M.H.A. Michels, A.J. Goot, M.H. Vermuë, et al. (2016), "Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump", *J. Appl. Phycol.*, **28**, pp.53-62, DOI: 10.1007/s10811-015-0559-8.
- [20] J. Li, M. Stamato, E. Velliou, et al. (2014), "Design and characterization of a scalable airlift flat panel photobioreactor for microalgae cultivation", *J. Appl. Phycol.*, **27**, pp.75-86, DOI: 10.1007/s10811-014-0335-1.
- [21] W. Ritcharoen, S. Puchong, N. Piyanate, et al. (2014), "Cultivation options for indoor and outdoor growth of *Chaetoceros gracilis* with airlift photobioreactors", *Maejo International Journal of Science and Technology*, **8**(01), pp.100-113.
- [22] R.A. Andersen (2005), "Appendix a - Recipes for freshwater and seawater media", *Algal Culturing Techniques*, Elsevier, 592pp.
- [23] J. Tompkins, M.M.D. Ville, J.G. Day, et al. (1995), *Culture Collection of Algae and Protozoa Catalogue of Strains*, Ambleside, 208pp.
- [24] F.G.A. Fernández, J.M.F. Sevilla, J.A.S. Pérez, et al. (2001), "Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: Assessment of design and performance", *Chemical Engineering Science*, **56**(8), pp.2721-2732, DOI: 10.1016/S0009-2509(00)00521-2.
- [25] K.H. Mahmood, S.J. Wilkinson, W.B. Zimmerman (2015), "Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes", *Chemical Engineering Science*, **137**, pp.243-253, DOI: 10.1016/j.ces.2015.06.032.
- [26] M. Zhang, L. Gu, P. Zheng, et al. (2019), "Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber", *J. Clin. Lab. Anal.*, **34**(1), DOI: 10.1002/jcla.23024, DOI: 10.1002/jcla.23024.
- [27] D.U.S. Ballardó, S. Rossi, V. Hernández, et al. (2015), "A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture", *Aquaculture*, **448**, pp.87-92, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.044.
- [28] B.D. Fernandes, A. Mota, A. Ferreira, et al. (2014), "Characterization of split cylinder airlift photobioreactors for efficient microalgae cultivation", *Chemical Engineering Science*, **117**, pp.445-454, DOI: 10.1016/j.ces.2014.06.043.
- [29] T.A. Kazbar, G. Cogne, B. Urbain, et al. (2019), "Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors", *Algal Research*, **39**, DOI: 10.1016/j.algal.2019.101432, DOI: 10.1016/j.algal.2019.101432.
- [30] N. Ding, C. Li, T. Wang, et al. (2021), "Evaluation of an enclosed air-lift photobioreactor (ALPBR) for biomass and lipid biosynthesis of microalgal cells grown under fluid-induced shear stress", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **35**(1), pp.139-149, DOI: 10.1080/13102818.2020.1856717.
- [31] X. Gao, B. Kong, R.D. Vigil, et al. (2018), "Multiphysics simulation of algal growth in an airlift photobioreactor: Effects of fluid mixing and shear stress", *Bioresour. Technol.*, **251**, pp.75-83, DOI: 10.1016/j.biortech.2017.12.014.
- [32] A. Massart, A. Mirisola, D. Lupant, et al. (2014), "Experimental characterization and numerical simulation of the hydrodynamics in an airlift photobioreactor for microalgae cultures", *Algal Research*, **6B**, pp.210-217, DOI: 10.1016/j.algal.2014.07.003.
- [33] A. Richmond (2013), "Biological principles of mass cultivation of photoautotrophic microalgae", *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, Wiley Blackwell, Oxford, pp.171-204, DOI: 10.1002/9781118567166.ch11.
- [34] A.P. Carvalho, L.A. Meireles, F.X. Malcata (2006), "Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances", *Biotechnol. Prog.*, **22**(6), pp.1490-1506, DOI: 10.1021/bp060065r.
- [35] J.C.G. Cañedo, G.L.L. Lizárraga (2016), *Considerations for Photobioreactor Design and Operation for Mass Cultivation of Microalgae, Algae - Organisms for Imminent Biotechnology*, IntechOpen, DOI: 10.5772/63069.
- [36] S. Raso, B. Genugten, M. Vermuë, et al. (2012), "Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity", *Journal of Applied Phycology*, **24**(4), pp.863-871, DOI: 10.1007/s10811-011-9706-z.
- [37] F.C. Rubio, F.G.A. Fernández, J.A.S. Pérez, et al. (1999), "Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture", *Biotechnol. Bioeng.*, **62**(1), pp.71-86, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990105)62:1<71::AID-BIT9>3.0.CO;2-T.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI BÁO ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

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

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

Bài báo gửi qua Hệ thống gửi bài trực tuyến tại địa chỉ https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/about/submissions hoặc có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khoahocvacaongnghevietnam@most.gov.vn.

Cấu trúc của các loại bài báo khác nhau có thể thay đổi tùy theo loại hình nghiên cứu và nội dung của bài báo. Sau đây là chi tiết các thành phần chính của bài báo.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, in đậm, không gạch chân hay viết nghiêng.
- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.
- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số ^(1,2,...) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.
- Khi liệt kê cơ quan công tác của tác giả, cần nêu rõ tên cơ quan và địa chỉ cơ quan (số nhà, tên đường, phường, quận, thành phố, quốc gia) bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh (khoảng 160-250 từ). Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khóa bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet (ít nhất 3 từ khóa). Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

1. Đặt vấn đề/Dẫn nhập/Mở đầu

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

2. Đối tượng/Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

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

3. Kết quả

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

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

4. Bàn luận (phần này có thể gộp với phần kết quả)

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài. Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài. Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. Kết luận

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

LỜI CẢM ƠN (nếu có)

Tác giả cảm ơn các tổ chức/cá nhân đã tài trợ kinh phí hoặc hỗ trợ cho nghiên cứu.

Phụ lục (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

Chú thích và tài liệu tham khảo

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

- Lưu ý:
- Đối với trích dẫn trong bài báo: tài liệu tham khảo có nhiều hơn một tác giả chỉ để tên tác giả đầu tiên và cộng sự, viết tắt là cs, ví dụ: T.V. Nguyen và cs (năm xuất bản) [thứ tự trong danh mục tài liệu tham khảo].
 - Đối với danh mục tài liệu tham khảo cuối bài: tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh, các tài liệu không phải tiếng Anh cần được dịch sang tiếng Anh và chú thích ở cuối câu, ví dụ: (in Vietnamese), (in French)...
 - Tài liệu tham khảo là các đường link cần bổ sung ngày truy cập.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập(số)**, trang/số trang/trang đầu-trang cuối (nếu có), số DOI (nếu có), URL (nếu có), ngày truy cập (ghi rõ ngôn ngữ nào nếu không phải tài liệu bằng tiếng Anh).

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn: liệt kê đầy đủ tên tác giả (chữ viết tắt đưa lên trước) với những tài liệu tham khảo có ≤3 tác giả; liệt kê 3 tác giả đầu tiên và theo sau là "et al." khi có từ 4 tác giả trở lên.

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

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách... (chỉ viết hoa chữ cái đầu, trừ tên riêng và sau dấu hai chấm), viết trong ngoặc kép.

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được *in nghiêng*), viết hoa chữ cái đầu tiên của mỗi từ chính.

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

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

Nếu có ≥2 tài liệu tham khảo do cùng tác giả đầu tiên và cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a, 1986b...).

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

Chi tiết vui lòng xem thêm tại: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/quy-dinh-bai-viet.

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Toà soạn không trả lại bản thảo.
- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.
- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

Quy định này áp dụng từ năm 2022 trở đi.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

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

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

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

3. Khoa học y - dược

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

4. Khoa học nông nghiệp

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

5. Khoa học xã hội và nhân văn

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

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 65 - Number 2 - February 2023

Bước đầu xây dựng quy trình tetra-primer ARMS PCR phát hiện điểm đa hình đơn nucleotide *exo-E415G* của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* ở khu vực Tây Nguyên, Việt Nam.

Lê Văn Khánh, Trần Thu Huyền, Hoàng Văn Tổng

Ảnh hưởng của bất hoạt bằng nhiệt đối với giá trị CT trong kỹ thuật xác định SARS-CoV-2 bằng phương pháp realtime RT-PCR.

Hoàng Xuân Quảng, Bùi Tiến Dũng, Đặng Tiến Trường

Xác định tần suất mang gen *erm*(B) và *mef*(A) ở các chủng *Streptococcus pneumoniae* kháng macrolide thu thập từ trẻ dưới 5 tuổi bị viêm phổi tại Nghệ An (2019-2021).

Bùi Anh Sơn, Dương Đình Chinh, Lê Thị Hồng Hạnh, Đỗ Ngọc Ánh

Hội chứng bong vảy da do tụ cầu: Báo cáo chùm ca lâm sàng tại Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng.

Nguyễn Thị Phương Anh

Tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron bằng phương pháp vi sóng.

Võ Thị Cẩm Vân, Đào Quốc Mạnh, Võ Hoàng Minh, Trần Hoàng Phúc, Huỳnh Nguyễn Hoài Phương

Nghiên cứu đặc điểm nông sinh học và hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt một số mẫu giống Thảo quyết minh (*Senna tora* L.) trồng tại Hà Nội.

Đặng Văn Hùng, Phan Thị Thu, Lương Thị Hoan, Trần Văn Thắng, Trịnh Văn Vượng, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Quỳnh Nga, Nguyễn Thị Hà Ly, Tô Minh Tử

Điều chế hydrogel chứa chitosan và dầu dừa bằng phương pháp đông lạnh - rã đông.

Lê Xuân Trường, Trần Văn Thành, Hoàng Kim Nghi

Mô tả đặc tính hình thái và sinh học của một số dòng lúa cỏ phổ biến vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

Nguyễn Thế Cường, Đồng Thanh Liêm, Viên Phúc Đạt, Nguyễn Văn Tuấn Anh, Hồ Lê Thị

Nghiên cứu phân lập và một số đặc điểm bệnh học của *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá rô phi (*Oreochromis* spp.) tại miền Bắc, Việt Nam.

Đoàn Thị Ninh, Trần Thị Trinh, Đặng Thị Hóa, Nguyễn Ngọc Tuấn, Nguyễn Thị Hương Giang, Kim Văn Vạn, Đặng Thị Lựa, Trương Đình Hoài

Ảnh hưởng của axit acetic lên hàm lượng kim loại nặng và thành phần dinh dưỡng của thịt sò huyết (*Anadara granosa*).

Nguyễn Phúc Cẩm Tú

Chọn lọc các tổ hợp lai ngô nếp tím ưu tú bằng phương pháp chọn lọc đa biến MGIDI tại Việt Nam.

Phạm Quang Tuấn, Nguyễn Trung Đức, Nguyễn Thị Nguyệt Anh, Vũ Văn Liết

Tạo chồi *in vitro* sạch virus cây chanh dây bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh.

Trần Hiếu, Trương Hoài Phong, Nguyễn Thị Như Mai, Hoàng Đắc Khải, Hoàng Thanh Tùng, Đỗ Mạnh Cường, Vũ Quốc Luận, Lê Ngọc Triệu, Nguyễn Bá Nam, Hoàng Thị Như Phương, Bùi Văn Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt

Nghiên cứu thử nghiệm nuôi tảo *Chaetoceros calcitrans* trong hệ thống quang sinh vận hành bằng khí.

Nguyễn Đức Bách, Phạm Tài Minh, Vũ Lê Diệu Hương, Phí Thị Cẩm Miên

1 Establishment of tetra-primer ARMS-PCR technique for detecting *exo-E415G* SNP in *Plasmodium falciparum* isolates from Central Highlands of Vietnam.

Van Khanh Le, Thu Huyen Tran, Van Tong Hoang

6 Effect of heat inactivation on CT value of realtime RT-PCR technique for SARS-CoV 2 detection.

Xuan Quang Hoang, Tien Dung Bui, Tien Truong Dang

9 Prevalence of *mef*(A) and *erm*(B) in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in children with pneumonia in Nghe An (2019-2021).

Anh Son Bui, Dinh Chinh Duong, Thi Hong Hanh Le, Ngoc Anh Do

14 Staphylococcal-scalded skin syndrome: A case series at Hai Phong Children Hospital.

Thi Phuong Anh Nguyen

18 Microwave-assisted synthesis of 4,6-dihydroxyaurone derivatives.

Thi Cam Van Vo, Quoc Manh Dao, Hoang Minh Vo, Hoang Phuc Tran, Nguyen Hoai Phuong Huynh

23 Assessment of agro-biological characteristics and aurantio-obtusin contents in seeds of some samples of *Senna tora* L. grown in Hanoi.

Van Hung Dang, Thi Thu Phan, Thi Hoan Luong, Van Thang Tran, Van Vuong Trinh, Thi Huong Nguyen, Quynh Nga Nguyen, Thi Ha Ly Nguyen, Minh Tu To

28 Preparation of hydrogel containing chitosan and virgin coconut oil using the freeze-thawing method.

Xuan Truong Le, Van Thanh Tran, Kim Nghi Hoang

33 Morphology and biological characteristics of some popular weedy rices in the Mekong delta of Vietnam.

The Cuong Nguyen, Thanh Liem Dong, Phuc Dat Vien, Van Tuan Anh Nguyen, Le Thi Ho

41 Study on isolation and some pathological characteristics of *Flavobacterium columnare* causing infection in tilapia (*Oreochromis* spp.) cultured in Northern Vietnam.

Thi Ninh Doan, Thi Trinh Tran, Thi Hoa Dang, Ngoc Tuan Nguyen, Thi Huong Giang Nguyen, Van Van Kim, Thi Lua Dang, Dinh Hoai Truong

48 Effects of acetic acid on toxic metal content and proximate composition in the muscle of blood cockle (*Anadara granosa*).

Phuc Cam Tu Nguyen

53 Selection of elite purple waxy corn hybrids by MGIDI multivariate selection method in Vietnam.

Quang Tuan Pham, Trung Duc Nguyen, Thi Nguyet Anh Nguyen, Van Liet Vu

61 Production of passion fruit virus-free *in vitro* shoots by apical meristem culture.

Hieu Tran, Hoai Phong Truong, Thi Nhu Mai Nguyen, Dac Khai Hoang, Thanh Tung Hoang, Manh Cuong Do, Quoc Luan Vu, Ngoc Trieu Le, Ba Nam Nguyen, Thi Nhu Phuong Hoang, Van The Vinh Bui, Tan Nhut Duong

66 A cultivation trial of *Chaetoceros calcitrans* in an air-lift photobioreactor.

Duc Bach Nguyen, Tai Minh Pham, Le Dieu Huong Vu, Thi Cam Mien Phi