

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

TẬP 65, SỐ 9, THÁNG 9 NĂM 2023
VOLUME 65, NUMBER 9, SEPTEMBER 2023

TẠP CHÍ & KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST VIỆT NAM



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

Phát hiện đột biến gen *G6PD* ở bệnh nhân thuộc dân tộc Nùng thiếu hụt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase

Trần Thị Mai Anh¹, Ngô Thị Thảo¹, Đinh Thùy Linh², Trần Văn Khánh^{1*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, 929 đường La Thành, phường Ngọc Khánh, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/6/2022; ngày chuyển phản biện 4/7/2022; ngày nhận phản biện 25/7/2022; ngày chấp nhận đăng 28/7/2022

Tóm tắt:

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) là enzyme then chốt mở đầu cho chu trình pentose phosphate trong chuyển hóa glucose, về mặt sinh lý con đường này là nguồn gốc chủ yếu cung cấp nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) cho hồng cầu. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định đột biến trên gen *G6PD* ở bệnh nhân người dân tộc Nùng được chẩn đoán thiếu hụt enzyme G6PD. 18 bệnh nhi dân tộc Nùng được chẩn đoán thiếu enzyme G6PD tại Bệnh viện Nhi Trung ương, được ứng dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen để phát hiện đột biến trên gen *G6PD*. Kết quả có 8 dạng đột biến được xác định trên gen *G6PD*, trong đó đột biến chiếm ưu thế là *G6PD* Kaiping (c.1388G>A) với tỷ lệ 44,4%. Tiếp theo là các đột biến Canton (c.1376G>T), Viangchan (c.871G>A), Union (c.1360C>T), Gaohe (c.95A>G), Orissa (c.131C>G) và Chinese-5 (c.1024C>T). Cuối cùng là 3 trường hợp (Silent) có thêm biến đổi ở vị trí 1311C>T.

Từ khóa: Canton, dân tộc Nùng, đột biến gen *G6PD*, Kaiping, thiếu G6PD.

Chỉ số phân loại: 3.1

Identification of mutation in *G6PD* gene in Nung ethnic patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency

Thi Mai Anh Tran¹, Thi Thao Ngo¹, Thuy Linh Dinh², Van Khanh Tran^{1*}

¹Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²National Hospital of Obstetrics and Gynecology, 929 La Thanh Street, Ngoc Khanh Ward, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

Received 29 June 2022; revised 25 July 2022; accepted 28 July 2022

Abstract:

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is the key enzyme that initiates the pentose phosphate cycle in glucose metabolism. Physiologically, this pathway is the main source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) for red blood cells. This study aims to identify glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Nung ethnic patients with G6PD deficiency. 18 pediatric patients of the Nung ethnic group were diagnosed with G6PD enzyme deficiency at the Vietnam National Children's Hospital and applied PCR and gene sequencing to detect mutations in the *G6PD* gene. 8 types of mutation were detected in the *G6PD* gene in which the most common mutation was Kaiping (c.1388G>A) with 44.4%, followed by Canton (c.1376G>T), Viangchan (c.871G>A), Union (c.1360C>T), Gaohe (c.95A>G), Orissa (c.131C>G), and Chinese-5 (c.1024C>T). Silent mutations at the 1311C>T location were found in 3 cases.

Keywords: Canton, G6PD deficiency, Kaiping, mutation in *G6PD* gene, Nung ethnic.

Classification number: 3.1

1. Đặt vấn đề

G6PD là enzyme then chốt mở đầu cho chu trình pentose phosphate trong chuyển hóa glucose, về mặt sinh lý con đường này là nguồn gốc chủ yếu cung cấp NADPH cho hồng cầu. NADPH là coenzyme khử, có liên quan mật thiết với chuỗi phản ứng tiếp theo giúp bảo vệ các nhóm sulphhydryl của haemoglobin, ngăn cản quá trình peroxide của các cấu tử hồng cầu. Hồng cầu của người bị thiếu G6PD

sẽ bị tán huyết nhanh chóng dưới tác dụng của các tác nhân oxy hoá, với biểu hiện lâm sàng như vàng da, tan máu, trong đó thiếu máu, tan máu nặng là một trong những triệu chứng nguy hiểm nhất [1].

Enzyme G6PD là sản phẩm mã hóa của gen *G6PD* nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể giới tính X tại vị trí Xq28. Gen dài khoảng 18,5 kb gồm 25861 nucleotide, khung đọc mở dài 1545 nucleotide với 13 exon và 12 intron. Exon 1

*Tác giả liên hệ: Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

và đầu 5' của exon 2 không mã hóa. Bộ 3 mã hóa đầu tiên nằm trên exon 2 [2]. Đột biến trên gen *G6PD* dẫn đến giảm hoặc ngừng quá trình tổng hợp enzyme, gây ra bệnh thiếu enzyme G6PD. Đến nay, hơn 200 đột biến G6PD phân bố dọc trên 13 exon của gen đã được xác định. Trong đó, sự thay thế nucleotide đơn lẻ được mô tả thường xuyên nhất, đột biến mất đoạn và đột biến intron được báo cáo với tỷ lệ thấp [3]. Trên thế giới, tỷ lệ mắc bệnh cao nhất là các khu vực Địa Trung Hải, châu Phi và Nam Á. Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc bệnh dao động khoảng 0,3-9% [4]. Sự phân bố các dạng đột biến mang tính đặc trưng theo vùng địa lý và dân tộc [1, 2]. Việc nghiên cứu khảo sát đột biến gây ra sự thiếu hụt G6PD đóng góp vào sự hiểu biết về phổ đột biến trên gen *G6PD*, mở ra những cơ hội mới để chẩn đoán và điều trị bệnh trong tương lai. Mục tiêu tiến hành nghiên cứu của chúng tôi là xác định đột biến trên gen *G6PD* ở bệnh nhân người dân tộc Nùng đã được chẩn đoán thiếu hụt enzyme G6PD.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

18 bệnh nhân người dân tộc Nùng được chẩn đoán thiếu enzyme G6PD tại Bệnh viện Nhi Trung ương trong thời gian từ tháng 6/2019 đến tháng 9/2019.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Bệnh nhân được chẩn đoán thiếu G6PD có kết quả định lượng hoạt độ enzyme G6PD dưới 200 U/10¹² hồng cầu. Bệnh nhân thuộc dân tộc Nùng.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân thuộc các nhóm dân tộc ngoài Nùng, hoặc không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA: 2 ml máu ngoại vi của bệnh nhân được thu thập vào ống chống đông EDTA. DNA tổng số được tách chiết từ máu toàn phần theo kit The Wizard® Genomic DNA Purification Kit của Hãng Promega (Mỹ). Tất cả các mẫu sau tách chiết được tiến hành đo nồng độ và độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ Nanodrop đảm bảo đủ yêu cầu sử dụng để phân tích gen.

Kỹ thuật PCR: Thành phần của phản ứng PCR (thể tích 10 µl) gồm: 1 µl DNA mẫu, 0,5 µl mỗi xuôi 10 pM/µl và 0,5 µl mỗi ngược 10 pM/µl, GoTaq G2 Hot Start master mix (2X) 5 µl, H₂O 3 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/2 phút, 35 chu kỳ nhiệt [94°C/30 giây, 60°C/25 giây, 72°C/40 giây], 72°C/5 phút. Bảo quản mẫu ở 4°C. Trình tự mỗi khuếch đại gen *G6PD* mỗi F1-F5 tham khảo theo trình tự mỗi trong nghiên cứu của N.T. Hue và cs (2009) [4].

Mỗi F6-F8 được thiết kế sử dụng bằng phần mềm Primer - BLAST dựa trên trình tự gen *G6PD* trên ngân hàng gen mã NG_009015 (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự mỗi khuếch đại các exon trên gen *G6PD*.

Tên mỗi	Trình tự mỗi (5'→3')	Exon	T _m (°C)	Kích thước (bp)
F1F	5'-CTCAAGAAAGGGGCTAACTTCTCAA-3'	2	63,5	241
F1R	5'-GCACTTCCTGGCTTTTAAGATTGGG-3'		63,1	
F2F	5'-AGGTCGTGTCCCGAGCCACT-3'	3, 4	62,0	641
F2R	5'-GCACAGACACTGCCCCAGGC-3'		63,1	
F3F	5'-GGGCACCTCCCTGGACCTC-3'	5	61,5	491
F3R	5'-TCGTGGAGCAACGCTGCCAC-3'		60,7	
F4F	5'-ACTCCCCGAAGAGGGGTCAAGG-3'	6, 7	62,5	561
F4R	5'-GCTCTGCCACCTGTGCCAG-3'		62,8	
F5F	5'-ACACAGCCAAGCACCCACG-3'	8	62,1	607
F5R	5'-CAGGGCCCCCTCCCTGAGGAC-3'		63,1	
F6F	5'-GACTCGAGATGGACCAGGGTG-3'	9, 10	61,9	977
F6R	5'-CTCGAAGGCATCACCTACCATCC-3'		62,7	
F7F	5'-GGCCGTGTACACCAAGATGAT-3'	11, 12	60,4	566
F7R	5'-AGAGTGACGGGTGGAGGAGAG-3'		62,7	
F8F	5'-TATGGCAGGTGAGGAAAGGGT-3'	13	60,8	297
F8R	5'-AATGTGCAGCTGAGGTCAATG-3'		59,2	

2.3. Kỹ thuật giải trình tự gen

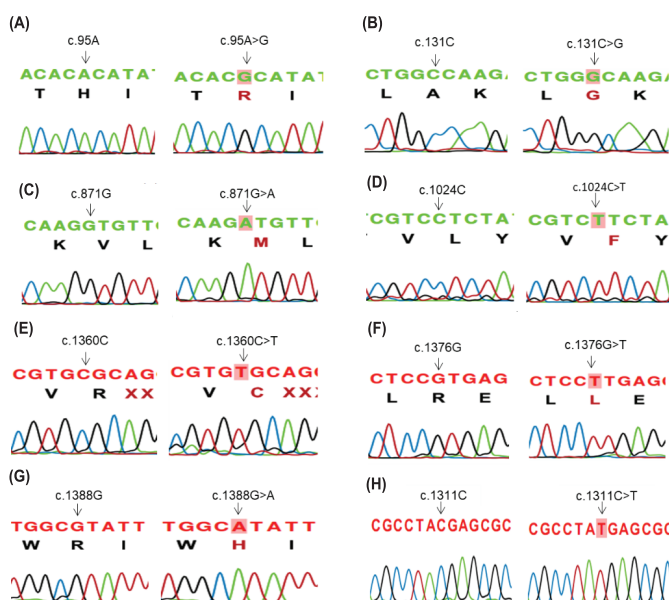
Thành phần phản ứng PCR giải trình tự gen gồm: Buffer Big dye 5X, Big dye Terminator v3.1, mỗi xuôi hoặc mỗi ngược, sản phẩm PCR các exon gen *G6PD*. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng cho bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, Mỹ). Sản phẩm PCR giải trình tự gen sau khuếch đại được tinh sạch và điện di trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer. Kết quả giải trình tự các exon gen *G6PD* được so sánh với trình tự tham chiếu NG_009015 trên ngân hàng gen bằng phần mềm CLC Main Workbench để phát hiện các trình tự bị thay đổi.

3. Kết quả

Kết quả bảng 2 cho thấy, 100% bệnh nhân có đột biến trên gen *G6PD*, với 8 loại đột biến điểm được xác định. Trong đó, đột biến Kaiping chiếm ưu thế nhất. Các đột biến gặp với tỷ lệ thấp hơn lần lượt là Canton, Viangchan, Union. Mỗi đột biến Gaohe, Orissa và Chinese-5 xuất hiện ở 1 trường hợp. Ghi nhận 3 trường hợp có thêm biến đổi ở vị trí 1311C>T. Hình ảnh kết quả giải trình tự các đột biến trên gen *G6PD* ở người bình thường - bệnh nhân mang đột biến được thể hiện ở hình 1.

Bảng 2. Kết quả xác định đột biến gen của đối tượng nghiên cứu.

TT	Tên đột biến	Vị trí đột biến	Biến đổi acid amin	Exon	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Hoạt độ enzyme (U/10 ¹² hồng cầu)
Thuộc phân lớp II: 83,3%							
1	Kaiping	c.1388G>A	R463H	12	8	44,4	8,9-97,4
2	Canton	c.1376G>T	R459L	12	3	16,6	22,8-36,3
3	Viangchan	c.871G>A	V291M	9	2	11,1	45,6-78,8
4	Union	c.1360C>T	R454C	11	2	11,1	0-7,01
Thuộc phân lớp III: 16,7%							
1	Gaohe	c.95A>G	H32A	2	1	5,6	64,3
2	Orissa	c.131C>G	A44G	3	1	5,6	28,3
3	Chinese-5	c.1024C>T	L342F	9	1	5,6	19,26
Tổng					18	100	
	Silent	c.1311C>T	T437T	11	3	16,6	28,3-78,8



Hình 1. Hình ảnh kết quả giải trình tự các đột biến trên gen *G6PD*. (A) Gaohe (c.95A>G); (B) Orissa (c.131C>G); (C) Viangchan (c.871 G>A); (D) Chinese-5 (c.1024C>T); (E) Union (c.1360C>T); (F) Canton (c.1376G>T); (G) Kaiping (c.1388G>A); (H) Silent (c.1311C>T). Kết quả giải trình tự: người bình thường - bệnh nhân mang đột biến.

4. Bàn luận

Thiếu G6PD là bệnh lý di truyền về enzyme phổ biến nhất ở người, ảnh hưởng tới gần 5% dân số thế giới và gây ra các bệnh lý liên quan tới hồng cầu. Các đột biến xảy ra trên gen *G6PD* là nguyên nhân dẫn đến việc giảm hoặc ngừng quá trình tổng hợp enzyme, gây ra bệnh thiếu enzyme G6PD. Do đó, việc nghiên cứu khảo sát đột biến gen *G6PD* mở ra những cơ hội mới để chẩn đoán và điều trị bệnh trong tương lai. Nghiên cứu tiến hành trên 18 bệnh nhi dân tộc Nùng, sinh sống chủ yếu tại các tỉnh miền núi phía Bắc. Nhờ phương pháp định lượng hoạt độ enzyme,

các bệnh nhi được chẩn đoán thiếu hụt enzyme G6PD tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Kết quả phân tích gen cho thấy, tất cả các đối tượng nghiên cứu đều mang đột biến trên gen *G6PD*. Với 8 dạng đột biến điểm được xác định, trong đó 7 dạng đột biến dẫn đến thay thế acid amin này bằng một acid amin khác làm thay đổi cấu trúc protein và một biến đổi im lặng (Silent). Đây đều là các đột biến đã được ghi nhận tại Việt Nam trong các nghiên cứu trước đây, không ghi nhận đột biến mới [4, 5]. Đột biến gặp nhiều nhất trong nghiên cứu là Kaiping (c.1388G>A) với tỷ lệ là 44,4%. Tiếp theo là đột biến Canton (c.1376G>T) với tỷ lệ 16,6%. Theo các nghiên cứu trước khảo sát tại Việt Nam, biến đổi c.1388G>A được ghi nhận trong nhóm người Kinh nhưng với tần suất thấp hơn, dao động 6,6-16%. Tuy nhiên, biến đổi c.1376G>T lại gặp với tỷ lệ cao hơn (26,67%) [4, 5]. Đây cũng là những đột biến phổ biến nhất trong quần thể người thiếu G6PD tại Trung Quốc. Cụ thể Y. Chen và cs (2018) [6] nghiên cứu trên 904 trẻ thiếu hụt G6PD tại Phúc Kiến, Trung Quốc xác định được 17 loại đột biến, trong đó 3 đột biến c.1376G>T, c.1388G>A và c.95A>G chiếm 72,6%. Tỷ lệ này trong nghiên cứu của chúng tôi là 66,6%. Ngoài ra, nghiên cứu của chúng tôi cũng ghi nhận 2 đột biến Viangchan (c.871G>A) và Union (c.1360C>T) với tỷ lệ bằng nhau (11,1%). Viangchan được xem là đột biến chủ yếu gây bệnh trên quần thể người Kinh tại TP Hồ Chí Minh (43,3%) và cũng là nguyên nhân gây ra phần lớn trường hợp thiếu G6PD tại các nước Đông Nam Á như Lào (100%) và Campuchia (97,9%) [4, 7, 8]. Trong khi đó, đột biến Union được ghi nhận ở 12% quần thể người Kinh và gặp với tỷ lệ 9,5% người Thái Lan [4, 5]. Nghiên cứu cũng xác định được 3 đột biến Gaohe (c.95A>G), Orissa (c.131C>G) và Chinese-5 (c.1024C>T), với mỗi đột biến ghi nhận 1 trường hợp. Đây đều là các đột biến có nguồn gốc từ Trung Quốc [6]. Người Nùng được xem là có quan hệ gần gũi với người Tày và người Tráng sống dọc biên giới với Trung Quốc, đây có thể là nguyên nhân dẫn tới sự tương đồng về đặc điểm dịch tễ đột biến.

Các đột biến được xác định trong nghiên cứu nằm trên exon 2, 3, 9, 11 và 12 với 88,8% các đột biến xảy ra trên exon 9, 11 và 12. Tỷ lệ đột biến phát hiện trên 3 exon này trên đối tượng người Việt Nam theo khảo sát của N.T. Hue và cs (2009) [4], N.M. Hung và cs (2009) [9] lần lượt là 93,4 và 92,3%. Đây được xem là một trong những vùng exon trọng điểm trên gen *G6PD* chứa nhiều đột biến hay gặp ở người Việt Nam, vì vậy đã được nhóm nghiên cứu ưu tiên khảo sát trước tiên trong quá trình xác định đột biến.

Hoạt độ enzyme của các bệnh nhân trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 2 cho thấy, các bệnh nhân thiếu hụt enzyme ở mức độ từ trung bình tới nặng, với hoạt độ enzyme dao động trong khoảng khá rộng (0-97,4 U/10¹² hồng cầu). Trong đó, Kaiping, đột biến gặp nhiều nhất trong nghiên cứu, cho thấy sự chênh lệch về hoạt độ enzyme giữa các đối tượng nghiên cứu là lớn nhất, điều này thể hiện tồn tại sự biểu hiện khác nhau giữa kiểu gen và kiểu hình. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã chia các biến thể của bệnh lý thiếu hụt G6PD thành 5 lớp, dựa vào hoạt độ của enzyme trong hồng cầu và biểu hiện lâm sàng của chúng [1, 2]. 83,3% trường hợp trong nghiên cứu mang đột biến thuộc phân lớp II, 16,7% thuộc phân lớp III. Phân lớp II được mô tả thiếu hụt enzyme G6PD ở mức độ nghiêm trọng với hoạt độ enzyme <10% so với bình thường. Cụ thể, 2 đột biến phổ biến nhất trong nghiên cứu là Kaiping và Canton có vị trí tương đối gần nhau trên exon 12, đều được xếp vào phân lớp này. 2 đột biến xảy ra làm thay đổi bộ 3 mã hóa cho acid amin Arginine ở vị trí 456 và 463 thành bộ 3 mã hóa cho Leucine và Histidine. Các acid amin này có vị trí gần với những vùng (Lys 386 - Arg 387) là những domain trực tiếp gắn NADPH, do đó có thể làm thay đổi hoạt tính và khả năng bảo vệ hồng cầu của G6PD [6]. Bệnh nhân có hoạt độ enzyme thấp nhất trong nghiên cứu của chúng tôi mang đột biến Union. Vị trí nucleotide c.1360 ở người bình thường trên gen G6PD là C, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân có trình tự là T. Sự thay đổi này làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 454 từ Arginin thành Cystein. Đột biến về cấu trúc của biến đổi này gây ra sự thay đổi tính đặc hiệu của cơ chất enzyme, với hoạt độ G6PD chỉ khoảng 10% so với bình thường [2].

Mặt khác, có 3 đối tượng trong nghiên cứu ngoài đột biến gây bệnh đã xác định được còn ghi nhận có thêm sự biến đổi ở vị trí nucleotide c.1311C>T ở exon 11. Cụ thể là 2 trường hợp mang đột biến Viangchan và 1 trường hợp mang đột biến Orissa. Tuy nhiên, do bộ ba TAC → TAT cùng mã hoá cho acid amin Tyrosine nên biến đổi tại vị trí 1311 này được coi là không ảnh hưởng đến sự mã hóa acid amin trong cấu trúc G6PD. Nghiên cứu của Y. Chen và cs (2018) [6] trên 904 trường hợp thiếu G6PD và 904 người đối chứng cho thấy tần suất xuất hiện của đa hình c.1311C>T trên gen G6PD ở nhóm bệnh nhân thiếu enzyme cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng. Sự tồn tại của c.1311C>T cùng các đột biến khác trên gen *G6PD* đã được quan sát trong các quần thể trên toàn thế giới và cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước tại Việt Nam. Tuy nhiên, mức độ ảnh hưởng của sự kết hợp này đối với cơ chế sinh bệnh thì cần được nghiên cứu ở mức sâu hơn.

5. Kết luận

Qua phân tích gen *G6PD* ở 18 bệnh nhân thuộc dân tộc Nùng bằng phương pháp giải trình tự gen xác định được 8 dạng đột biến trên gen *G6PD*. Đột biến chiếm ưu thế nhất là G6PD Kaiping (c.1388G>A). Tiếp theo là các đột biến Canton (c.1376G>T), Viangchan (c.871G>A), Union (c.1360C>T), Gaohe (c.95A>G), Orissa (c.131C>G) và Chinese-5 (c.1024C>T). Ghi nhận 3 trường hợp có thêm biến đổi ở vị trí 1311C>T.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Takizawa, I. Huang, T. Ikuta, et al. (1986), "Human glucose6-phosphate dehydrogenase: Primary structure and cDNA cloning", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**(12), pp.4157-4161, DOI: 10.1073/pnas.83.12.4157.
- [2] L. Luzzatto, C. Nannelli, R. Notaro (2016), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency", *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, **30**(2), pp.373-393, DOI: 10.1016/j.hoc.2015.11.006.
- [3] S.G. Manzo, J.M. Quino, A.V. Carlo, et al. (2016), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Update and analysis of new mutations around the world", *Int. J. Mol. Sci.*, **17**(12), DOI: 10.3390/ijms17122069.
- [4] N.T. Hue, J.P. Charlier, T.T.H. Chau, et al. (2009), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations and haemoglobinuria syndrome in the Vietnamese population", *Malaria Journal*, **8**(1), DOI: 10.1186/1475-2875-8-152.
- [5] T.T.M. Anh, N.T. Phuong, T.V. Khanh (2020), "Identifying mutations in some key regions of the *G6PD* gene in patients with G6PD enzyme deficiency", *Vietnam Medical Journal*, **493**(2), pp.128-131 (in Vietnamese).
- [6] Y. Chen, W. Xiu, Y. Dong, et al. (2018), "Mutation of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Chinese Han children in eastern Fujian", *Medicine (Baltimore)*, **97**(30), DOI: 10.1097/MD.00000000000011553.
- [7] C. Louicharoen, I. Nuchprayoon (2005), "G6PD Viangchan (871G>A) is the most common G6PD-deficient variant in the Cambodian population", *J. Hum. Genet.*, **50**(9), pp.448-452, DOI: 10.1007/s10038-005-0276-2.
- [8] I. Nuchprayoon, S. Sanpavat, S. Nuchprayoon (2002), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population", *Hum. Mutat.*, **19**(2), DOI: 10.1002/humu.9010.
- [9] N.M. Hung, T.T. Tinh, H. Matsuoka (2009), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutation in 3 ethnic groups Muong, Tay, Thai in Vietnam", *Journal of Medical Research Studies*, **62**(3), pp.10-14, DOI: 10.51298/vmj.v513i2.2468 (in Vietnamese).

Đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người khỏe mạnh, phân động vật nuôi, thức ăn và nước tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam

Nguyễn Thị Tuyết Mai^{1*}, Vũ Thị Ngọc Bích², Vũ Thị Tường Vân¹, Trần Huy Hoàng^{3,4}

¹Bệnh viện Bạch Mai, 78 Giải Phóng, phường Phương Mai, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford, 78 Giải Phóng, phường Phương Mai, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, 131 Lò Đúc, phường Phạm Đình Hổ, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

⁴Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/3/2022; ngày chuyển phản biện 18/3/2022; ngày nhận phản biện 11/4/2022; ngày chấp nhận đăng 14/4/2022

Tóm tắt:

Colistin là kháng sinh ưu tiên quan trọng được sử dụng cho các trường hợp nhiễm khuẩn gram âm đường ruột kháng carbapenem. Các chủng *E. coli* mang gen kháng colistin (*mcr-1*) được ghi nhận trên toàn thế giới ở cả người, động vật và môi trường với các cơ chế kháng rất đa dạng từ kháng nội tại, đột biến và vận chuyển gen [1]. Xác định các đặc điểm dịch tễ học về tình trạng lây lan giữa các chủng có chứa *mcr-1* là vấn đề rất cần thiết. Giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng *E. coli* phân lập từ bệnh phẩm phân người khỏe mạnh và môi trường từ cộng đồng cho thấy, gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập từ cộng đồng trong nghiên cứu nằm trên cả nhiễm sắc thể (NST) và plasmid, tỷ lệ gen *mcr-1* nằm trên plasmid cao hơn nhiều so với nằm trên NST (71,3% so với 26,4%, $p < 0,001$). 100% chủng *E. coli* đều mang gen *mcr-1* có subtype *mcr-1.1*. Các plasmid có kích thước rất đa dạng (từ <50 kb đến >300 kb). Có 7 loại replicon đơn mang gen *mcr-1* được phát hiện từ 29 chủng, bao gồm IncI2 (n=7, 10,9%), IncP (n=7, 10,9%), IncX4 (n=5, 7,8%), IncFIA (n=3, 4,7%), IncHI1B (n=3, 4,7%), IncN (n=1, 1,6%) và IncX1 (n=1, 1,6%), được tìm thấy ở người, động vật và nước. Có 21 loại multi-replicon khác nhau với sự kết hợp của các loại plasmid IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 và IncI2 được tìm thấy trong 31 chủng *E. coli* ở người, động vật và nước. Có 56 sequence types (STs) khác nhau, trong đó ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%) là các STs thường gặp.

Từ khóa: *E. coli*, *mcr-1*, plasmid, STs.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Colistin là kháng sinh thuộc nhóm polymycin E, có nhiều độc tính trên thận, ít được sử dụng trên người và được sử dụng nhiều trong chăn nuôi từ những năm 70 của thế kỷ trước để điều trị và dự phòng các bệnh nhiễm khuẩn do vi khuẩn gram âm ở động vật. Sự xuất hiện và ngày càng gia tăng các chủng vi khuẩn gram âm, đường ruột đa kháng, bao gồm kháng carbapenem dẫn đến việc đưa vào sử dụng colistin trở lại như là một “kháng sinh lựa chọn cuối cùng” để điều trị khi chúng ta đang cạn kiệt những giải pháp thay thế khả thi do chưa có các dòng kháng sinh mới [2, 3]. Chính vì vậy, việc dự phòng và giảm thiểu khả năng kháng colistin trên người hiện nay là một vấn đề cần thiết nhằm bảo toàn tác dụng của colistin.

Colistin đã được sử dụng một thời gian dài ở động vật, do vậy cũng đã tồn tại nhiều chủng kháng colistin xuất phát từ động vật. Y.Y. Liu và cs (2016) [4] đã xác định được gen

mcr-1 nằm trên plasmid kháng colistin phân lập từ thịt lợn và người tại Trung Quốc. Cho đến nay, các chủng vi khuẩn gram âm kháng colistin được ghi nhận trên toàn thế giới ở cả người, động vật và môi trường với các cơ chế kháng rất đa dạng từ kháng nội tại, đột biến và vận chuyển gen [1]. Việc hiểu đầy đủ dịch tễ học về tình trạng lây lan giữa các chủng có chứa gen *mcr-1* và tìm kiếm sự hiện diện các bằng chứng về kháng kháng sinh của các chủng này trong hệ vi sinh vật đường ruột của cả động vật và con người, môi trường sinh hoạt xung quanh, mối liên quan giữa chúng là rất cần thiết để có bằng chứng khoa học giúp đưa ra các giải pháp tối ưu nhằm giảm thiểu tình trạng kháng thuốc hiện nay. Nghiên cứu của chúng tôi nhằm mục tiêu: 1) Xác định đặc điểm của gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập được từ phân người, phân động vật và môi trường; 2) Xác định một số đặc điểm dịch tễ phân tử của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được trong nghiên cứu.

*Tác giả liên hệ: Email: nttm3@bachmai.edu.vn

Molecular epidemiological characteristics of *E. coli* strains carrying the *mcr-1* gene isolated from healthy human feces, domestic animal feces, food and water in Thanh Ha commune, Thanh Liem district, Ha Nam province

Thi Tuyet Mai Nguyen^{1*}, Thi Ngoc Bich Vu²,
Thi Tuong Van Vu¹, Huy Hoang Tran^{3,4}

¹Bach Mai Hospital, 78 Giai Phong Street, Phuong Mai Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Oxford University Clinical Research Unit - Vietnam, 78 Giai Phong Street, Phuong Mai Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

³National Institute of Hygiene and Epidemiology, 131 Lo Duc, Pham Dinh Ho Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

⁴Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 15 March 2022; revised 11 April 2022; accepted 14 April 2022

Abstract:

Colistin is a critically important antimicrobial for the treatment of carbapenem-resistant gram-negative intestinal infections. *E. coli* strains carrying the colistin-resistant mediated colistin resistance (*mcr-1*) gene have been globally distributed, found in humans, animals and the environment with diverse resistance mechanisms, namely intrinsic, mutation, and horizontal gene transfer [1]. Evaluation of the epidemiological characteristics and transmission status of *E. coli* strains to carry the *mcr-1* gene is urgent. Sequencing results of 87 community *E. coli* strains isolated from healthy human feces and environment showed that the *mcr-1* gene of these strains in the study was found on both chromosomes and plasmids, the ratio of *mcr-1* plasmid-mediated is much higher than on the chromosome (71.3% vs 26.4%, $p < 0.001$). 100% of *E. coli* strains that carry the *mcr-1* gene were subtype *mcr-1.1*. The plasmids diversified in size (from <50 kb to >300 kb). There were 7 types of single replicon carrying *mcr-1* gene detected from 29 strains, including IncI2 (n=7, 10.9%), IncP (n=7, 10.9%), IncX4 (n=5, 7.8%), IncFIA (n=3, 4.7%), IncHI1B (n=3, 4.7%), IncN (n=1, 1.6%) and IncX1 (n=1, 1.6%), were found in healthy humans feces, animals and household water. There were also 21 different multi-replicons with combinations of IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 and IncI2 plasmids, found in 31 strains of *E. coli* in humans, animals and water. Strains were classified into 56 different sequence types (STs). ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) and ST206 (n=8, 8%) were common STs.

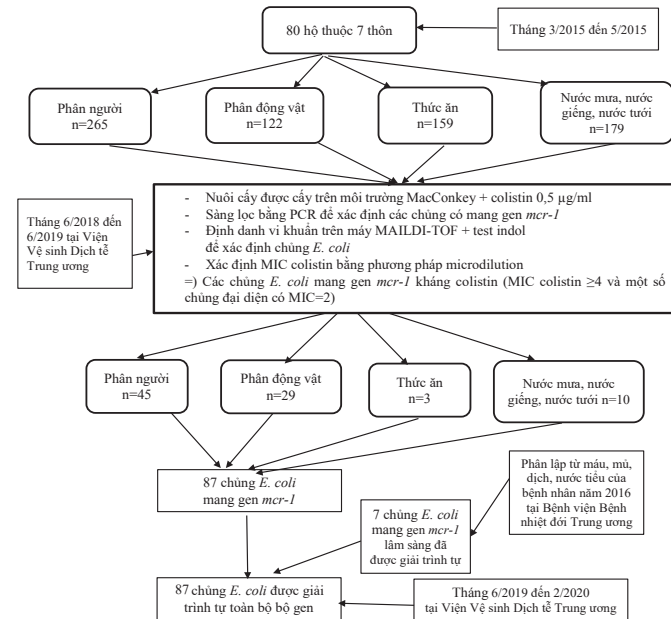
Keywords: *E. coli*, *mcr-1*, plasmid, STs.

Classification number: 3.1

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, thời gian và địa điểm

Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu được tóm tắt theo sơ đồ dưới đây:



2.2. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang, thu thập mẫu nghiên cứu có chủ đích dựa trên công thức tính cỡ mẫu:

$$n = Z^2_{(1-\alpha/2)} \times \frac{p \times (1 - p)}{d^2}$$

trong đó n là số chủng cần nghiên cứu; p là tỷ lệ dự đoán; $Z_{(1-\alpha/2)}$ là hệ số tin cậy, với độ tin cậy là 95% ($Z_{1-\alpha/2} = 1,96$); d là độ chính xác tuyệt đối.

2.3. Trang thiết bị và vật tư tiêu hao

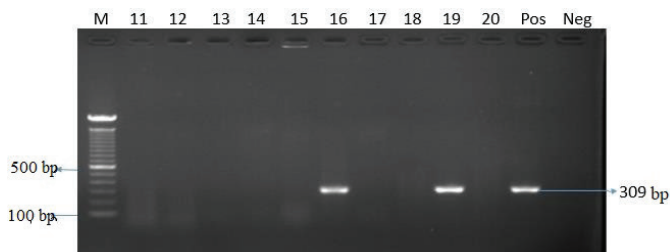
Sinh phẩm: MacConkey (Oxoid, Vương quốc Anh), thạch thường (Sigma), bột colistin (Sigma) sử dụng trong nuôi cấy và định danh vi khuẩn. 2X Go-taq Master-Mix (GoTaq® DNA Polymerase, Promega) sử dụng trong phản ứng PCR tìm *mcr-1*. Nextera XT kit (Illumina, San Diego, California, Mỹ) sử dụng trong tinh sạch DNA chuẩn bị thư viện cho giải trình tự. Miseq reagent kit V3 (Illumina) sử dụng để giải trình tự gen.

Chủng chuẩn: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* NCTC 13846™ sử dụng làm quản lý chất lượng (quality control - QC) trong kỹ thuật đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), chủng *E. coli* J53 sử dụng trong kỹ thuật tiếp hợp.

Thiết bị: máy định danh Maldi-ToF (Bruker, Đức), máy PCR, máy giải trình tự Illumina Miseq.

2.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

Kỹ thuật PCR phát hiện gen *mcr-1*: Tách chiết DNA bằng nhiệt. Trình tự của mỗi như sau: *mcr-1* F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3'); *mcr-1* R (5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3') [4]. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: biến tính: 94°C, gắn môi: 5°C, tổng hợp chuỗi: 72°C, 30 chu kỳ. Sản phẩm gen *mcr-1* có kích thước 309 bp. Kiểm soát chất lượng của phản ứng PCR bằng chứng dương và chứng âm. Chứng dương *mcr-1* là DNA khuôn mẫu tách chiết từ chủng *E. coli* SHP45 mang gen *mcr-1*, chứng âm là nước siêu sạch. Hình minh họa kết quả PCR được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Hình minh họa kết quả PCR phát hiện gen *mcr-1*.

Kỹ thuật định danh vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn cần định danh được cấy vào các đĩa thạch thường, ủ ở 37°C trong 18 đến 24 giờ. Khuẩn lạc thuần mọc trên đĩa thạch Nutrient agar được lựa chọn và tiến hành định danh trên máy Maldi Tof và làm test indol để xác định *E. coli*.

Kỹ thuật giải trình tự toàn bộ bộ gen (WGS): Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Luria bertani broth ở 37°C, từ 18 đến 24 giờ. Tách DNA tổng số bằng hệ thống tách chiết tự động QIAcube (Qiagen). Định lượng DNA bằng kit Barteria DNA Prep và máy đo nồng độ Qubit (ThermoFisher Scientific). Thiết lập thư viện DNA sử dụng kit NexteraXT (Illumina) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Giải trình tự các gen bằng máy MiSeq (Illumina) dùng kit MiSeq Reagent V3 Kit, 2x150 bp). Dữ liệu thu được được phân tích trên các phần mềm và công cụ tin sinh: lắp ráp De novo trên SPAdes v3.14.1. Một số công cụ phân tích tin sinh được sử dụng: NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP), Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD).

Kỹ thuật tiếp hợp đánh giá sự lan truyền gen *mcr-1* qua plasmid: Chủng nhận *E. coli* J53 không chứa gen *mcr-1* có thể mọc trên môi trường có chứa sodium azide. Chủng cho là các chủng *E. coli* có plasmid mang gen *mcr-1* kháng colistin. Các chủng cho và nhận được tạo điều kiện tiếp hợp với nhau. Các chủng *E. coli* J53 sau khi tiếp hợp với chủng nhận sẽ truyền plasmid có chứa gen *mcr-1* từ chủng nhận tạo nên chủng mới *E. coli* J53 có mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid (mọc được trên môi trường MacConkey có muối azua (NaN₃) + 2 µg/ml colistin). Xác định gen *mcr-1* của các chủng J53 sau tiếp hợp bằng kỹ thuật PCR.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm của gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập được từ phân người khỏe mạnh, phân động vật, thức ăn và nước

Kết quả giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng mang gen *mcr-1* cho thấy số lượng gen *mcr-1* nằm trên plasmid và NST được phân bố.

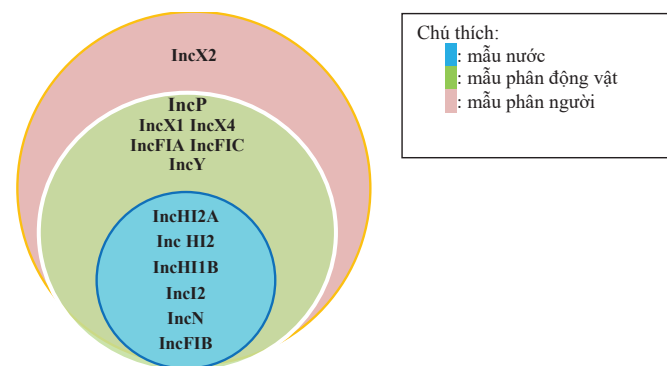
Bảng 1. Sự phân bố của gen *mcr-1* nằm trên NST và plasmid của các chủng *E. coli*.

Loại mẫu	<i>mcr-1</i> subtype	Chủng mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên NST	Chủng mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên plasmid	Chủng mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên NST và plasmid	Tổng số
Phân người	<i>mcr-1.1</i>	10	35	0	45
Phân động vật	<i>mcr-1.1</i>	5	23	1	29
Thức ăn	<i>mcr-1.1</i>	3	0	0	3
Môi trường	<i>mcr-1.1</i>	5	4	1	10
Tổng số	<i>mcr-1.1</i>	23	62	2	87

Gen *mcr-1* kháng colistin ở các chủng *E. coli* được tìm thấy ở cả trên NST và plasmid. Số lượng gen *mcr-1* nằm trên plasmid chiếm 71,3% (n=62) và trên NST là 26,4% (n=23) (bảng 1). Đặc biệt, có 2 chủng có gen *mcr-1* nằm cả trên NST và plasmid, trong đó 1 chủng phân lập từ nước và 1 chủng từ động vật chiếm tỷ lệ 2,3%. 100% gen *mcr-1* có subtype là *mcr-1.1*

3.2. Các loại plasmid mang gen *mcr-1*

Giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* bằng phương pháp short read đã xác định được 64 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid. Nghiên cứu đã xác định được 13 loại plasmid mang gen *mcr-1*, trong đó ở nước là 6 loại, phân động vật 12 loại và phân người 13 loại (hình 2).



Hình 2. Biểu đồ Venn các loại replicon của plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli*. Các replicon nằm ở các đường tròn khác nhau là các replicon của các plasmid nằm trên các loại mẫu khác nhau.

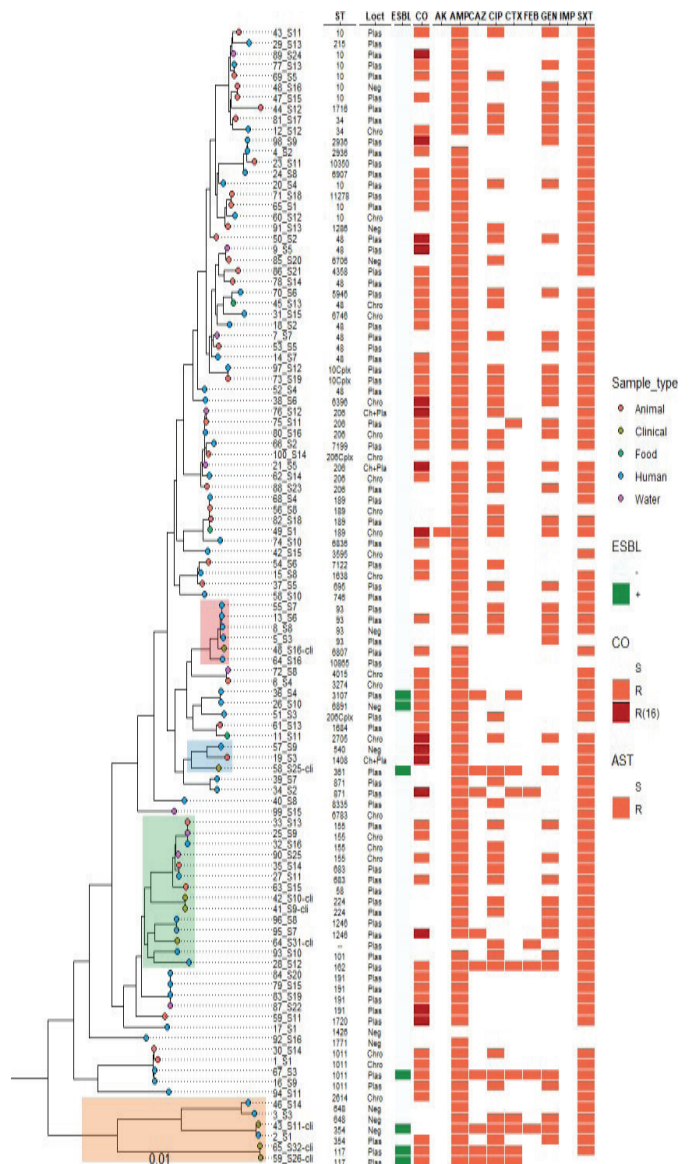
Kết quả hình 2 cho thấy, có 6 loại replicon của plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập từ các mẫu nước, 6 loại này cũng được tìm thấy ở các chủng *E. coli* phân lập từ phân động vật và phân người. Các chủng *E. coli* phân lập từ phân người lạnh và phân động vật đều có chung 12 loại plasmid mang gen *mcr-1*. Có 1 loại plasmid mang gen *mcr-1* (IncX2) chỉ có ở chủng phân lập từ phân người.

Sự kết hợp của các loại replicon đơn trên tạo ra 21 loại multireplicon plasmid khác nhau. Các replicon đơn thường gặp trong cộng đồng là IncI2 (n=7, 10,9%), IncP (n=7, 10,9%), IncX4 (n=5, 7,8%) (bảng 2).

Bảng 2. Các loại plasmid của 64 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu.

STT	Replicon_formula (in silico)	Số chủng (short read)	Kích thước (Kb)	Loại mẫu
1	IncFIA	3	150-300	Phân người + động vật
2	IncFIA : IncFIC : rep2327	1	50-100	Phân động vật
3	IncFIB : IncHI1B	2	100-150	Phân động vật + nước
4	IncFIB : IncHI1B : IncHI1B	2	150-200	Phân người + động vật
5	IncFIB : IncHI1B : IncHI1B : IncN	1	100-150	Phân động vật
6	IncFIB : IncHI1B : IncHI2A : IncHI2 : IncN	1	>300	Phân người
7	IncFIB : IncHI1B : IncN	2	50-150	Phân người + động vật
8	IncFIB : IncI2	1	<50	Phân người
9	IncFIC : rep2244 : IncHI2A : IncHI2	1	>300	Phân người
10	IncHI1B	3	50-100	Phân người + nước
11	IncHI1B : IncHI1B	1	100-150	Phân người
12	IncHI1B : IncHI1B : rep2327	1	50-100	Phân người
13	IncHI1B : IncHI2A : IncHI2	1	200-300	Phân động vật
14	IncHI1B : IncHI2A : IncHI2 : IncN	4	>300	Phân người + động vật
15	IncHI1B : IncX1	2	100-150	Phân người + động vật
16	IncHI1B : IncX2	1	100-150	Phân người
17	IncHI1B : rep2327	1	100-150	Phân động vật
18	IncHI2A : IncHI2	3	200-300	Phân người + động vật
19	IncHI2A : IncHI2 : IncI2	2	>300	Phân người
20	IncHI2A : IncHI2 : IncN	1	200-300	Nước
21	IncHI2A : IncHI2 : IncY	2	200-300	Phân người + động vật
22	IncHI2A : IncI2 : IncN : IncHI2	1	200-300	Phân người
23	IncI2	7	50-100	Phân người + động vật + nước
24	IncN	1	50-100	Phân động vật
25	IncP	7	50-100	Phân người + động vật
26	IncX1	1	<50	Phân người
27	IncX4	5	<50	Phân người + động vật
28	undetected	6	<50	Phân người + động vật

Khi phân tích mối quan hệ kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người lạnh, phân động vật, thức ăn và môi trường từ kết quả của giải trình tự gen của 87 chủng trong nghiên cứu, để có thể làm rõ thêm mối liên hệ giữa các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng và lâm sàng, chúng tôi có kết hợp với các dữ liệu từ kết quả giải trình tự gen của 7 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên lâm sàng được phân lập từ các bệnh phẩm. Cây phân loài thể hiện mối quan hệ kiểu gen giữa các chủng được thể hiện ở hình 3:



Hình 3. Cây phân loài của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*.

Kết quả hình 3 cho thấy, các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người lạnh, phân động vật và môi trường nước có sự phân bố rất đa dạng về kiểu gen. Có 56 STs khác nhau. STs thường gặp bao gồm ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%).

Bảng 3. Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có kiểu trình tự chung được phân loại từ các loại mẫu trong cùng hộ gia đình.

Kiểu trình tự (STs)	Mã hộ	STT	Loại mẫu	<i>mcr-1</i> NST/ <i>mcr-1</i> plasmid	Loại plasmid mang gen <i>mcr-1</i>
155	H137	32	Phân người lành	NST	
		33	Phân động vật	Plasmid	IncHI1B, IncX1
10	H154	47	Phân động vật	Plasmid	IncI2
		48	Phân động vật	Plasmid	IncI2
48	H175	52	Phân người lành	Plasmid	IncHI1B, IncHI2A, IncN
		53	Phân động vật	Plasmid	IncX4
206	H275	75	Phân động vật	Plasmid	IncI2
		76	Nước	Plasmid	IncI2
191	H314	83	Phân người lành	Plasmid	IncHI1B, IncHI2A
		84	Phân người lành	Plasmid	IncHI2, IncN
		87	Nước	Plasmid	IncHI2A, IncHI2, IncN

Kết quả bảng 3 cho thấy, có 5/80 hộ có tìm thấy các chủng có cùng ST được phân lập từ các loại mẫu khác nhau như từ mẫu của người - động vật, mẫu động vật - nước, mẫu người - người và mẫu từ người - nước trong cùng một hộ gia đình

3.3. Kết quả tiếp hợp đánh giá sự lan truyền gen *mcr-1* qua plasmid

Nghiên cứu lựa chọn 24 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* đã được xác định nằm trên plasmid thông qua giải trình tự short read để làm thực nghiệm tiếp hợp đánh giá sự lan truyền *mcr-1* qua plasmid. Kết quả thu được 24 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được tiếp hợp với các chủng nhận là *E. coli* J53. Có 70,83% (n=17) chủng *E. coli* truyền thành công gen *mcr-1* sang chủng nhận *E. coli* J53 (bảng 4). Các plasmid mang gen *mcr-1* này bao gồm 13 loại replicon plasmid trong hình 2 được phân lập từ phân người, phân động vật và nước.

Bảng 4. Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được thực hiện kỹ thuật tiếp hợp.

Mã mẫu	Loại mẫu	Loại plasmid mang <i>mcr-1</i>	Kết quả <i>mcr-1</i> của <i>E. coli</i> J53	Mã mẫu	Loại mẫu	Loại plasmid mang <i>mcr-1</i>	Kết quả <i>mcr-1</i> của <i>E. coli</i> J53)
4	Phân người	IncHI1B, IncX1	+	44	Phân động vật	-	+
7	Nước	IncHI2A, IncHI2	+	47	Phân động vật	IncI2	+
11	Nước	-	+	50	Phân động vật	IncFIB, IncHI1B	+
13	Phân người	-	+	53	Phân động vật	IncX4	(-)
16	Phân người	IncX4	+	54	Phân động vật	IncFIA, IncFIC, rep_cluster_2327	+
19	Phân động vật	IncP	+	59	Phân động vật	IncFIA	+
21	Nước		(-)	74	Phân người	rep_cluster_312	+
23	Phân động vật	IncFIB, IncHI1B, IncHI2A, IncN	(-)	76	Nước	IncI2	(-)
27	Phân người	IncHI1B, IncHI1B, rep_cluster_2327	+	78	Phân động vật	IncP	+
34	Phân người	IncP	(-)	79	Phân người	IncFIB, IncHI1B, IncHI2A, IncHI2, IncN	+
37	Phân người	-	(-)	86	Phân động vật	IncHI1B, IncHI2A, IncHI2	+
40	Phân người	IncFIA	(-)	89	Nước	IncFIB, IncHI1B	+

Kết quả bảng 4 cho thấy, các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên single-replicon và multi-replicon đều có khả năng truyền ngang gen *mcr-1* sang chủng khác qua hình thức tiếp hợp. Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ người, động vật và nước đều có khả năng lan truyền qua hình thức tiếp hợp.

4. Bàn luận

4.1. Đặc điểm của gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập được từ phân người khỏe mạnh, phân động vật, thức ăn và nước

Khi giải trình tự toàn bộ gen của 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*, nghiên cứu của chúng tôi xác định được gen *mcr-1* nằm trên cả NST và plasmid, tuy nhiên tỷ lệ gen *mcr-1* nằm trên plasmid cao hơn nhiều so với nằm trên NST (71,3% so với 26,4%, p<0,001). Toàn bộ 87 chủng *E. coli* đều mang gen *mcr-1* có phân nhóm là *mcr-1.1*. Nghiên cứu của chúng tôi cũng xác định được 2 chủng *E. coli* có gen *mcr-1* nằm trên cả NST và plasmid, bao gồm 1 chủng phân lập từ phân động vật và 1 chủng phân lập từ nước.

Gen *mcr-1* kháng colistin nằm trên plasmid ở các chủng vi khuẩn gram âm đường ruột phân lập từ động vật và người được phát hiện từ NST của các trực khuẩn gram âm đường ruột, phổ biến nhất là *E. coli* phân lập từ động vật sống trong các trang trại và người lành [5, 6]. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu đã phát hiện gen *mcr-1* nằm trên NST của *E. coli* phân lập từ người bệnh và người lành [7, 8]. Nghiên cứu của T. Yamaguchi và cs (2020) [7] trên cộng đồng tại tỉnh Thái Bình cho thấy, tỷ lệ gen *mcr-1* kháng colistin nằm trên NST của các chủng *E. coli* phân lập từ phân người khỏe mạnh cũng khá cao (36,8%).

Các gen kháng kháng sinh nằm trên NST sẽ lan truyền dọc gen kháng trong cùng loài, tốc độ lây truyền chậm hơn các gen kháng kháng sinh nằm trên plasmid. Gen kháng kháng sinh nằm trên plasmid sẽ lan truyền gen kháng sang các loài khác và tốc độ lan truyền nhanh. Gen *mcr-1* được tìm thấy cả ở NST và plasmid, thậm chí trong nghiên cứu của chúng tôi còn tìm thấy 2,3% chủng *E. coli* có gen này nằm đồng thời cả trên NST và plasmid. Điều này cho thấy, gen *mcr-1* có đường lan truyền rất linh hoạt và đa dạng có thể lan truyền cả cho cùng loài và khác loài, vì vậy có thể làm cho tốc độ lan truyền cũng tăng lên.

Để đánh giá tính linh hoạt và đa dạng khi lan truyền gen kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin trong cộng đồng, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu về đặc điểm của các loại plasmid mang gen *mcr-1*, mối liên hệ kiểu gen dựa vào phân tích MLST và đánh giá sự lan truyền qua plasmid thông qua thực nghiệm tiếp hợp.

4.2. Các loại plasmid mang gen *mcr-1*

Khi giải trình tự toàn bộ bộ gen của 64 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid trong nghiên cứu, chúng tôi đã xác định được 13 loại replicon typing của plasmid mang gen *mcr-1*, trong đó các chủng phân lập từ phân người mang nhiều loại nhất (13 loại), sau đó đến phân động vật (12 loại) và nước (6 loại) (hình 2). Điều này cho thấy tính đa dạng của các plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* trong cộng đồng, thể hiện nhiều nhất trong cộng đồng người khỏe mạnh.

Các plasmid có kích thước rất đa dạng, nhỏ nhất là <50 kb, lớn nhất >300 Kb. Có 7 loại replicon đơn mang gen *mcr-1* được phát hiện từ 29 chủng trong các mẫu nghiên cứu, bao gồm là IncI2 (n=7, 10,9%), IncP (n=7, 10,9%), IncX4 (n=5, 7,8%), IncFIA (n=3, 4,7%), IncHI1B (n=3, 4,7%), IncN (n=1, 1,6%) và IncX1 (n=1, 1,6%) tìm thấy ở người, động vật và nước. Các loại multi-replicons plasmid mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu phát hiện được bao gồm sự kết hợp của các loại plasmid IncHI2, IncN, IncX1 và IncR. Có 21 loại multi-replicon khác nhau với sự kết hợp của các loại plasmid IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 và IncI2 được tìm thấy trong 31 chủng *E. coli* ở người, động vật và nước (bảng 2). Một lần nữa cho thấy tính đa dạng của các loại plasmid của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng, không chỉ ở động vật - đối tượng sử dụng colistin trong một thời gian dài mà còn tồn tại cả trong môi trường xung quanh (nước) và người khỏe mạnh mặc dù việc sử dụng colistin ở người hiện nay còn hạn chế. Chúng tôi đưa ra giả thiết rằng, nhờ tính đa dạng này mà làm cho gen *mcr-1* có đặc tính có thể dễ dàng lan truyền qua các plasmid từ động vật qua môi trường, thức ăn

lây sang người, đồng thời lây từ người sang người, điều này thể hiện ở tính đa dạng về các loại plasmid mang gen *mcr-1* trong cộng đồng từ người, động vật đến môi trường.

Một số nghiên cứu trong cộng đồng tại Trung Quốc, Hàn Quốc cũng đã ghi nhận nhiều loại plasmid khác nhau trong cộng đồng như IncI2, IncX4, IncN, IncF..., trong đó replicon IncI2 là loại thường gặp [9, 10]. Tại Việt Nam, một số đặc điểm vi sinh của *E. coli* sinh beta lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016 đã ghi nhận nhiều loại plasmid khác nhau trong cộng đồng nhưng loại chủ yếu thường gặp là IncF [11]. Sự khác biệt này có thể do nghiên cứu ở các cộng đồng khác nhau nên có thể có sự khác nhau về các loại plasmid mang gen *mcr-1*. Để chứng minh giả thuyết trên, chúng tôi tiếp tục tìm bằng chứng thông qua phân tích cây phân loài và thử nghiệm tiếp hợp.

4.3. Mối liên hệ kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người lành, phân động vật, thức ăn và môi trường

Qua phân tích cây phân loài cho thấy, các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người lành, phân động vật, môi trường nước và 7 chủng phân lập từ lâm sàng cho thấy có sự phân bố rất đa dạng về kiểu gen. Trong 94 chủng (7 chủng phân lập từ bệnh phẩm lâm sàng), có 56 STs khác nhau. STs thường gặp bao gồm ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%). Các chủng lâm sàng cũng có các ST rất thay đổi. Không có ST của chủng lâm sàng nào được tìm thấy trong cộng đồng (hình 3).

Phân tích các STs theo hộ gia đình, nghiên cứu của chúng tôi tìm thấy có 4 nhóm mà các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ các nguồn khác nhau (phân người và/hoặc phân động vật và/hoặc nước) trong cùng một hộ gia đình có các STs giống nhau nằm trên cùng một nhánh của cây phân loại, gồm: cặp 32-33 của hộ H137-ST 155, cặp 47-48 của hộ H154, cặp 75-76 của hộ H275-ST206 và cặp 83-84-87 của hộ H314-ST191. Ngoài ra còn cặp 52-53 của hộ H175 đều có cùng ST10 tuy không trên cùng một nhánh nhưng có mối liên quan gần. Đây là bằng chứng chứng tỏ có sự lây lan của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cùng 1 hộ gia đình giữa động vật nuôi trong nhà và người qua môi trường (nước). Nghiên cứu của chúng tôi chưa tìm được bằng chứng lan truyền qua thức ăn có thể do số lượng chủng phân lập còn ít nên hạn chế sự phát hiện này.

Sự đa dạng về STs của các chủng này có thể giải thích do sự lan truyền qua plasmid. Khả năng lan truyền qua plasmid giữa các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được đã được chúng tôi chứng minh qua thử nghiệm tiếp hợp đánh giá sự lan truyền gen qua plasmid thông qua chủng *E. coli* J53.

Chúng tôi lựa chọn 24 chủng *E. coli* đã được xác định mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid bao gồm cả single replicon và multireplicon. Kết quả thử nghiệm tiếp hợp thành công truyền gen *mcr-1* sang chủng *E. coli* J53 (17/24 chủng, 70,8%).

Trên thế giới, có nhiều nghiên cứu đã mô tả sự đa dạng về các STs cũng như bằng chứng về sự lan truyền của gen *mcr-1* qua plasmid của các chủng *E. coli* trong cộng đồng tương tự như nghiên cứu của chúng tôi [6, 12]. Tuy nhiên, tại Việt Nam còn rất ít nghiên cứu trong cộng đồng về vấn đề này.

5. Kết luận

Qua giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu có phối hợp với dữ liệu giải trình tự của 7 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên lâm sàng cho thấy, các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập trong nghiên cứu nằm trên cả NST và plasmid, tỷ lệ gen *mcr-1* nằm trên plasmid cao hơn nằm trên NST (71,3% so với 26,4%, $p < 0,001$). Toàn bộ 87 chủng *E. coli* đều mang gen *mcr-1* có subtype *mcr-1.1*. Các plasmid có kích thước rất đa dạng, nhỏ nhất là <50 kb, lớn nhất >300 Kb. Có 7 loại replicon đơn mang gen *mcr-1* được phát hiện từ 29 chủng phân lập từ phân người, động vật và nước bao gồm: IncI2 (n=7, 10,9%), IncP (n=7, 10,9%), IncX4 (n=5, 7,8%), IncFIA (n=3, 4,7%), IncHI1B (n=3, 4,7%), IncN (n=1, 1,6%) và IncX1 (n=1, 1,6%). Có 21 loại multireplicon khác nhau với sự kết hợp của các loại plasmid IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 và IncI2, được tìm thấy trong 31 chủng *E. coli* phân lập từ phân người, động vật và nước. Có 56 STs khác nhau, trong đó ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%) là các STs thường gặp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của Quỹ NAFOSTED (mã số 108.02-2017.320). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] K. Jeannot, A. Bolard, P. Plésiat (2017), "Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms", *International Journal of Antimicrobial Agents*, **49**(5), pp.526-535, DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029.

[2] D. Yong, M.A. Toleman, C.G. Giske, et al. (2009), "Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(12), pp.5046-5054, DOI: 10.1128/AAC.00774-09.

[3] M.E. Falagas, S.K. Kasiakou, L.D. Saravolatz (2005), "Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections", *Clinical Infectious Diseases*, **40**(9), pp.1333-1341, DOI: 10.1086/429323.

[4] Y.Y. Liu, Y. Wang, T.R. Walsh, et al. (2016), "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study", *The Lancet Infectious Diseases*, **16**(2), pp.161-168, DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

[5] L.L. Zhong, H.T.T. Phan, C. Shen, et al. (2018), "High rates of human fecal carriage of *mcr-1*-positive multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* emerge in China in association with successful plasmid families", *Clinical Infectious Diseases*, **66**(5), pp.676-685, DOI: 10.1093/cid/cix885.

[6] A. Nakano, R. Nakano, R. Nishisouzu, et al. (2021), "Prevalence and relatedness of *mcr-1*-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from livestock and farmers in Japan", *Frontiers in Microbiology*, **12**, DOI: 10.3389/fmicb.2021.664931.

[7] T. Yamaguchi, R. Kawahara, K. Hamamoto, et al. (2020), "High prevalence of colistin-resistant *Escherichia coli* with chromosomally carried *mcr-1* in healthy residents in Vietnam", *mSphere*, **5**(2), DOI: 10.1128/mSphere.00117-20.

[8] T. Tada, P.H. Nhung, K. Shimada, et al. (2017), "Emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates harboring *mcr-1* in Vietnam", *International Journal of Infectious Diseases*, **63**, pp.72-73, DOI: 10.1016/j.ijid.2017.07.003.

[9] J.E. Dominguez, D. Faccone, N. Tijet, et al. (2019), "Characterization of *Escherichia coli* carrying *mcr-1*-plasmids recovered from food animals from Argentina", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **9**, DOI: 10.3389/fcimb.2019.00041.

[10] X. Lu, X. Xiao, Y. Liu, et al. (2020), "Widespread prevalence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* from Père David's Deer in China", *mSphere*, **5**(6), DOI: 10.1128/mSphere.01221-20.

[11] K.T. Diep (2020), *Determination of some Microbiological Characteristics of Extended-spectrum Beta Lactamase-Producing Escherichia coli in Healthy People in The Community of Vu Thu District, Thai Binh Province, 2016*, Doctoral Thesis, Central Institute of Hygiene and Epidemiology (in Vietnamese).

[12] F. Liu, R. Zhang, Y. Yang, et al. (2020), "Occurrence and molecular characteristics of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* from healthy meat ducks in Shandong province of China", *Animals*, **10**(8), p.1299, DOI: 10.3390/ani10081299.

Đặc điểm lâm sàng và hình ảnh nội soi phế quản u máu hạ thanh môn ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương

Nguyễn Thị Thu Nga^{*}, Lê Thị Hồng Hanh¹, Phạm Thu Nga², Phùng Đăng Việt¹, Lê Thanh Chương¹,
Đặng Thị Kim Thanh¹, Phạm Thị Thanh Tâm¹, Nguyễn Thị Minh Phương¹

¹Bệnh viện Nhi Trung ương, 118/879 La Thành, phường Láng Thượng, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/5/2023; ngày chuyển phản biện 25/5/2023; ngày nhận phản biện 31/5/2023; ngày chấp nhận đăng 5/6/2023

Tóm tắt:

Mục tiêu: Mô tả đặc điểm lâm sàng và hình ảnh nội soi phế quản của bệnh nhân u máu hạ thanh môn (UMHTM). **Đối tượng nghiên cứu:** 25 bệnh nhân được chẩn đoán và điều trị UMHTM tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ 1/6/2018 đến 30/5/2023. **Phương pháp nghiên cứu:** Mô tả cắt ngang hồi cứu và tiến cứu. **Kết quả:** Tuổi trung vị 2,7 tháng, dao động từ 20 ngày tuổi đến 20 tháng, tỷ lệ nữ/nam là 2,1/1. Tuổi khởi phát tiếng thở rít 30,7±20,6 ngày. Thời gian kéo dài triệu chứng thở rít trung bình 51,3±47,5 ngày. **Đặc điểm lâm sàng:** Thở rít (80%), co kéo hõm trên ức (76%), suy hô hấp (72%), ho (36%), u máu ngoài da (8%), ăn sặc (8%). **Kết quả nội soi phế quản (NSPQ):** 92% khối u có màu đỏ, thành nhẵn. Vị trí khối u: 36% bao quanh chu vi, 32% khối u xuất phát từ thành bên phải, 28% từ thành bên trái, 4% từ thành sau hạ thanh môn, 8% u lan xuống dưới khí quản 1 cm. Về kích thước khối u, chủ yếu hẹp độ III (60%) và độ II (32%). **Kết luận:** UMHTM là một trong những bệnh lý hiếm gặp, gây thở rít khởi phát sớm ở trẻ dưới 6 tháng, đặc điểm thở rít kéo dài, tái diễn, có thể gây khó thở thanh quản. Chẩn đoán chủ yếu dựa vào nội soi phế quản, quan sát màu sắc, đặc điểm hình thái, kích thước khối u.

Từ khóa: dị tật thanh môn, thở rít, u máu hạ thanh môn.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

UMHTM là một bệnh lý tăng sinh tế bào nội mạch máu, tạo thành khối lành tính ngay dưới dây thanh, gây tắc nghẽn đường thở từ vừa đến nặng. Bệnh xuất hiện ở giai đoạn sơ sinh, tiến triển kéo dài trong 12-18 tháng qua 3 giai đoạn: tăng sinh, ổn định và thoái triển [1].

U máu nói chung có thể gặp 4-5% ở trẻ sơ sinh [2]. UMHTM ít gặp hơn, chiếm 1,5% các bất thường bẩm sinh đường thở [3]. Tỷ lệ mắc bệnh nữ/nam là 2/1, thường hay gặp ở trẻ sinh non, nhẹ cân [4]. Triệu chứng hay gặp nhất là thở rít thì hít vào hoặc hai thì, với 85% các trường hợp biểu hiện thở rít dưới 6 tháng tuổi có thể gây suy hô hấp tiến triển nhanh trong giai đoạn u tăng sinh. Tỷ lệ tử vong do tắc nghẽn đường thở có thể lên tới 50% nếu không được điều trị kịp thời [4]. Vì vậy, cần chẩn đoán sớm UMHTM để có phác đồ điều trị thích hợp, cũng như tiên lượng trước, sau điều trị.

Trên thế giới có nhiều báo cáo về UMHTM, tuy nhiên chủ yếu là các báo cáo về ca bệnh đơn lẻ hoặc chùm ca bệnh, do đây là bệnh hiếm gặp. Tại Việt Nam, nghiên cứu về UMHTM cũng chưa có nhiều. Với mong muốn giúp các bác sĩ lâm sàng chẩn đoán sớm và tránh bỏ sót bệnh lý UMHTM, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục tiêu tìm hiểu các đặc điểm lâm sàng và hình thái của UMHTM qua nội soi phế quản.

^{*}Tác giả liên hệ: Email: thungabs@gmail.com

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Bệnh nhân được chẩn đoán xác định UMHTM tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ 1/6/2018 đến 30/5/2023.

Tiêu chuẩn chẩn đoán UMHTM: Trẻ có triệu chứng thở rít kéo dài, khởi phát sớm dưới 6 tháng tuổi, được tiến hành nội soi phế quản ống mềm. Quan sát thấy hình ảnh khối màu hồng, đỏ hoặc tím, thành nhẵn, căng bóng, mềm, phát triển dưới dây thanh, được xác định bởi các bác sĩ nội soi phế quản có kinh nghiệm tại Khoa Khám thăm dò chức năng hô hấp, Bệnh viện Nhi Trung ương.

Tiêu chuẩn chẩn đoán mức độ hẹp đường thở của UMHTM theo thang phân loại của Myer-Cotton [5]: i) Độ I: mức độ hẹp 0-50%; ii) Độ II: mức độ hẹp 51-70%; iii) Độ III: mức độ hẹp 71-99%; iv) Độ IV: không xác định được lỗ hẹp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang hồi cứu và tiến cứu.

2.3. Phân tích số liệu

Các số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 20.0.

Clinical features and endoscopic images of hemoptysis and subglottic mass in children at Vietnam National Children's Hospital

Thi Thu Nga Nguyen^{1*}, Thi Hong Hanh Le¹,
Thu Nga Pham², Dang Viet Phung¹,
Thanh Chuong Le¹, Thi Kim Thanh Dang¹,
Thi Thanh Tam Pham¹, Thi Minh Phuong Nguyen¹

¹Vietnam National Children's Hospital,
18/879 La Thanh Street, Lang Thuong Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Hanoi Medical University,
1 Ton That Tung, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 22 May 2023; revised 31 May 2023; accepted 5 June 2023

Abstract:

Objectives: To describe clinical characteristics and endoscopic image of patients with subglottic hemangioma. **Subjects:** 25 patients were diagnosed subglottic hemangioma at Vietnam National Children's Hospital from 1st June, 2018 to 30th May, 2023. **Methods:** Retrospective and prospective cross-sectional studies. **Results:** median age was 2.7 months, ranged from 20 days to 20 months, female/male ratio: 2.1/1, mean age of stridor breathing onset was 30.7±20.6 days. The mean of prolonged and recurred stridor breathing was 51.3±47.5 days. **Clinical features:** stridor breathing (80%), suprasternal depression (76%), respiratory failure (72%), cough (36%), skin hemangioma (8%), choking (8%). **Bronchoscopy results:** The most common characteristic of the subglottic hemangioma was red with smooth wall (92%). The location of subglottic hemangioma included the following: circumferential lesion (36%), the right wall (32%), the left wall (28%), posterior wall (4%), and 8% of those spread to 1 cm below the trachea. The range of subglottic narrowing tumour was grade III (60%) and grade II (32%). **Conclusions:** Subglottic hemangioma is one of the rare diseases, causing early onset stridor breathing in children under 6 months. The most outstanding presentation is prolonged, recurrent stridor, which can cause laryngeal dyspnea. Diagnosis is mainly based on bronchoscopy to evaluate the colour, morphology, and tumour size.

Keywords: glottis malformation, subglottic hemangioma, wheezing.

Classification number: 3.2

3. Kết quả

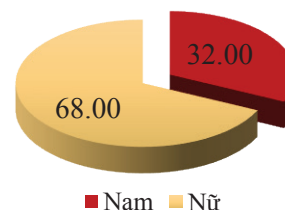
3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Trong thời gian từ 1/6/2018 đến 30/5/2023 có 25 trẻ đủ tiêu chuẩn chẩn đoán UMHTM được đưa vào nghiên cứu, trung bình mỗi năm có 5 trẻ chẩn đoán UMHTM.

Bảng 1. Đặc điểm tuổi của nhóm đối tượng nghiên cứu (n=25).

Đặc điểm	Trung bình (SD)
Tuổi trung bình (tháng)	4,0 (4,3)
Trung vị (tháng)	2,7 (2,0-3,4)
Min-max (tháng)	0,8-20
Nhóm tuổi	n (%)
<2 tháng	6 (24,0)
Từ 2 đến 6 tháng	17 (68,0)
Trên 6 tháng	2 (8,0)

Kết quả bảng 1 cho thấy, tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân thời điểm phát hiện UMHTM trung bình 4 tháng, trung vị 2,7 tháng, nhỏ nhất 20 ngày tuổi, lớn nhất 20 tháng, trong đó chủ yếu là nhóm dưới 6 tháng chiếm 92%. Tỷ lệ nữ/nam là 2,1/1 (hình 1).

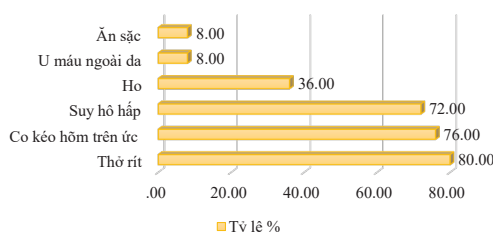


Hình 1. Phân bố giới tính của nhóm nghiên cứu (n=25).

Bảng 2. Đặc điểm tuổi khởi phát và thời gian kéo dài thở rít.

Đặc điểm	n (%)
Tuổi khởi phát thở rít	
Tuổi trung bình (ngày)	30,7±20,6
Min-max (ngày)	3-75
Phân nhóm tuổi khởi phát thở rít	
Trong 1 tháng đầu	17 (68,0)
Từ 1 đến 3 tháng	8 (32,0)
Thời gian kéo dài thở rít (liên tục hoặc gián đoạn)	
Thời gian trung bình (ngày)	51,3±47,5
Min-max (ngày)	10-240

Kết quả bảng 2 cho thấy, tuổi khởi phát thở rít sớm, trung bình 30,7±20,6 ngày tuổi, sớm nhất 3 ngày tuổi, muộn nhất 75 ngày tuổi, trong đó nhóm khởi phát sớm ≤1 tháng chiếm 68,0%. Thời gian kéo dài triệu chứng thở rít từ thời điểm khởi phát đến lúc được chẩn đoán trung bình 51,3±47,5 ngày, ngắn nhất 10 ngày, dài nhất 240 ngày.



Hình 2. Phân bố triệu chứng lâm sàng tại thời điểm chẩn đoán.

Triệu chứng thở rít (stridor), co kéo hõm trên ức hay gặp nhất. Gần 3/4 số bệnh nhân nhập viện có tình trạng suy hô hấp (hình 2).

3.2. Kết quả nội soi phế quản

Kết quả bảng 3 cho thấy, khối u máu quan sát qua nội soi phế quản có màu đỏ, hồng, thành nhẵn. Vị trí khối u xuất phát ngay dưới thanh môn thành bên trái, bên phải, bao quanh chu vi với tỷ lệ gần tương đương nhau (28, 32 và 36%); 2/25 bệnh nhân u phát triển xuống khí quản. Mức độ hẹp chủ yếu độ III, độ II (60 và 32%).

Bảng 3. Đặc điểm cấu trúc, hình thái khối u máu trên nội soi phế quản.

Đặc điểm	n (%)
Màu sắc, tính chất u máu	
Đỏ, nhẵn	23 (92,0)
Hồng, nhẵn	2 (8,0)
Vị trí xuất phát	
Thành bên trái hạ thanh môn	7 (28,0)
Thành bên phải hạ thanh môn	8 (32,0)
Thành sau hạ thanh môn	1 (4,0)
Bao quanh chu vi hạ thanh môn	9 (36,0)
Kéo dài xuống khí quản	2 (8)
Phân độ hẹp	
Độ I	2 (8,0)
Độ II	8 (32,0)
Độ III	15 (60)
Độ IV	0

4. Bàn luận

UMHTM được Morrell Mackenzie mô tả lần đầu tiên vào năm 1864. Tỷ lệ mắc UMHTM chưa được xác định trong bất kỳ nghiên cứu chính thức nào. Một phân tích từ cơ sở dữ liệu hệ thống Thông tin Y tế Nhi khoa của 37 bệnh viện trong giai đoạn 5 năm 2000-2005 cho thấy, trong số 2890 bệnh nhân u máu nhập viện, có 337 bệnh nhân (gần 12%) đã cần phải hỗ trợ đường thở trong ít nhất 1 lần [6]. Do đó, trung bình, các bệnh viện trong nhóm nghiên cứu này điều trị ít hơn 3 trẻ u máu có triệu chứng hô hấp mỗi năm.

Theo một nghiên cứu hồi cứu về điều trị UMHTM ở Anh tại 3 trung tâm nhi khoa từ năm 1980 đến năm 2002 cho thấy, tổng cộng có 116 trẻ bị UMHTM đã được xác định, trong đó

78 trẻ nữ và 38 trẻ nam. Tuổi tại thời điểm xuất hiện dao động từ 1 đến 18 tháng (tuổi trung bình là 4,7 tháng) [7].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, trong 5 năm (2018-2023) có 25 trẻ được chẩn đoán UMHTM với 17 trẻ nữ, 8 trẻ nam. Tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân thời điểm phát hiện UMHTM dao động từ 20 ngày tuổi đến 20 tháng, trong đó chủ yếu là nhóm ≤ 6 tháng chiếm 92%. Có 2 bệnh nhân được chẩn đoán lúc 15 và 20 tháng tuổi, tiền sử thở rít - suy hô hấp tái diễn, kéo dài, 1 trẻ đã được mở canuyl lúc 3 tháng, 1 trẻ mở canuyl lúc 8 tháng. Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự với báo cáo của X. Ding và cs (2020) [8] khi phân tích hồi cứu trên 16 trẻ được chẩn đoán và điều trị UMHTM tại Trung tâm Nhi khoa của Bệnh viện Nhân dân Hồ Nam từ tháng 11/2012 đến tháng 5/2018, trong đó có 10 trẻ nam và 6 trẻ nữ. Các trường hợp từ 15 ngày tuổi đến 8 tuổi, với 3 trường hợp dưới 2 tháng, 6 trường hợp 2-4 tháng, 4 trường hợp 4-6 tháng và 3 trường hợp trên 6 tháng.

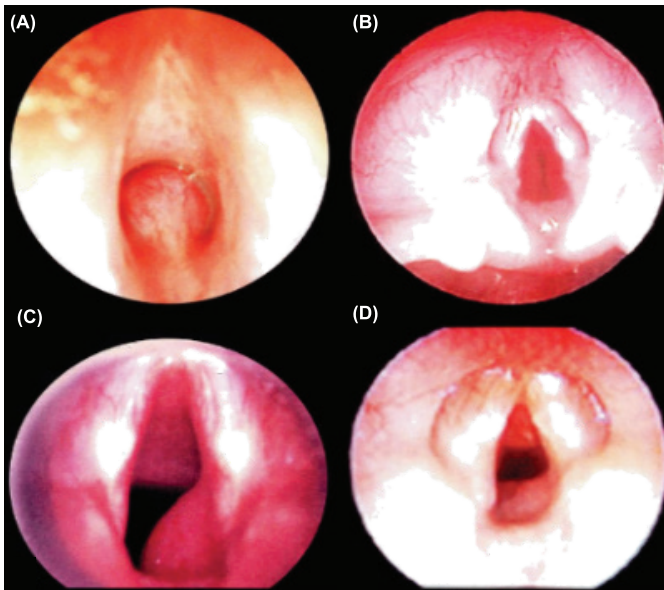
Các bệnh nhân của chúng tôi phần lớn nhập viện vì lý do thở rít thì hít vào, hoặc hai thì kéo dài hoặc tái diễn. Thời điểm khởi phát tiếng thở bất thường diễn ra sớm, trung bình $30,7 \pm 20,6$ ngày tuổi, sớm nhất 3 ngày tuổi, muộn nhất 75 ngày tuổi, với 68% bệnh nhân khởi phát từ giai đoạn sơ sinh dưới 1 tháng tuổi, 32% bệnh nhân khởi phát thở rít từ thời điểm 1 tháng- 3 tháng. Thời gian kéo dài triệu chứng thở rít từ thời điểm khởi phát đến lúc được chẩn đoán trung bình $51,3 \pm 47,5$ ngày, dao động 10-240 ngày. Theo y văn, triệu chứng thở rít tái phát hoặc kéo dài liên tục tăng dần từ giai đoạn sơ sinh có thể được xem như là một “dấu hiệu cờ đỏ” chẩn đoán UMHTM [9].

Tại thời điểm được nội soi phế quản chẩn đoán xác định, ngoài dấu hiệu thở rít (80%), bệnh nhân có dấu hiệu co kéo hõm trên ức (76%), suy hô hấp mức độ từ nhẹ đến nặng (72%), biểu hiện khó thở thanh quản. Trong đó, 18/25 trẻ đã nhập viện ít nhất 1 lần ở tuyến trước với các chẩn đoán viêm phổi, viêm tiểu phế quản, viêm thanh quản cấp, mềm sụn thanh quản, theo dõi dị vật thanh quản...

Các triệu chứng ít gặp: u máu vùng môi, cằm (8%), ăn sặc (8%). Trong nghiên cứu của S.J. Orlow và cs (1997) [10] về mối liên quan giữa u máu ngoài da vùng “bộ râu” (vị trí quanh môi, cằm) với UMHTM, trong 529 bệnh nhân u máu có 187 trẻ u máu vùng đầu cổ; 16/187 trên có u máu vùng “bộ râu”, trong 16 trẻ này có tới 10 trẻ có biểu hiện triệu chứng thở rít, 4 trong số 10 trẻ phải mở khí quản. Do vậy, nếu trẻ có u máu vùng “bộ râu” luôn phải chú ý các triệu chứng hô hấp, tránh bỏ sót UMHTM.

Nội soi phế quản dưới gây mê được coi là tiêu chuẩn vàng chẩn đoán UMHTM. Hình ảnh u máu là một khối màu đỏ, hồng hoặc tím, thành nhẵn. Hầu hết UMHTM nằm ngay dưới dây thanh, có thể phát triển trên dây thanh, hoặc kéo dài trong khí quản. Khối u mềm và có thể ép được, cho phép đặt nội khí quản dễ dàng bằng ống nội khí quản mà không có nguy cơ xuất huyết nghiêm trọng [9]. Tồn thương ưu thế

bên trái đã được báo cáo, nhưng UMHTM có thể là hai bên, theo chu vi hoặc nhiều vị trí khác (hình 3).



Hình 3. Hình ảnh UMHTM theo hình thái tổn thương. (A) Một bên gây tắc nghẽn hoàn toàn vùng hạ thanh môn; (B) Theo chu vi; (C) Một bên bên phải với vết lõm phía sau; (D) Thành sau biệt lập.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, hình ảnh khối u máu trên nội soi phế quản ống mềm đều có màu sắc đỏ, hồng, thành nhẵn, mặt độ mềm như y văn mô tả. Vị trí u xuất phát từ thành bên trái, bên phải, bao quanh chu vi hạ thanh môn với tỷ lệ gần tương đương nhau, tương ứng 28, 32 và 36%; 4% từ thành sau hạ thanh môn. 2/25 trường hợp, khối u lan xuống khí quản đoạn dài khoảng 1 cm. Về kích thước khối u, ở thời điểm soi phát hiện u máu lần đầu tiên, khối u chủ yếu độ II (32%), độ III (60%). Ngoài ra, có 2/25 ca bệnh khối u mức độ I, trong đó 1 ca đã được nội soi phát hiện u máu ở tuyến tính, đang điều trị propranolol 3 tháng, khi kiểm tra soi lại tại Bệnh viện Nhi Trung ương thấy khối u đang thoái triển; 1 ca đã mở khí quản lúc 4 tháng, kiểm tra lại sau 2 tháng phát hiện khối u máu nhỏ ở thành bên trái không ảnh hưởng đến thông khí. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự với nghiên cứu của R. Rahbar và cs (2004) [7] với 100% khối u có màu đỏ, 22% u xuất phát từ 2 thành bên, 21% từ thành sau bên trái, 21% bao quanh chu vi, 16% xuất phát thành bên trái, 6% xuất phát thành bên phải, 5% thành sau, 2% thành sau bên phải và 7% không đánh giá được vị trí. Các tác giả cũng đánh giá mức độ hẹp của khối u máu dao động 10-99% (độ I-III), độ hẹp trung bình 65% (độ II). Đặc biệt, trong nghiên cứu của chúng tôi có 2 trẻ được nội soi phế quản từ giai đoạn sơ sinh, thấy khối vùng hạ thanh môn, nhưng không xác định được bản chất khối u qua hình ảnh, sinh thiết. Tình trạng suy hô hấp của 2 trẻ tiến triển nặng hơn, đã được mở khí quản cấp cứu. Sau 6 tháng, nội soi lại hình ảnh khối u màu sắc hồng, nhẵn, rõ nét hơn, kết hợp chụp cắt lớp vi tính độ phân giải cao vùng cổ, thấy khối

ngấm thuốc mạnh vùng hạ thanh môn tương ứng với vị trí khối u trên nội soi. Cả 2 trẻ đều được điều trị propranolol, cho kết quả tốt cải thiện kích thước khối u trên nội soi phế quản, 1 trẻ đã rút được canuyl, 1 trẻ đang tiếp tục theo dõi, có kế hoạch rút canuyl đợt kiểm tra lần sau.

5. Kết luận

UMHTM là một bệnh lý hiếm gặp ở trẻ em, nếu không được phát hiện sớm, điều trị kịp thời có thể dẫn tới dấu hiệu suy hô hấp nghiêm trọng, đe dọa tính mạng. Các triệu chứng lâm sàng nổi bật: 100% trẻ có tiền sử thở rít kéo dài, tái diễn trước 3 tháng, trong đó 68% trẻ khởi phát thở rít trong 1 tháng đầu; thời gian thở rít, kéo dài hoặc gián đoạn tái diễn trên 10 ngày, khó thở thanh quản (72%). Nội soi phế quản được coi là tiêu chuẩn vàng giúp chẩn đoán xác định và phân loại mức độ gây hẹp. Trong trường hợp nghi ngờ chẩn đoán, có thể đề xuất thêm chụp cắt lớp vi tính độ phân giải cao, hoặc cộng hưởng từ có tiêm thuốc cản quang vị trí cổ ngực.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.A. Hardison, K.M. Dodson, J.L. Rhodes (2014), "Subglottic hemangioma treated with propranolol", *Eplasty*, **Vol.14**. ic2.
- [2] A.N. Haggstrom, B.A. Drolet, E. Baselga, et al. (2006), "Prospective study of infantile hemangiomas: Clinical characteristics predicting complications and treatment", *Pediatrics*, **118(3)**, pp.882-887, DOI: 10.1542/peds.2006-0413.
- [3] S.M. Ahmad, A.M. Soliman (2007), "Congenital anomalies of the larynx", *Otolaryngol. Clin. North Am.*, **40(1)**, pp.177-191, DOI: 10.1016/j.otc.2006.10.004.
- [4] M.T. Truong, K.W. Chang, D.R. Berk, et al. (2010), "Propranolol for the treatment of a life-threatening subglottic and mediastinal infantile hemangioma", *J. Pediatr.*, **156(2)**, pp.335-338, DOI: 10.1016/j.jpeds.2009.10.010.
- [5] C.M. Myer, D.M. O'Connor, R.T. Cotton (1994), "Proposed grading system for subglottic stenosis based on endotracheal tube sizes", *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **103(4 Pt 1)**, pp.319-323, DOI: 10.1177/000348949410300410.
- [6] K. Balakrishnan, J.A. Perkins (2010), "Management of airway hemangiomas", *Expert Rev. Respir. Med.*, **4(4)**, pp.455-463, DOI: 10.1586/ers.10.46.
- [7] R. Rahbar, R. Nicollas, G. Roger, et al. (2004), "The biology and management of subglottic hemangioma: Past, present, future", *The Laryngoscope*, **114(11)**, pp.1880-1891, DOI: 10.1097/01.mlg.0000147915.58862.27.
- [8] X. Ding, L. Zhong, B. Zhang, et al. (2020), "Clinical diagnosis and oral propranolol curative effect analysis of infant subglottic hemangioma", *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **13(2)**, pp.1014-1022.
- [9] L. Wu, X. Wu, X. Xu, et al. (2015), "Propranolol treatment of subglottic hemangiomas: A review of the literature", *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **8(11)**, pp.19886-19890.
- [10] S.J. Orlow, M.S. Isakoff, F. Blei (1997), "Increased risk of symptomatic hemangiomas of the airway in association with cutaneous hemangiomas in a "beard" distribution", *J. Pediatric*, **131(4)**, pp.643-646, DOI: 10.1016/s00223476(97)70079-9.

Nghiên cứu thành phần hóa học theo hướng tác dụng kháng viêm và chống oxy hóa của cây Bồ công anh (*Lactuca indica* L.)

Kiều Thị Thủy¹, Cao Lý Tấn Thông¹, Nguyễn Thị Ái Nhung², Nguyễn Thành Triết^{3*}

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

²Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, phường Vĩnh Linh, TP Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế, Việt Nam

³Khoa Y học cổ truyền, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 217 Hồng Bàng, phường 11, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/9/2022; ngày chuyển phản biện 23/9/2022; ngày nhận phản biện 11/10/2022; ngày chấp nhận đăng 20/10/2022

Tóm tắt:

Bồ công anh Việt Nam (*Lactuca indica* L.) là một loại dược liệu được dùng trong y học cổ truyền để trị mụn nhọt và một số bệnh viêm da. Nghiên cứu này sử dụng mô hình ức chế sản sinh nitric oxide (NO) trong tế bào RAW264.7 và thử nghiệm trung hoà 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) để sàng lọc hoạt tính kháng viêm và chống oxy hoá *in vitro* của các cao phân đoạn từ cây *L. indica*. Qua đó, xác định được cao cloroform ức chế sản sinh NO mạnh nhất và cao ethyl acetat trung hoà DPPH tốt nhất. Từ cao cloroform và ethyl acetat phân lập được 6 hợp chất: acid pentadecanoic (1), lupeol (2), vanillin (3), 5-hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone (4), luteolin-7-O- β -D-glucoside (5), acetin-7-O- β -D-rutinoside (6). (5) là chất duy nhất đồng thời có hoạt tính ức chế sản sinh NO ($IC_{50}=13,86\pm 1,10 \mu M$) và có khả năng bắt gốc DPPH ($IC_{50}=26,93\pm 0,10 \mu M$). Nghiên cứu này gợi ý rằng các phân đoạn cloroform, ethyl acetat và chất (5) đều có hiệu quả kháng viêm liên quan đến sản xuất quá mức NO trong tế bào, bên cạnh đó, chất (5) và phân đoạn ethyl acetat cũng có tác dụng chống oxy hoá mạnh.

Từ khóa: DPPH, *Lactuca indica* L., luteolin-7-O- β -D-glucosid, RAW264.7.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

NO được sản xuất từ đại thực bào đóng vai trò quan trọng trong cơ thể người, trong đó bao gồm chức năng đáp ứng miễn dịch nhằm bảo vệ cơ thể khỏi các vi sinh vật gây bệnh, chức năng dẫn truyền thần kinh, hay tác nhân giãn cơ trơn mạch máu [1, 2]. Tuy nhiên, sự sản xuất quá mức NO bởi các enzyme iNOS (inducible nitric synthase) là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh liên quan đến viêm như sốc nhiễm khuẩn hoặc tổn thương các mô liên kết [3]. Bên cạnh đó, NO cũng là một loại gốc tự do, có thể gây tổn thương vật chất di truyền (DNA, RNA), tạo cơ hội phát sinh những đột biến gen bất lợi, ảnh hưởng đến sức khoẻ [1, 3]. Trong nỗ lực tìm kiếm các thuốc kháng viêm có nguồn gốc tự nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy, một số loài thuộc chi Rau diếp (*Lactuca* L.), họ Cúc (*Asteraceae* Dumort, 1822) có tiềm năng làm thuốc kháng viêm dựa trên các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* (điển hình như *L. sativa*, *L. scariola*, *L. indica*) [4-8].

Thuộc danh mục 100 dược liệu có giá trị y tế và kinh tế cao để tập trung phát triển giai đoạn 2020-2030 của Bộ Y tế [9], Bồ công anh Việt Nam còn là một dược liệu được dùng phổ biến trong y học cổ truyền, với công dụng thanh nhiệt tiêu độc, dùng chữa mụn nhọt, viêm nhiễm [10, 11]. Một số nghiên cứu trước đây, như của S.Y. Wang và cs (2003) [8] đã báo cáo tác dụng ức chế sản sinh NO và dập tắt gốc tự do DPPH của dịch chiết methanol từ cây *L. indica*, càng khẳng định khả năng kháng viêm và chống oxy hoá của dược liệu này. Tuy nhiên, các hợp chất cụ thể trong cây *L. indica* mang tác dụng sinh học vẫn chưa được xác định, vì vậy cần có những nghiên cứu kết hợp sàng lọc hoạt tính kháng viêm và chống oxy hoá của cao ethanol toàn phần và các cao phân đoạn.

Đồng thời cần phân lập và đánh giá hoạt tính của các hợp chất tự nhiên trong phân đoạn có tác dụng mạnh nhất, cung cấp thêm bằng chứng về tác dụng sinh học và góp phần nâng cao giá trị của dược liệu Bồ công anh Việt Nam.

Nghiên cứu này sử dụng 2 mô hình thử nghiệm *in vitro*: ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 được kích thích bằng lipopolysaccharid và thử nghiệm trung hoà gốc tự do DPPH để khảo sát tác dụng sinh học các cao phân đoạn chiết xuất từ cây Bồ công anh nhằm phân lập, xác định cấu trúc và hoạt tính của một số hợp chất tự nhiên từ các phân đoạn có hoạt tính tốt nhất.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Phần trên mặt đất cây Bồ công anh Việt Nam, khối lượng 4 kg, được cung cấp bởi PGS.TS. Nguyễn Thị Ái Nhung - Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế vào tháng 11/2019. Mẫu được lưu tại Bộ môn Dược học cổ truyền, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh với ký hiệu tiêu bản BAVN-11.19. Dược liệu được phơi âm can trong 48 giờ, sau đó sấy khô trong tủ sấy đối lưu ở nhiệt độ 50°C trong 2 giờ, xay nhỏ rồi rây (Ø 0,5 mm) thu được bột thô, bột này được dùng cho các nghiên cứu về dược lý và hóa học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Một lượng nhỏ dược liệu (50 g mỗi mẻ) được chiết ngâm kiệt với ethanol 96% hoặc ethanol 50% (tỷ lệ dược liệu - dung môi là 1:10, kiểm tra chiết kiệt bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng so sánh lần chiết đầu và cuối), tiến hành trong dụng cụ chuyên dụng bằng inox. Cao lỏng 1:10 được cô quay đuổi dung

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenthatriet1702@ump.edu.vn

Anti-inflammatory and anti-oxidant activity-guided investigation of phytoconstituents from *Lactuca indica* L.

Thi Thuy Kieu¹, Ly Tan Thong Cao¹,
Thi Ai Nhung Nguyen², Thanh Triet Nguyen^{3*}

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

²Faculty of Chemistry University of Sciences, Hue University,

77 Nguyen Hue, Vinh Linh Ward, Hue City, Thua Thien Hue Province, Vietnam

³Faculty of Traditional Medicine, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City,
217 Hong Bang, Ward 11, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 20 September 2022; revised 11 October 2022; accepted 20 October 2022

Abstract:

Vietnamese dandelion (*Lactuca indica* L.) presents various remedies to cure pustules and several derma-inflammatory diseases in terms of traditional medicine. In this study, the anti-inflammatory and antioxidant effects of several fractions from *L. indica* were screened by assessing the inhibitory capacity of nitric oxide production in RAW 264.7 cells and the DPPH scavenging activity. Through screening steps, the chloroform extract exhibited extraordinary inhibition on NO synthesis, whereas the ethyl acetate singly showed a remarkable capacity to neutralise the DPPH radical. Bioactivity-guided isolation led to the identification of six compounds from the chloroform and ethyl acetate extracts, including pentadecanoic acid (1), lupeol (2), vanillin (3), 5-hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone (4), luteolin-7-O- β -D-glucoside (5), acacetin-7-O- β -D-rutinoside (6). Only compound (5) exhibited notable interruption in NO synthesis ($IC_{50}=13.86\pm1.10\text{ }\mu\text{M}$) and simultaneously neutralised DPPH radical ($IC_{50}=26.93\pm0.10\text{ }\mu\text{M}$). This study suggests that compound (5) as well as the chloroform and ethyl acetate extracts could be potential in preventing inflammatory diseases mediated by excessive production of NO. Additionally, (5) and the ethyl acetate extract could potentially be natural anti-oxidants.

Keywords: DPPH, *Lactuca indica* L., luteolin-7-O- β -D-glucoside, RAW264.7.

Classification number: 3.4

môi ở áp suất giảm (gia nhiệt ở 45°C, ngưng tụ dung môi ở 3°C, tốc độ quay 50 vòng/phút, mức chân không -75 mBar) đến khi độ ẩm đạt dưới 20%, thu được 6,2 g cao đặc EtOH 96% và 5,7 g cao đặc EtOH 50%, sau đó các cao này được sàng lọc tác dụng ức chế sản sinh NO và bắt gốc DPPH. Kết quả cho thấy, cao EtOH 50% có tác dụng tốt hơn cao EtOH 96%. Vì vậy, mẻ lớn dược liệu (4 kg) được tiến hành chiết ngâm kiệt với EtOH 50% (tỷ lệ dược liệu - dung môi (1:10), điều kiện chiết xuất tương tự như mẻ nhỏ). Cao lỏng (1:10) được cô quay đuôi cón, thu được cao đặc. Tiến hành lắc phân bố lỏng - lỏng cao đặc nêu trên với các dung môi hữu cơ và cô dịch chiết để thu được các cao đặc tương ứng: *n*-hexan

(5,0 g), cloroform (37,0 g), ethyl acetat (7,0 g), phần còn lại là cao nước (317,0 g). Quá trình chiết phân bố lỏng mỗi phần đoạn được kiểm tra chiết kiệt bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng so sánh lần chiết đầu và cuối. Các cao phần đoạn được sàng lọc hoạt tính ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW264.7 được kích thích bằng lipopolysaccharid (LPS) và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, sau đó chọn phần đoạn có hoạt tính mạnh nhất để phân lập các hợp chất mục tiêu. Tiến hành đánh giá cấu trúc các hợp chất thu được bằng các phương pháp phổ 1D-/2D-NMR (600/151 MHz, chất chuẩn nội là tetramethylsilan) và ESI-MS, đồng thời đánh giá tác dụng sinh học của các chất sạch theo 2 phương pháp ban đầu.

Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS:

Chuẩn bị mẫu thử và tế bào: Mẫu được pha thành dung dịch gốc với nồng độ 10 mg/ml (đối với cao chiết) hoặc 100 mM (đối với chất sạch) trong dimethylsulfoxid (DMSO), sau đó pha loãng dung dịch gốc thành dãy nhiều nồng độ với cùng dung môi. Tế bào RAW264.7 được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 37°C, CO₂ 5%, fetal bovin serum-FBS 10%, streptomycin sulfat), sau đó được chuyển vào đĩa 96 giếng với mật độ 2,5x10⁵ tế bào/giếng.

Tiến hành thử nghiệm: Mỗi giếng được kích thích bằng LPS (2 μ l/giếng, nồng độ 0,1 mg/ml) trong 24 giờ với sự có mặt của các chất thử ở nhiều nồng độ khác nhau. Hút phần dịch nổi của tế bào để thực hiện phản ứng với thuốc thử Griess. Natri nitrit (NaNO₂) ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để xây dựng đường chuẩn, độ hấp thụ UV-VIS được đo ở bước sóng 570 nm. Cardamonin được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Phần tế bào còn lại sau khi đã sử dụng được bổ sung dung dịch 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT, nồng độ 0,5 mg/ml pha trong đệm muối phosphat - PBS), ủ 4 giờ (37°C, CO₂ 5%). Hút bỏ hoàn toàn môi trường trên bề mặt, thu tinh thể formazan được hình thành, hoà tan vào isopropanol rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm [12]. Tính toán: % ức chế sinh NO (%UC), khả năng sống sót của tế bào ở nồng độ ban đầu của mẫu thử (%CS) theo các công thức bên dưới. Nồng độ ức chế 50% được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm, giá trị IC₅₀ được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 5.0.

$$\%UC = [X_{\text{b}}(\text{mẫu thử}) - X_{\text{b}}(\text{LPS})] / [X_{\text{b}}(\text{control}) - X_{\text{b}}(\text{LPS})] \times 100\%$$

trong đó X_b: nồng độ NO trung bình, được tính toán dựa vào đường chuẩn NaNO₂.

$$\%CS = \left[\frac{A(\text{mẫu thử}) - A(\text{mẫu thử ngày 0})}{A(\text{DMSO}) - A(\text{DMSO ngày 0})} \times 100 \right] \pm \sigma$$

trong đó A (mẫu thử): độ hấp thụ UV-VIS của mẫu thử tại thời điểm 24 giờ tính từ lúc xử lý tế bào với LPS và chất thử; A (mẫu thử ngày 0): độ hấp thụ UV-VIS của mẫu thử tại thời điểm 0 giờ tính từ lúc xử lý tế bào với LPS và chất thử; A (DMSO): độ hấp thụ UV-VIS của dung môi DMSO thời điểm 24 giờ tính từ lúc xử lý tế bào với LPS và chất thử; A (DMSO ngày 0): độ hấp thụ UV-VIS của dung môi DMSO thời điểm 0 giờ tính từ lúc xử lý tế bào với LPS và chất thử; σ : độ lệch chuẩn.

Phương pháp đánh giá hoạt tính bắt gốc tự do DPPH: Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1 mM trong methanol (MeOH). Dung dịch này không bền với ánh sáng nên chỉ pha trước khi dùng. Dung dịch thử: lấy mẫu pha trong MeOH theo bảng 1. Dung dịch chứng dương: acid ascorbic 1 mM. Lắc đều các ống trong 15 giây, để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và đo độ hấp thụ UV-VIS ở bước sóng 517 nm. Hoạt tính chống oxy hoá (%UC) được tính theo công thức sau [13]:

$$\%UC = [(A_{\text{chứng âm}} - A_{\text{thử}}) / (A_{\text{chứng âm}} - A_{\text{trắng}})] \times 100\%$$

trong đó A là độ hấp thụ UV-VIS ở bước sóng 517 nm.

Bảng 1. Thành phần các mẫu trắng, mẫu chứng, mẫu thử.

Mẫu	Dung dịch thử (ml)	MeOH (ml)	Dung dịch DPPH (ml)	Dung dịch acid ascorbic (ml)
Trắng	0	4	0	0
Chứng âm	0	3,5	0,5	0
Chứng dương	0	3	0,5	0,5
Thử	0,5	3	0,5	0

3. Kết quả

3.1. So sánh hoạt tính sinh học của cao ethanol 96 và 50%

Hoạt tính ức chế sản sinh NO và dập tắt gốc DPPH của 2 cao ethanol có nồng độ khác nhau được sàng lọc ở 2 nồng độ 100 µg/ml (nồng độ cao) và 30 µg/ml (nồng độ thấp). Kết quả ở bảng 2 và 3 cho thấy, cao ethanol 50% có tiềm năng hơn cao ethanol 96%.

Bảng 2. Hoạt tính ức chế NO của cao ethanol 96 và 50%.

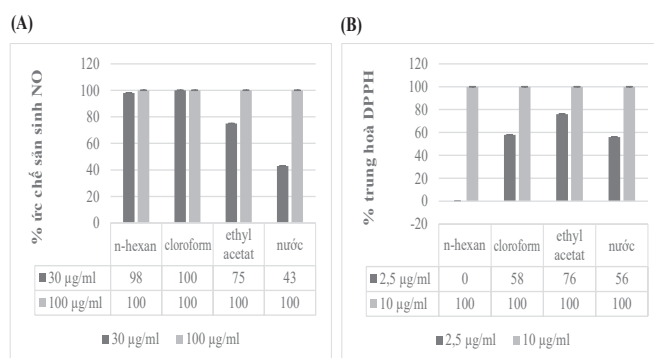
Mẫu	Hoạt tính ức chế sản sinh NO (%)		% CS
	30 µg/ml	100 µg/ml	
Cao EtOH 50%	56,0±13,0	91,0±6,0	92,0±5,0
Cao EtOH 96%	45,0±9,0	61,0±4,0	92,2±3,0

Bảng 3. Hoạt tính bắt gốc DPPH của cao ethanol 96 và 50%

Mẫu	Hoạt tính bắt gốc DPPH (%)	
	2,5 µg/ml	10 µg/ml
Cao EtOH 50%	71,1±1,7	68,0±3,5
Cao EtOH 96%	29,0±4,0	51,0±2,3

3.2. Hoạt tính sinh học của các cao phân đoạn

Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các cao phân đoạn được sàng lọc trước tiên ở 2 nồng độ 100 µg/ml (nồng độ cao) và 30 µg/ml (nồng độ thấp) (hình 1A), các cao có hoạt tính ức chế (%UC) trên 50% được xác định giá trị IC₅₀. Tương tự, hoạt tính bắt gốc DPPH được sàng lọc trước tiên ở 2 nồng độ 10 µg/ml (nồng độ cao) và 2,5 µg/ml (nồng độ thấp) (hình 1B), các cao có hoạt tính ức chế (%UC) trên 50% được xác định giá trị IC₅₀.



Hình 1. Kết quả sàng lọc hoạt tính của các dịch chiết phân đoạn. (A) Khả năng ức chế sản sinh NO (%); **(B)** Khả năng bắt gốc DPPH (%).

Theo hình 1A, khả năng ức chế sinh NO thể hiện rõ ở các phân đoạn chloroform, n-hexan và ethyl acetat. Cụ thể ở nồng độ 100 µg/ml, các cao này thể hiện khả năng ức chế tuyệt đối và ở nồng độ 30 µg/ml, khả năng ức chế giảm dần theo thứ tự: chloroform (100%) > n-hexan (98%) > ethyl acetat (75%). Trong 3 phân đoạn trên, n-hexan gây độc tế bào khá mạnh nên dừng khảo sát, chỉ tìm giá trị IC₅₀ của cao chloroform và ethyl acetat. Giá trị IC₅₀ của cao chloroform và ethyl acetat lần lượt là 17,80±0,40 và 19,57±1,10 µg/ml, so với chứng dương cardamonin là 2,88±0,02 µg/ml (bảng 4). Kết quả này cho thấy, các cao chloroform và ethyl acetat có tiềm năng để phân lập hợp chất tự nhiên có hoạt tính ức chế sản sinh NO.

Bảng 4. Hoạt tính ức chế sản sinh NO và giá trị IC₅₀ của cao chloroform và ethyl acetat.

Mẫu	Hoạt tính ức chế sản sinh NO (%)				IC ₅₀ (µg/ml)	% CS
Cao CHCl ₃	3 µg/ml	6,25 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	17,80±0,40	97,3±1,3
	20,1±9,0	30,0±5,0	50,0±2,9	91,0±1,2		
Cao EtOAc	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	19,57±1,10	118,1±5,5
	41,1±5,0	58,0±3,0	83,0±4,9	83,1±1,1		
Cardamonin					2,88±0,02	117,1±11,0

Tương tự, trong hình 1B, ở nồng độ 2,5 µg/ml, phân đoạn có hoạt tính trung hoà DPPH tốt nhất là ethyl acetat (%UC=76), các phân đoạn còn lại có hoạt tính vừa và yếu. Giá trị IC₅₀ của phân đoạn là 0,03±0,00 µg/ml, so với chứng dương acid ascorbic là 0,01±0,00 µg/ml (bảng 5). Như vậy, phân đoạn ethyl acetat khả năng cao chứa thành phần chống oxy hoá mạnh.

Bảng 5. Khả năng bắt gốc DPPH và giá trị IC₅₀ của cao ethyl acetat.

Mẫu	Khả năng bắt gốc DPPH (%)				IC ₅₀ (µg/ml)
Cao EtOAc	0,0015 µg/ml	0,005 µg/ml	0,015 µg/ml	0,05 µg/ml	0,03±0,00
	18,8±3,0	41,7±0,0	41,5±0,0	59,8±2,4	
Acid ascorbic	0,01±0,00				

3.3. Quy trình phân lập các hợp chất từ cao cloroform và cao ethyl acetat

Cao cloroform (35,0 g) được phân tách bằng sắc ký cột với pha tĩnh silica gel, pha động là hệ dung môi gradient có độ phân cực tăng dần CHCl_3 -EtOAc (100:0→20:80) thu được 10 phân đoạn (P1-P10). Từ phân đoạn P2 thu được chất rắn **1** (12,2 mg) sau khi kết tinh lại nhiều lần với MeOH. Phân đoạn P3 (16,5 g) được phân tách qua cột silica gel kết hợp với pha động là hệ dung môi gradient có độ phân cực tăng dần CHCl_3 -EtOAc (100:0→50:50) thu được 9 phân đoạn (P3.1-P3.9). Từ phân đoạn P3.3 thu được tinh thể **2** (12,1 mg) sau khi kết tinh lại nhiều lần với MeOH. Tinh chế phân đoạn P3.4 (333,0 mg) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi gradient có độ phân cực tăng dần n -hexan-EtOAc (100:0→10:90), kết hợp với kết tinh phân đoạn, thu được chất rắn **4** (11,6 mg). Phân đoạn P4 (910,0 mg) tinh chế qua sắc ký cột rây phân tử Sephadex LH-20 với pha động là MeOH thu được chất **3** (13,2 mg).

Sắc ký cột cao ethyl acetat (4,3 g) với pha tĩnh silica gel, pha động là hệ gradient EtOAc-MeOH (100:0→90:10) thu được 6 phân đoạn (E1-E6). Phân đoạn E3 được tinh chế bằng cách kết tinh lại nhiều lần trong MeOH, thu được chất rắn **5** (9,3 mg). Bằng cách tương tự, chất rắn **6** (6,2 mg) được cô lập từ phân đoạn E4.

3.4. Dữ liệu phổ NMR và MS của các chất phân lập được

Acid pentadecanoic (**1**): Bột vô định hình, màu trắng. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ_H 2,34 (2H, *t*, $J=7,5$ Hz, H-2), 1,66 (2H, *m*, H-3), 1,26 (22H, *s*, H-4→H-14), 0,88 (3H, *t*, $J=7,0$ Hz, H-15) [14]. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) δ_C 178,9 (C-1), 14,1 (C-2), 22,7 (C-3), 24,7 (C-4), 29,1 (C-5), 29,2 (C-6), 29,4 (C-7), 29,4 (C-8), 29,6 (C-9), 29,6 (C-10), 29,6 (C-11), 29,7 (C-12), 29,7 (C-13), 31,9 (C-14), 33,9 (C-15) [14]. LC-ESI-MS [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (264,8, 4%).

Lupeol (**2**): Tinh thể hình kim, màu trắng. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ_H 3,19 (1H, *dd*, $J=11,5$, 4,8 Hz, H-3), 1,92 (1H, *ddd*, $J=13,7$, 10,4, 8,4 Hz, H-13), 2,37 (1H, *td*, $J=11,1$, 5,8 Hz, H-19), 0,94 (3H, *s*, H-23), 0,76 (3H, *s*, H-24), 0,83 (3H, *s*, H-25), 1,03 (3H, *s*, H-26), 0,97 (3H, *s*, H-27), 0,79 (3H, *s*, H-28), 4,69 (1H, *d*, $J=2,5$ Hz, H-29- α), 4,56 (1H, *dq*, $J=2,8$, 1,4 Hz, H-29- β), 1,68 (3H, *s*, H-30) [15]. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) δ_C 38,7 (C-1), 27,4 (C-2), 79,0 (C-3), 38,8 (C-4), 55,3 (C-5), 18,3 (C-6), 34,3 (C-7), 40,8 (C-8), 50,4 (C-9), 37,1 (C-10), 20,9 (C-11), 25,1 (C-12), 38,0 (C-13), 42,8 (C-14), 27,4 (C-15), 35,5 (C-16), 43,0 (C-17), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 151,1 (C-20), 29,8 (C-21), 40,0 (C-22), 28,0 (C-23), 15,9 (C-24), 18,0 (C-25), 16,1 (C-26), 14,5 (C-27), 15,3 (C-28), 109,3 (C-29), 19,3 (C-30) [15]. LC-ESI-MS [$\text{M} + 3\text{H}$] $^{3+}$ (429,4, 5%).

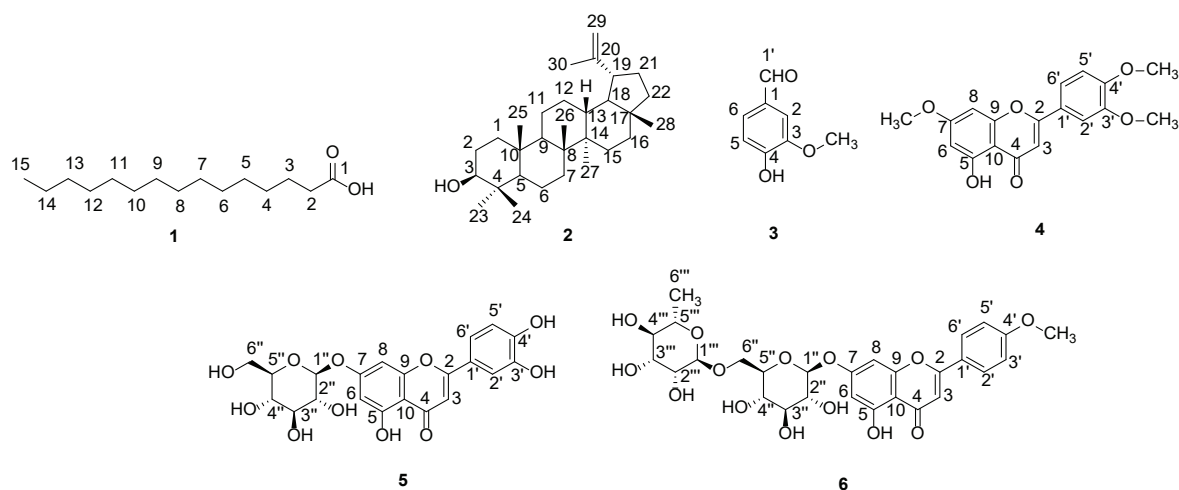
Vanillin (**3**): Tinh thể hình kim, màu trắng. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ_H 7,43 (1H, *m*, H-2), 7,42 (1H, *t*, $J=1,9$ Hz, H-5), 7,04 (1H, *d*, $J=8,4$ Hz, H-6), 9,83 (1H, *s*, H-1'), 6,20 (1H, *s*, 4-OH), 3,97 (3H, *s*, 3-OCH $_3$) [16]. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) δ_C 130,0 (C-1), 108,8 (C-2), 147,2 (C-3), 151,7 (C-4), 127,5 (C-5), 114,4 (C-6), 190,8 (C-1'), 56,1 (3-OCH $_3$) [16]. LC-ESI-MS [$\text{M} + \text{K} + \text{H}$] $^+$ (191,9, 5%).

5-hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone (**4**): Bột vô định hình, màu vàng. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ_H 6,59 (1H, *s*, H-3), 12,79 (1H, *s*, 5-OH), 6,50 (1H, *d*, $J=2,3$ Hz, H-6/H-8), 6,38 (1H, *d*, $J=2,3$ Hz, H-8/H-6), 7,35 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-2'), 6,98 (1H, *d*, $J=8,5$ Hz, H-5'), 7,53 (1H, *dd*, $J=8,5$, 2,2 Hz, H-6'), 3,99 (3H, *s*, 4'-OCH $_3$), 3,97 (3H, *s*, 3'-OCH $_3$), 3,89 (3H, *s*, 7-OCH $_3$) [17]. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) δ_C 164,0 (C-2), 104,6 (C-3), 182,4 (C-4), 162,3 (C-5), 92,7 (C-6), 165,5 (C-7), 98,1 (C-8), 157,7 (C-9), 105,6 (C-10), 123,9 (C-1'), 108,9 (C-2'), 149,4 (C-3'), 141,7 (C-4'), 111,3 (C-5'), 120,2 (C-6'), 56,2 (4'-OCH $_3$), 56,1 (3'-OCH $_3$), 55,8 (7-OCH $_3$) [17, 18]. LC-ESI-MS [$\text{M} + \text{K}$] $^+$ (367,4, 3%).

Luteolin-7-*O*- β -D-glucoside (**5**): Bột vô định hình, màu vàng. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ_H 6,72 (1H, *s*, H-3), 12,98 (1H, *s*, 5-OH), 6,79 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-6/H-8), 6,42 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-8/H-6), 7,42 (1H, *d*, $J=2,3$ Hz, H-2'), 6,90 (1H, *d*, $J=8,4$ Hz, H-5'), 7,45 (1H, *dd*, $J=8,4$, 2,3 Hz, H-6'), 5,05 (1H, *d*, $J=7,6$ Hz, H-1''), 3,72 (1H, *dd*, $J=11,7$, 1,9 Hz, H-2''), 3,45 (1H, *m*, H-3''), 3,46 (1H, *m*, H-4''), 3,26 (2H, *m*, H-6''), 3,17 (1H, *m*, H-5'') [19]. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 151 MHz) δ_C 164,3 (C-2), 103,0 (C-3), 181,7 (C-4), 160,9 (C-5), 99,4 (C-6), 162,8 (C-7), 94,5 (C-8), 156,8 (C-9), 105,2 (C-10), 121,2 (C-1'), 113,4 (C-2'), 145,6 (C-3'), 149,8 (C-4'), 115,8 (C-5'), 119,0 (C-6'), 99,7 (C-1''), 72,9 (C-2''), 77,0 (C-3''), 69,4 (C-4''), 76,2 (C-5''), 60,4 (C-6'') [19]. LC-ESI-MS [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (m/z 447,2, 100%).

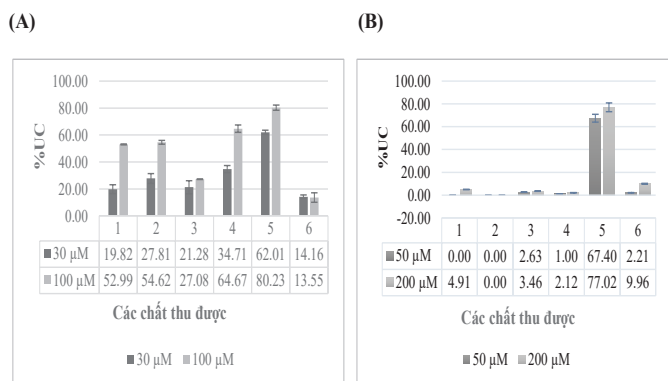
Acacetin-7-*O*- β -D-rutinoside (**6**): Bột vô định hình, màu vàng. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ_H 6,93 (1H, *s*, H-3), 12,89 (1H, *s*, 5-OH), 6,78 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-6/H-8), 6,45 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-8/H-6), 8,04 (2H, *d*, $J=9,1$ Hz, H-2' & H-6'), 7,14 (2H, *d*, $J=9,1$ Hz, H-3' & H-5'), 3,85 (3H, *s*, 4'-OCH $_3$), 5,05 (1H, *d*, $J=7,4$ Hz, H-1''), 4,42 (1H, *d*, $J=6,1$ Hz, H-1'''), 3,66-3,14 (9H, *m*, H-2'' → H-6'' & H-2''' → H-5'''), 1,07 (3H, *d*, $J=6,2$ Hz, H-6''') [20]. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 151 MHz) δ_C 164,0 (C-2), 103,8 (C-3), 182,1 (C-4), 161,2 (C-5), 99,7 (C-6), 157,0 (C-7), 94,8 (C-8), 163,0 (C-9), 105,5 (C-10), 122,7 (C-1'), 128,5 (C-2'), 114,7 (C-3'), 162,5 (C-4'), 114,7 (C-5'), 128,5 (C-6'), 100,0 (C-1''), 73,1 (C-2''), 76,3 (C-3''), 69,6 (C-4''), 68,3 (C-5''), 66,1 (C-6''), 100,5 (C-1'''), 70,8 (C-2'''), 70,4 (C-3'''), 72,1 (C-4'''), 75,7 (C-5'''), 17,8 (C-6'''), 55,6 (4'-OCH $_3$) [20]. LC-ESI-MS [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (m/z 614,1, 8%).

Công thức cấu tạo của các hợp chất (**1**→**6**) được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Công thức cấu tạo của các hợp chất (1→6) phân lập được từ cao chloroform và cao ethyl acetat.

3.5. Hoạt tính sinh học của các chất phân lập được



Hình 3. Kết quả sàng lọc hoạt tính của các chất. (A) Khả năng ức chế sản sinh NO (%); (B) Khả năng ức chế gốc tự do DPPH (%).

Kết quả sàng lọc (hình 3) cho thấy, (5) là chất có hoạt tính ức chế sản sinh NO mạnh, đồng thời cũng là chất duy nhất có hoạt tính chống oxy hoá mạnh. Về khả năng ức chế sinh NO, giá trị IC_{50} của 5 là $13,86 \pm 1,10 \mu M$, so với chứng dương là cardamonin có $IC_{50} = 0,93 \pm 0,04 \mu M$ (bảng 6). Về khả năng bắt gốc DPPH, giá trị IC_{50} của 5 là $26,93 \pm 0,10 \mu M$, so với chứng dương là acid ascorbic có $IC_{50} = 0,03 \pm 0,00 \mu M$ (bảng 7).

Bảng 6. Khả năng ức chế sản sinh NO và giá trị IC_{50} của chất (5).

Mẫu	Khả năng ức chế sản sinh NO (%)					IC_{50} (μM)	% CS
	12,5 μM	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM		
(5)	45,5 $\pm$ 6,0	68,5 $\pm$ 1,6	75,8 $\pm$ 1,0	81,9 $\pm$ 5,5	86,5 $\pm$ 4,2	13,86 $\pm$ 1,10	110,3 $\pm$ 7,5
Cardamonin						0,93 $\pm$ 0,04	117,1 $\pm$ 2,1

Bảng 7. Khả năng bắt gốc DPPH và giá trị IC_{50} của chất (5).

Mẫu	Khả năng bắt gốc DPPH (%)					IC_{50} (μM)
	12,5 μM	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM	
(5)	33,5 $\pm$ 0,2	46,5 $\pm$ 0,4	67,4 $\pm$ 0,2	75,6 $\pm$ 1,2	80,0 $\pm$ 1,2	26,93 $\pm$ 0,10
Acid ascorbic						0,03 $\pm$ 0,00

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chất (5) có hoạt tính ức chế sản sinh NO tương đối mạnh ($IC_{50} = 13,86 \pm 1,10 \mu M$), song còn yếu hơn chứng dương. Bên cạnh đó, chỉ có (5) thể hiện hoạt tính dập tắt gốc DPPH trung bình ($IC_{50} = 26,93 \pm 0,10 \mu M$). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu trước đây của S.Y. Wang và cs (2003) [8]. Chất (5) (luteolin-7-O- β -D-glucoside) là một chất chống oxy hoá và kháng viêm mạnh, điển hình cho dược liệu *L. indica*, lại có hàm lượng cao nên rất giàu tiềm năng sản xuất thực phẩm hỗ trợ sức khoẻ và hỗ trợ điều trị một số bệnh lý viêm. Trong nghiên cứu này, (1, 3, 4) và (6) là những chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *L. indica*. Bên cạnh đó, các tài liệu trước đây đã báo cáo về sự có mặt của chất (2) [21] và chất (5) [8] trong loài cây này.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã xác định được phân đoạn có tiềm năng kháng viêm và chống oxy hoá, đồng thời phân lập được các hợp chất mục tiêu, đặc biệt luteolin-7-O- β -D-glucoside là chất có cả hoạt tính kháng viêm và chống oxy hoá mạnh từ cây *L. indica*. Các kết quả này tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo, nhằm khai thác giá trị sử dụng của dược liệu này.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Phòng Thí nghiệm Y Dược cổ truyền, Khoa Y học cổ truyền, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh đã hỗ trợ một số thiết bị, máy móc cần thiết cho nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. MacMicking, Q.W. Xie, C. Nathan (1997), "Nitric oxide and macrophage function", *Annual Reviews of Immunology*, **15**, pp.323-350, DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323.
- [2] C. Nathan (1992), "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells", *FASEB J.*, **6**(12), pp.3051-3064, DOI: 10.1096/fasebj.6.12.1381691.
- [3] Q.W. Xie, H.J. Cho, J. Calaycay, et al. (1992), "Cloning and characterisation of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages", *Science*, **256**(5054), pp.225-228, DOI: 10.1126/science.1373522.
- [4] F. Ahmad, R.A. Khan, S. Rasheed (1992), "Study of analgesic and antiinflammatory activity from plant extracts of *Lactuca scariola* and *Artemisia absinthium*", *Journal of Islamic Academy of Sciences*, **5**(2), pp.111-114.
- [5] J.M. Kim, K.Y. Yoon (2014), "Comparison of polyphenol contents, antioxidant, and anti-inflammatory activities of wild and cultivated *Lactuca indica*", *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, **55**, pp.248-255, DOI: 10.1007/s13580-014-0132-4.
- [6] G. Pepe, E. Sommella, M. Manfra, et al. (2015), "Evaluation of anti-inflammatory activity and fast UHPLC-DAD-IT-TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *Maravilla de Verano*)", *Food Chemistry*, **167**, pp.153-161, DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.105.
- [7] M. Sayyah, N. Hadidi, M. Kamalinejad (2004), "Analgesic and antiinflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats", *Journal of Ethnopharmacology*, **92**(2-3), pp.325-329, DOI: 10.1016/j.jep.2004.03.016.
- [8] S.Y. Wang, H.N. Chang, K.T. Lin, et al. (2003), "Antioxidant properties and phytochemical characteristics of extracts from *Lactuca indica*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(5), pp.1506-1512, DOI: 10.1021/jf0259415.
- [9] Ministry of Health of Vietnam (2019), *Decision No. 3657/QĐ-BYT dated August 28, 2019 of The Ministry of Health Promulgating The List of 100 Medicinal Herbs with High Medical and Economic Value to Focus on. Development Center for The Period 2020-2030* (in Vietnamese).
- [10] D.H. Bich (2004), *Medicinal Plants and Medicinal Animals in Vietnam*, Science and Technology Publishing House, **1**, pp.235-237 (in Vietnamese).
- [11] D.T. Loi (2015), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Hong Duc Publishing House, pp.72-75 (in Vietnamese).
- [12] V. Dirsch, H. Stuppner, A.M. Vollmar (1998), "The Griess assay: Suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts?", *Planta Medica*, **64**(5), pp.423-426, DOI: 10.1055/s-2006-957473.
- [13] R. Amarowicz, R.B. Pegge, B. Barl, et al. (2004), "Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies", *Food Chemistry*, **84**(4), pp.551-562, DOI: 10.1016/S03088146(03)00278-4.
- [14] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, et al. (2008), "HMDB: A knowledgebase for the human metabolome", *Nucleic Acids Res.*, **37**(suppl_1), pp.D603-D610, DOI: 10.1093/nar/gkn810.
- [15] A.T.M. Silva, C.G. Magalhães, L.P. Duarte, et al. (2018), "Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and *in vitro* evaluation of cancer cell growth", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **53**(3), DOI: 10.1590/s217597902017000300251.
- [16] C.G. Floare, M. Bogdan, A. Pirnau (2009), "¹H NMR investigation of self-association of vanillin in aqueous solution", *Journal of Physics: Conference Series*, **182**, DOI: 10.1088/1742-6596/182/1/012002.
- [17] T. Nakanishi, J. Ogaki, A. Inada, et al. (1985), "Flavonoids of *Striga asiatica*", *Journal of Natural Products*, **48**(3), pp.491-493, DOI: 10.1021/np50039a027.
- [18] R. Tsunekawa, K. Katayama, K. Hanaya, et al. (2019), "Synthesis of 5-hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone and related compounds and elucidation of their reversal effects on BCRP/ABCG2-mediated anticancer drug resistance", *European Journal of Chemical Biology*, **20**(2), pp.210-220, DOI: 10.1002/cbic.201800431.
- [19] K.K. Chiruvella, A. Mohammed, G. Dampuri, et al. (2007), "Phytochemical and antimicrobial studies of methyl angolensate and luteolin-7-O-glucoside isolated from callus cultures of *Soymida febrifuga*", *International Journal of Biomedical Science*, **3**(4), pp.269-278.
- [20] J.C. Park, J.H. Lee, J.S. Choie (1995), "A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*", *Phytochemistry*, **39**(1), pp.261-262, DOI: 10.1016/0031-9422(94)00897-3.
- [21] M. Nitta, K. Azuma, K. Hata, et al. (2013), "Systemic and local injections of lupeol inhibit tumor growth in a melanoma-bearing mouse model", *Biomedical Reports*, **1**(4), pp.641-645, DOI: 10.3892/br.2013.116.

Tổng hợp và thử hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất 1,3-benzodioxole

Nguyễn Ngọc Phương Kiều, Vũ Thanh Thảo, Trần Ngọc Châu*

Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 141 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 4/8/2022; ngày chuyển phản biện 8/8/2022; ngày nhận phản biện 26/8/2022; ngày chấp nhận đăng 31/8/2022

Tóm tắt:

Trước tình trạng đề kháng kháng sinh ngày càng gia tăng hiện nay, việc nghiên cứu các khung cấu trúc mới có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn là rất cần thiết. Cấu trúc 1,3-benzodioxole với nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng là đối tượng chính của nghiên cứu này. Từ nguyên liệu piperonal, 5 dẫn chất mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole được tổng hợp bằng các phản ứng hóa học đa dạng khác nhau. Cấu trúc của sản phẩm được xác định bằng các phương pháp quang phổ. Hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán trong thạch trên 5 chủng vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* nhạy cảm methicillin (MSSA) và tụ cầu vàng đề kháng methicillin (MRSA). Dẫn chất base Schiff (2) thể hiện khả năng ức chế 4/5 chủng vi khuẩn thử nghiệm, trong đó có MRSA. Nghiên cứu dự đoán đích tác động và mô phỏng gắn kết *in silico* gợi ý khả năng gắn kết của chất (2) trên enzyme FabH của vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu gợi ý về sự phối hợp giữa nhóm base Schiff và khung 1,3-benzodioxole trong phát triển các chất kháng khuẩn mới.

Từ khóa: base Schiff, kháng khuẩn, 1,3-benzodioxole.

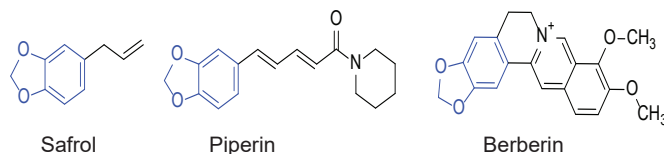
Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Thuốc kháng sinh giúp con người đẩy lùi các trường hợp nhiễm bệnh do vi khuẩn. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh không hợp lý lại gây ra nhiều cơ hội cho việc hình thành các chủng vi khuẩn đột biến, làm giảm hay mất hoàn toàn tác dụng của thuốc kháng sinh. Tình trạng đề kháng kháng sinh đang ngày càng gia tăng trên toàn thế giới, trong đó, Việt Nam được xem là một trong các quốc gia có tỷ lệ đề kháng kháng sinh cao. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), danh sách các cấu trúc kháng khuẩn đang được thử nghiệm lâm sàng và tiền lâm sàng trên toàn thế giới còn khá khiêm tốn và chưa đáp ứng được nhu cầu [1]. Hơn nữa, hầu hết các chất trong danh sách đều thuộc các nhóm khung cấu trúc đã biết với một số cơ chế đề kháng thuốc đã được báo cáo. Chính vì vậy, việc nghiên cứu và tìm kiếm các hợp chất mới có tác dụng kháng khuẩn là rất cần thiết.

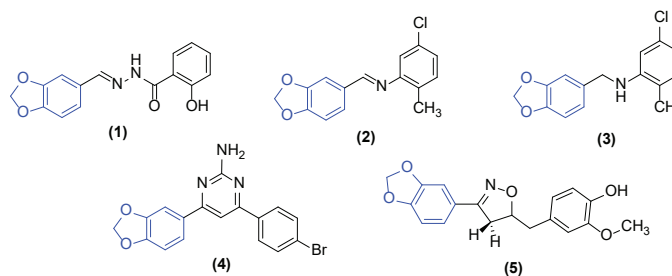
Khung 1,3-benzodioxole là một cấu trúc được tìm thấy rộng rãi trong các hợp chất tự nhiên với nhiều hoạt tính sinh học. Sự hiện diện của các chất này đóng vai trò quyết định tạo nên đặc điểm và công dụng của các loài thực vật. Ví dụ, hoạt chất piperin, thành phần tạo nên mùi vị của hạt tiêu (*Piper nigrum*), safrol có trong vỏ rễ cây xá xị (*Sassafras albidum*) và berberin trong cây vàng đắng (*Coscinium fenestratum* (Goetgh.) Colebr) chính là các hợp chất tự nhiên điển hình chứa khung cấu trúc này (hình 1). Đặc biệt, berberin được xem như một loại kháng sinh có nguồn gốc tự nhiên, hiện đang được dùng trong hơn 60 phối hợp thuốc lưu hành tại Việt Nam để điều trị các trường hợp nhiễm khuẩn đường ruột [2].

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



Hình 1. Một số hợp chất tự nhiên mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole.

Dựa trên giả thuyết là khung cấu trúc 1,3-benzodioxole có thể kết hợp với các nhóm cấu trúc tiềm năng [3-6], các dẫn chất (1)-(5) được thiết kế với ý tưởng kết hợp khung cấu trúc 1,3-benzodioxole với các nhóm chức *N*-acyl hydrazone (chất 1), nhóm base Schiff (chất 2), kết hợp với dẫn chất amin (chất 3), lai hóa với cấu trúc dị vòng 2-amino pyrimidin (chất 4), hoặc lai hóa với khung 2-isoxazoline (chất 5). Mục tiêu của nghiên cứu này là tổng hợp các cấu trúc mang khung 1,3-benzodioxole như hình 2 và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất này.



Hình 2. Cấu trúc các dẫn chất 1,3-benzodioxole được tổng hợp trong nghiên cứu.

Synthesise and test antibacterial activities of 1,3-benzodioxole derivatives

Ngoc Phuong Kieu Nguyen, Thanh Thao Vu,
Ngoc Chau Tran*

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

Received 4 August 2022; revised 26 August 2022; accepted 31 August 2022

Abstract:

Novel chemical entities are urgently needed to develop new antibacterial agents in order to tackle the increasing antibiotic resistance. This study focuses on the 1,3-benzodioxole scaffold with promising biological activities in the literature. Five 1,3-benzodioxole containing derivatives were synthesised from piperonal as starting material by various chemical reactions. Their structures were elucidated by standard spectroscopic methods. The *in vitro* antibacterial activities were studied by agar diffusion method against 5 pathogenic strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The Schiff base derivative (2) showed the ability to inhibit 4/5 tested strains, including MRSA. The target prediction study suggested the *in silico* binding ability of (2) on the bacterial FabH enzyme. These results demonstrated that novel 1,3-benzodioxole derivatives containing Schiff bases could be further studied as new antibacterial structures.

Keywords: antibacterial activity, Schiff base, 1,3-benzodioxole.

Classification number: 3.4

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên, vật liệu

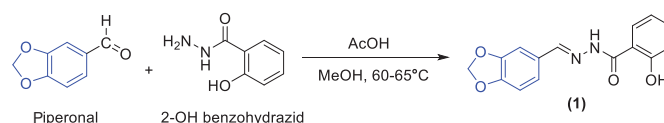
Tất cả nguyên liệu và dung môi dùng trong tổng hợp đạt mức độ tinh khiết dùng trong tổng hợp hóa học được mua từ các công ty: Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ), Merck (Đức), Acros Organics (Bi), ChemSol (Việt Nam), Guangdong Guanghua Sci-Tech Co Ltd. (Trung Quốc) và được sử dụng trực tiếp.

Nguyên, vật liệu dùng trong thử hoạt tính kháng khuẩn gồm: Tryptic soy agar (TSA), Mueller-Hinton agar (MHA) và Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Đức). Đã kháng sinh amikacin chuẩn được mua từ Công ty Thermo Scientific™ (Hoa Kỳ). Các chủng vi khuẩn dùng trong thử nghiệm đều đạt theo tiêu chuẩn American Type Culture Collection (ATCC).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

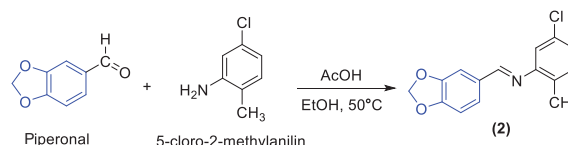
Phương pháp dự đoán *in silico* các thông số giống thuốc: Để đảm bảo các dẫn chất được thiết kế có thể tiếp tục phát triển thành phân tử thuốc mà không gặp trở ngại, một số thông số được, động học và tính chất giống thuốc được tính toán bằng máy chủ SwissADME [7].

Phương pháp tổng hợp các dẫn chất 1,3-benzodioxole các chất (1)-(5): Phương pháp tổng hợp dẫn chất *N*-acylhydrazone (chất 1) được thể hiện ở hình 3. 2-hydroxybenzohydrazide (0,36 g, 2,4 mmol) được hòa tan trong methanol (MeOH) (5 ml), sau đó thêm từ từ 5 ml dung dịch piperonal (0,3 g, 2 mmol) được pha trong MeOH. Phản ứng được xúc tác bằng acid acetic băng (AcOH) và khuấy, gia nhiệt ở 60-65°C đến khi hết nguyên liệu (theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng). Sản phẩm tạo thành ở dạng tủa trắng. Kết thúc phản ứng (sau khoảng 2 giờ), hỗn hợp được để nguội và làm lạnh để sản phẩm tủa hoàn toàn. Lọc và rửa tủa với MeOH. Sản phẩm thô được kết tinh lại trong ethanol (EtOH), thu được chất (1) với khối lượng 0,54 g (hiệu suất 95%).



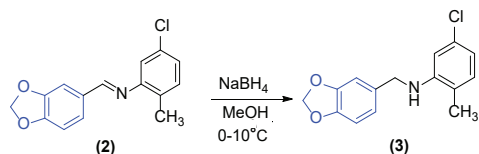
Hình 3. Phương pháp tổng hợp dẫn chất *N*-acylhydrazone (1).

Phản ứng ghép tổng hợp base Schiff (chất 2) được thể hiện ở hình 4. Hòa tan piperonal (1,5 g, 10 mmol) trong EtOH (10 ml). Sau đó thêm dẫn chất 5-cloro-2-methylanilin (1,7 g, 12 mmol) vào bình phản ứng. Thêm vào 3 giọt acid acetic băng và khuấy ở 50°C. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng đến khi không còn vết nguyên liệu. Phản ứng kết thúc sau 2 giờ và bình phản ứng được để nguội để sản phẩm kết tinh. Lọc và rửa tinh thể nhiều lần với EtOH. Sau đó kết tinh lại sản phẩm trong EtOH. Sấy khô thu được chất (2) với khối lượng 2,19 g (hiệu suất 80%).



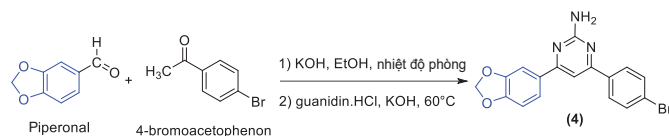
Hình 4. Phản ứng ghép tổng hợp dẫn chất base Schiff (2).

Phản ứng khử hóa base Schiff tạo amin (chất 3) được thể hiện ở hình 5. Hòa tan base Schiff (2) (0,27 g, 1 mmol) vào MeOH (10 ml). Làm lạnh bình cầu trong chậu đá và giữ lạnh (0°C) trong suốt quá trình phản ứng. Tiếp tục cho natri tetrahydroborat (NaBH₄) (0,38 g, 10 mmol). Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng đến khi không còn vết nguyên liệu. Phản ứng kết thúc sau 2 giờ. Cô quay dưới áp suất giảm để loại MeOH. Thêm nước vào bình phản ứng để hòa tan NaBH₄ dư. Lọc lấy phần tủa còn lại trong bình và rửa tủa nhiều lần với nước. Kết tinh lại sản phẩm trong EtOH, sấy khô thu được sản phẩm (3) với khối lượng 0,15 g (hiệu suất 55%).



Hình 5. Phản ứng khử hóa base Schiff tạo dẫn chất amin (3).

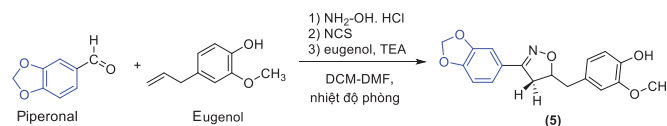
Phản ứng tổng hợp dẫn chất 2-amino pyrimidin (4) được thể hiện ở hình 6. Hòa tan piperonal (0,165 g, 1,1 mmol) trong 5 ml EtOH, tiếp tục thêm vào bình cầu 4-bromoacetophenon (0,2 g, 1,0 mmol) và 0,2 ml dung dịch KOH 50% trong EtOH. Hỗn hợp phản ứng được khuấy đều ở nhiệt độ phòng. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng đến khi hết nguyên liệu 4-bromoacetophenon (sau 2 giờ). Tiếp theo, cho dung dịch guanidin hydroclorid (0,11 g, 1,1 mmol) trong EtOH (5 ml) đã được điều chỉnh pH bằng KOH (0,11 g) đến pH 12 vào hỗn hợp phản ứng. Chalcon tan một phần trong hỗn hợp phản ứng tạo hỗn dịch màu vàng nhạt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy đều và gia nhiệt ở 60°C. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng (vết sản phẩm vừa tắt quang ở UV 254 nm, vừa phát quang ở UV 365 nm). Phản ứng kết thúc sau 16 giờ. Bình phản ứng được làm nguội về nhiệt độ phòng và cô tủa xuất hiện. Tủa được lọc và rửa với nước để hòa tan muối KCl. Sản phẩm được kết tinh lại trong EtOH thu được sản phẩm (4) với khối lượng 0,15 g (hiệu suất 41%).



Hình 6. Phản ứng tổng hợp dẫn chất 2-amino pyrimidin (4).

Phản ứng tổng hợp dẫn chất 2-isoxazoline (5) được thể hiện ở hình 7. Hòa tan piperonal (0,165 g, 1,1 mmol) trong hỗn hợp dung môi dicloromethan (DCM): *N,N*-dimethylformamid (DMF) (7,5:0,75 ml). Sau đó hydroxylamin hydroclorid (0,114 g, 1,65 mmol) được thêm vào hỗn hợp phản ứng và pH được điều chỉnh bằng KOH đến pH 12. Phản ứng được khuấy đều ở nhiệt độ phòng đến khi toàn bộ lượng piperonal được chuyển thành piperonaldoxim (theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng). Tiếp theo *N*-clorosuccinimid (NCS) (0,22 g, 1,65 mmol) được thêm từ từ vào hỗn hợp phản ứng. Sau 1 giờ khuấy đều ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, toàn bộ lượng piperonaldoxim đã được chuyển thành dẫn chất hydroxymoyl clorid tương ứng. Tiếp theo, eugenol (0,16 g, 1 mmol) được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Ngay sau đó, dung dịch 0,4 ml triethylamin (TEA) trong DCM (7,5 ml) được nhỏ từng giọt vào hỗn hợp phản ứng đang khuấy đều ở nhiệt độ phòng (tốc độ ~5 giọt/phút, tổng thời gian 60 phút). Hỗn hợp phản ứng được tiếp tục khuấy đều tại nhiệt độ phòng và theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng đến khi hết nguyên liệu và vết sản phẩm xuất hiện rõ. Hỗn hợp phản ứng được đổ vào bình lắng gạn chứa 20 ml nước cất và chiết lấy lớp DCM. Lớp dung môi hữu cơ được rửa lần lượt với 10 ml HCl 10% (1 lần) và 10 ml nước cất đến pH 7 (3 lần) và 15 ml dung dịch NaCl bão hòa trước khi làm khan bằng Na_2SO_4 khan. Pha hữu cơ sau đó được loại bỏ dung môi DCM dưới áp suất giảm

để tạo thành sản phẩm thô dạng chất rắn trắng ngà. Kết tinh lại sản phẩm thô trong EtOH thu được chất (5) với khối lượng 0,0436 g (hiệu suất 13%).



Hình 7. Phản ứng tổng hợp dẫn chất 2-isoxazoline (5).

Phương pháp xác định cấu trúc và độ tinh khiết: Cấu trúc của các chất tổng hợp được xác định và biện giải bằng các phương pháp phổ. Phổ hồng ngoại (IR) được đo bằng phương pháp phản xạ toàn phần suy giảm (Attenuated total reflectance - ATR) trên máy IRAffinity-1S (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Nhật Bản). Phổ khối (MS) được đo trên máy MSQ Plus™ single quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific™, Waltham, MA, Hoa Kỳ) bằng phương pháp ion hóa đầu phun điện tử (Electrospray ionization - ESI). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (^1H -NMR) được đo trên máy Bruker Avance với phổ tần số 400/500... (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, Hoa Kỳ). Phổ ^{13}C -NMR được đo trên cùng máy ở tần số tương ứng 100/125/150 MHz. Các từ viết tắt được sử dụng trong biện giải phổ ^1H -NMR: singlet (s), doublet (d), triplet (t), doublet of doublets (dd), doublet of triplet (dt), multiplet (m).

Các sản phẩm tổng hợp được kiểm tra độ tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel 60 GF254 (Merck 60F 254, Darmstadt, Đức) được quan sát dưới đèn UV nước sóng 254 nm kết hợp với biện giải kết quả phổ ^1H -NMR. Nhiệt độ nóng chảy được xác định trên máy Stuart SMP10 (Cole Palmer, Anh) với nhiệt kế không hiệu chỉnh.

Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng khuẩn: Hoạt tính kháng khuẩn được khảo sát trên 5 chủng vi khuẩn gây bệnh. Đại diện cho vi khuẩn gram âm là *E. coli* ATCC 25922 và *P. aeruginosa* ATCC 27853. Đại diện cho vi khuẩn gram dương gồm có *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) và *S. aureus* đề kháng methicilin ATCC 43300 (MRSA).

Các vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường thạch TSA, sau đó được nuôi cấy trên môi trường thạch Mueller-Hilton (MHA) khi tiến hành thử nghiệm. Môi trường MHA đã trải sẵn các chủng vi khuẩn được đục các lỗ tròn đường kính Ø7 mm bằng dụng cụ tiệt trùng. Chất thử được hòa tan trong DMSO để đạt nồng độ tương ứng là 5 và 2,5 mg/ml và cho vào mỗi lỗ một thể tích là 60 µl. Mỗi chất được thử tại 2 nồng độ tương đương với lượng chất thử trong mỗi lỗ lần lượt là 300 và 150 µg. Mẫu thử sau khi được cho vào các lỗ được để yên khoảng 15 phút cho các chất thử nghiệm khuếch tán vào lớp thạch. Sau đó, hộp thạch được ủ trong tủ ấm 37°C trong 24 giờ và đọc kết quả. Hoạt tính kháng khuẩn (nếu có) được thể hiện qua việc xuất hiện các vùng ức chế không có sự phát triển của vi khuẩn trên bề mặt đĩa thạch. Kết quả được xác định qua đường kính vùng ức chế được đo bằng thước đo đơn vị mm [8]. Trong các khảo sát này, DMSO (dung môi pha chất thử) được dùng như mẫu chứng âm và đĩa giấy kháng sinh amikacin 30 µg được dùng như mẫu chứng dương.

Chất thử có hoạt tính trong thử nghiệm sơ bộ được tiếp tục xác định nồng độ tối thiểu có khả năng ức chế sự mọc của vi khuẩn (Minimum inhibitory concentration - MIC). Chất thử được pha trực tiếp với môi trường thử nghiệm MHA tạo thành dải nồng độ như sau: 512, 256, 128, 64, 32, 16 và 8 µg/ml. Khi pha chất thử vào môi trường phải đảm bảo nồng độ DMSO nhỏ hơn 2,5%. Cho 2 µl huyền phù dịch vi khuẩn lên đĩa thạch đã được làm khô bề mặt với mật độ vi khuẩn trên thạch là 10^4 CFU/ml. Bùn thạch được để yên khoảng 15 phút để vết chấm khô sau đó được ủ trong tủ ẩm 37°C trong 24 giờ và đọc kết quả. Kết quả chỉ có giá trị khi vi khuẩn trong đĩa chứng (DMSO 2,5%) mọc bình thường. Đặt đĩa thạch trên một bề mặt sẫm màu, không phản xạ ánh sáng, quan sát sự tạo thành khóm của vi khuẩn thử nghiệm. Tìm đĩa có nồng độ thấp nhất ức chế hoàn toàn sự tạo khóm, nồng độ của đĩa thạch này được xác định là MIC của chất thử đối với vi khuẩn thử nghiệm [9, 10].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Dự đoán in silico các thông số giống thuốc của các dẫn chất

Theo kết quả dự đoán từ SwissADME, các dẫn chất (1)-(5) đều thỏa mãn Luật 5 Lipinski về điều kiện được dùng làm thuốc đường uống. Kết quả chi tiết được trình bày ở bảng 1. Ngoài ra, cả 5 chất đều được phân mềm dự đoán có thể được hấp thu tốt qua đường tiêu hóa. Từ các kết quả dự đoán trên, chúng tôi tiến hành tổng hợp 5 dẫn chất mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole như đã thiết kế.

Bảng 1. Kết quả các thông số giống thuốc được dự đoán từ SwissADME.

Chất	MW	MLogP	nHBA	nHBD	nRB	TPSA (Å ²)	Ro5	GI absorption
Yêu cầu	<500	≤4,15	≤10	≤5	≤10	<160	Thỏa	Cao
(1)	284,27	1,44	5	2	4	80,15	Thỏa	Cao
(2)	273,71	3,04	3	0	2	30,82	Thỏa	Cao
(3)	275,73	3,12	2	1	3	30,49	Thỏa	Cao
(4)	370,20	2,62	4	1	2	70,26	Thỏa	Cao
(5)	327,33	1,84	6	1	4	69,51	Thỏa	Cao

MW: molecular weight (khối lượng phân tử); MLogP: calculated lipophilicity (hằng số cân bằng thân dầu - thân nước); nHBA: number of hydrogen bond acceptor (số nhóm nhận liên kết hydro); nHBD: number of hydrogen bond donor (số nhóm cho liên kết hydro); nRB: number of rotatable bond (số liên kết có thể quay); TPSA: topological polar surface area (diện tích bề mặt phân cực topo); Ro5: thỏa theo Luật 5 Lipinski; GI absorption: khả năng hấp thu qua đường tiêu hóa.

3.2. Kết quả tổng hợp các dẫn chất mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole

Dẫn chất mang nhóm N-acylhydrazone (1): Tên IUPAC: (E)-N'-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmetylen)-2-hydroxybenzohydrazid; tính chất cảm quan: chất rắn dạng bột mịn, màu trắng; nhiệt độ nóng chảy: 276-278°C; tính tan: tan trong MeOH và EtOH ở nhiệt độ cao, không tan trong MeOH, EtOH và nước ở nhiệt độ thường; sắc ký lớp mỏng: $R_f=0,80$ [chloroform - acetone (9:1)]; $R_f=0,70$ [DCM - MeOH (9,5:0,5)]; $R_f=0,70$ [toluen - acetone (8:2)]; phổ IR (ATR, ν cm⁻¹): 3250,05 (ν_{OH}); 2887,44 ($\nu_{N=CH}$); 1624,06 ($\nu_{C=O}$); 1564,27 ($\nu_{C=N}$); 1446,61 ($\nu_{C=Ar}$); phổ ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11,90 (s, 1H, O-H); 11,77 (s, 1H, CONH), 8,38 (s, 1H, N=C-H), 7,89 (dd, 1H, $J=7,9$ Hz, $J=1,6$ Hz,

Ar-H), 7,44 (dt, 1H, $J=7,9$ Hz, $J=1,6$ Hz, Ar-H), 7,31 (d, 1H, $J=1,6$ Hz, Ar-H), 7,20 (dd, 1H, $J=8,0$ Hz, $J=1,6$ Hz, Ar-H), 7,02-6,93 (m, 3H, Ar-H), 6,11 (s, 2H, CH₂-benzodioxole); phổ MS (ESI): [M-H]⁻ dự kiến: 283,07, tìm thấy: 283,18; [M+H]⁺ dự kiến: 285,09, tìm thấy: 285,22. Kết quả phân tích cấu trúc phù hợp với tài liệu đã công bố [11].

Dẫn chất mang nhóm base Schiff (2): Tên IUPAC: (E)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-(5-cloro-2-methylphenyl) methanimin; tính chất cảm quan: tinh thể hình kim màu trắng ngà; nhiệt độ nóng chảy: 88-90°C; tính tan: tan nhiều trong DCM, chloroform, MeOH, EtOH, tan ít trong nước; sắc ký lớp mỏng: $R_f=0,60$ [*n*-hexan - acetone (15:2)]; $R_f=0,75$ [toluen - DCM (10:1)]; $R_f=0,70$ [*n*-hexan - ethyl acetat (10:1)]; phổ IR (ATR, ν cm⁻¹): 1622,13 ($\nu_{C=N}$), 1446,61 ($\nu_{C=C}$), phổ ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,20 (s, 1H, -CH=N-), 7,54 (d, $J=1,75$ Hz, 1H, Ar-H), 7,25 (dd, $J=8,0$ Hz, $J=1,65$ Hz, 1H, Ar-H), 7,12 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,06 (dd, $J=8,0$ Hz, $J=2,0$ Hz, 1H, Ar-H), 6,90 (d, $J=2,0$ Hz, 1H, Ar-H), 6,88 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 6,04 (s, 2H, CH₂-benzodioxole), 2,29 (s, 3H, CH₃); phổ ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 159,2, 151,9, 150,7, 148,5, 131,8, 131,2, 130,5, 128,6, 125,1, 117,8, 114,6, 108,2, 106,9, 101,7 (CH₂-benzodioxole); 17,3 (CH₃); phổ MS (ESI): [M(³⁵Cl) + H]⁺ dự kiến: 274,06, tìm thấy: 274,14; [M(³⁷Cl) + H]⁺ dự kiến: 276,06, tìm thấy: 276,30.

Dẫn chất mang nhóm amin (3): Tên IUPAC: N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-5-cloro-2-methylanilin; tính chất cảm quan: tinh thể hình kim màu trắng; nhiệt độ nóng chảy: 90-95°C; tính tan: tan trong DCM, chloroform, MeOH, EtOH, không tan trong nước; sắc ký lớp mỏng: $R_f=0,60$ [*n*-hexan - ethyl acetat (10:1)]; $R_f=0,80$ [toluen - DCM (6:1)]; $R_f=0,80$ [cyclohexan - MeOH (50:1)]; phổ IR (ATR, ν cm⁻¹): 3452,58 (ν_{N-H}), 1238,30 (ν_{C-N}); phổ ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,97 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 6,85-6,78 (m, 3H, Ar-H), 6,64 (dd, 1H, $J=8,0$ Hz, $J=2,0$ Hz, Ar-H), 6,56 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, Ar-H), 5,97 (s, 2H, CH₂-benzodioxole), 4,24 (d, 2H, $J=5,3$ Hz, NH-CH₂), 3,83 (t, $J=5,3$ Hz, 1H, NH), 2,10 (s, 3H, CH₃); phổ ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 148,0, 147,0, 146,9, 132,7, 132,6, 130,8, 120,7, 120,2, 116,8, 109,9, 108,4, 108,0, 101,1 (CH₂-benzodioxole); 48,0 (-NH-CH₂-); 17,0 (CH₃); phổ MS (ESI): [M-H]⁺ dự kiến: 274,06, tìm thấy: 274,20.

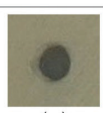
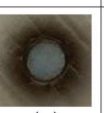
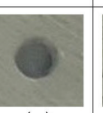
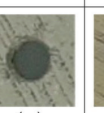
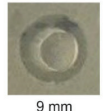
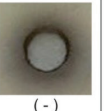
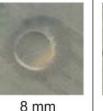
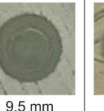
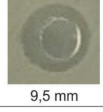
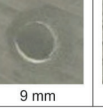
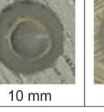
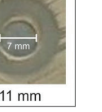
Dẫn chất chứa khung 2-amino pyrimidin (4): Tên IUPAC: 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-6-(4-bromophenyl)pyrimidin-2-amin; tính chất cảm quan: chất rắn dạng bột mịn, màu trắng ngà; nhiệt độ nóng chảy: 90-95°C; tính tan: tan trong MeOH, EtOH, DCM, không tan trong nước; sắc ký lớp mỏng: $R_f=0,10$ [toluen - DCM (1:2)]; $R_f=0,70$ [toluen - MeOH (15:1)]; $R_f=0,80$ [cyclohexan - MeOH (50:1)]; phổ IR (ATR, ν cm⁻¹): 3495,01 và 3305,99 (ν_{N-H}); 1633,71 ($\nu_{C=N}$), 1249,87 (ν_{C-N}); phổ ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8,18 (d, 2H, $J=8,7$ Hz, Ar-H), 7,86-7,81 (m, 2H, Ar-H), 7,72-7,70 (m, 2H, Ar-H), 7,68 (s, 1H, pyrimidin-H), 7,04 (d, 1H, $J=8,2$ Hz, Ar-H), 6,72 (s, 2H, NH₂), 6,11 (s, 2H, CH₂-benzodioxole); phổ ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 164,8, 164,3, 163,9, 149,8, 148,3, 137,1, 132,0, 131,8, 129,5, 124,5, 122,2, 108,7, 107,4, 102,0, 101,6 (CH₂-benzodioxole); phổ MS (ESI): [M+H]⁺ dự kiến: 370,02, tìm thấy: 369,97.

Dẫn chất chứa khung 2-isoxazoline (5): Tên IUPAC: 4-((3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)methyl)-2-methoxy phenol; tính chất cảm quan: tinh thể hình kim màu trắng; nhiệt độ nóng chảy: 124-126°C; tính tan: tan trong DCM, ít tan trong EtOH, không tan trong nước; sắc ký lớp mỏng: $R_f=0,30$ [*n*-hexan - ethyl acetat (7:3)]; $R_f=0,45$ [toluen - ethyl acetat (9:1)]; $R_f=0,20$ [toluen - DCM (9:1)]; phổ IR (ATR, ν cm⁻¹): 3533,59 (ν_{OH}), 2912,51 (ν_{C-H}), 1608,63, 1502,55, 1452,40, 1219,01, 1209,99, phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,25 (d, $J=1,7$ Hz, 1H, Ar-H), 6,99 (dd, $J=8,0$ Hz, $J=1,7$ Hz, 1H, Ar-H), 6,85 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 6,79 (dd, $J=8,0$ Hz, $J=2,0$ Hz, 2H, Ar-H), 6,72 (dd, $J=8,0$ Hz, $J=2,0$ Hz, 1H, Ar-H), 5,99 (s, 2H, CH₂-benzodioxole), 5,54 (brs, 1H, OH), 4,95-4,89 (m, 1H, CH₂-isoxazoline), 3,89 (s, 3H, CH₃-O-), 3,26 (dd, $J=16,5$ Hz, $J=10,2$ Hz, 1H, CH₂-isoxazoline), 3,06 (dd, $J=14,0$ Hz, $J=6,5$ Hz, 1H, -CH₂-), 2,98 (dd, $J=16,5$ Hz, $J=8,0$ Hz, 1H, CH₂-isoxazoline), 2,82 (dd, $J=14,0$ Hz, $J=6,5$ Hz, 1H, -CH₂-); phổ ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 156,1, 149,2, 148,1, 146,6, 144,5, 129,0, 124,0, 122,1, 121,4, 114,4, 112,0, 108,2, 106,4, 101,5 (CH₂-benzodioxole), 82,0, 56,0, 40,7, 39,6; phổ MS (ESI): [M+H]⁺ dự kiến: 328,12, tìm thấy: 328,21.

Dựa theo tra cứu trên SciFinder (2022) [12], ngoại trừ dẫn chất (1) có các kết quả phân tích phổ hoàn toàn phù hợp với tài liệu [11], các dẫn chất (2), (3), (4) và (5) đều là các dẫn chất mới hoàn toàn chưa được công bố. Kết quả phân tích cấu trúc phổ IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR và MS của các chất cho cấu trúc hoàn toàn phù hợp với dự kiến ban đầu. Điểm đặc biệt là khung cấu trúc 1,3-benzodioxole với nhóm CH₂ đặc trưng nằm giữa 2 nguyên tử oxy. Khi phân tích phổ ¹H-NMR, nhóm CH₂ này cho một đỉnh singlet 2H với độ dịch chuyển dao động trong khoảng từ 5,97 đến 6,11 ppm, tương ứng với một đỉnh nằm trong khoảng từ 101,1 đến 101,7 ppm khi phân tích phổ ¹³C-NMR. Độ tinh khiết của các chất tổng hợp được khảo sát sơ bộ bằng sắc ký lớp mỏng với 3 hệ dung môi khác nhau và không thấy vết lạ ngoài vết sản phẩm chính khi quan sát bản sắc ký lớp mỏng dưới đèn UV tại 2 bước sóng 254 và 365 nm. Ngoài ra, kết quả phân tích phổ ¹H-NMR của các chất đều không thấy các proton của tạp chất. Các kết quả phân tích trên sơ bộ cho thấy 5 dẫn chất tổng hợp phù hợp cho thử nghiệm sinh học.

3.3. Hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất 1,3-benzodioxole

Các chất tổng hợp (1)-(5) và nguyên liệu piperonal được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng cách đo đường kính vùng ức chế dựa theo phương pháp khuếch tán trong thạch [9]. 5 chủng vi khuẩn gây bệnh được dùng trong thử nghiệm gồm: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) và *S. aureus* đề kháng methicilin ATCC 43300 (MRSA). Thử nghiệm với chứng dương cho thấy, 5 chủng vi khuẩn đều còn nhạy với kháng sinh amikacin với đường kính vòng ức chế trên các vi khuẩn thử nghiệm lần lượt là: 22 mm (*E. coli*), 26 mm (*P. aeruginosa*), 9 mm (*E. faecalis*), 23 mm (MSSA) và 16 mm (MRSA). Kết quả trên nằm trong khoảng giới hạn kiểm soát chất lượng đối với phương pháp khuếch tán đĩa của các chủng vi sinh vật phát triển nhanh trên mẫu chứng dương amikacin [10]. Như vậy, các chủng vi sinh vật chuẩn sử dụng phù hợp cho thử nghiệm.

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	MSSA	MRSA
DMSO (chứng âm)	 (-)	 (-)	 (-)	 (-)	 (-)
Chất (2) (150 µg)	 9 mm	 (-)	 8 mm	 9,5 mm	 10 mm
Chất (2) (300 µg)	 9,5 mm	 (-)	 9 mm	 10 mm	 11 mm

(-): không có vòng ức chế.

Hình 8. Hoạt tính kháng khuẩn của dẫn chất (2) trên 5 chủng vi khuẩn thử nghiệm.

Trong kết quả thử nghiệm (hình 8), chứng âm (DMSO) không thể hiện đường kính vòng ức chế trên cả 5 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Điều này chứng tỏ kết quả thu được trong thử nghiệm là đáng tin cậy. Trong 5 chất được thử nghiệm, chỉ duy nhất dẫn chất base Schiff (2) thể hiện đường kính vòng ức chế trên 4 chủng vi khuẩn: *E. coli*, *E. faecalis*, MSSA và MRSA. Trong đó, đường kính vòng ức chế trên chủng *E. faecalis* là nhỏ nhất ở cả 2 nồng độ thử nghiệm (8-9 mm). Kết quả này tương tự với chứng dương amikacin.

Dẫn chất (2) ức chế sự phát triển trên cả chủng vi khuẩn gram âm (*E. coli*) và 3 chủng vi khuẩn gram dương (*E. faecalis*, MSSA và MRSA). Đặc biệt, trên chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh MRSA thì dẫn chất (2) không chỉ thể hiện được vòng ức chế mà đường kính của vòng này lớn nhất so với trên 3 chủng còn lại. Khi tăng lượng chất thử nghiệm (2) lên gấp đôi (từ 150 lên 300 µg) thì đường kính của vòng ức chế trên cả 4 chủng cũng tăng lên. Điều này có thể sơ bộ nhận định khả năng kháng khuẩn của dẫn chất (2) phụ thuộc vào nồng độ. Nồng độ ức chế tối thiểu của chất (2) được xác định và trình bày ở bảng 2. Kết quả được so sánh với mẫu chứng dương là kháng sinh amikacin.

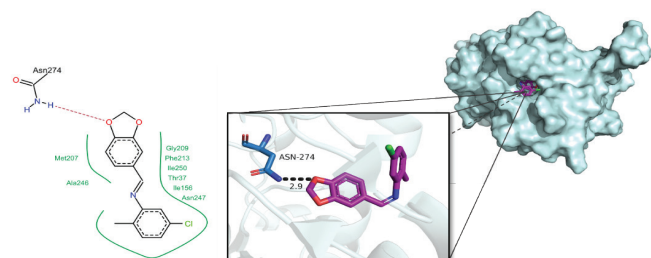
Bảng 2. Giá trị MIC của chất (2) trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm.

Chất thử	Giá trị MIC (µg/ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	MSSA	MRSA
Chất (2)	256	256	256	512
Amikacin	2	256	4	4

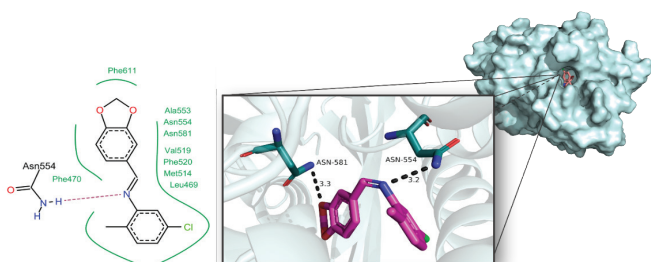
Dựa trên hoạt tính kháng khuẩn của dẫn chất (2), có thể khẳng định sự kết hợp giữa khung cấu trúc 1,3-benzodioxole và nhóm chức base Schiff góp phần vào khả năng ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn thử nghiệm. Điều khá thú vị là hoạt tính kháng khuẩn của chất (2) trên 4/5 chủng vi khuẩn thử nghiệm bao gồm cả vi khuẩn gram âm và gram dương. Hơn nữa, với khả năng ức chế trên cả chủng MRSA, đích tác động dự kiến của chất (2) có thể không liên quan cơ chế tác động của các kháng sinh nhóm β -lactam.

3.4. Dự đoán đích tác động của chất (2) trên vi khuẩn

Nhằm dự đoán đích tác động của dẫn chất (2) trên vi khuẩn, chúng tôi đã dựa vào hệ thống máy chủ trực tuyến Similarity Ensemble Approach (<https://sea.bkslab.org/>) [13]. Kết quả phân tích gợi ý chất (2) có hoạt tính tốt đối với enzyme FabH của *E. coli*. Đây là một enzyme cần thiết để tổng hợp acid béo ở vi khuẩn. Thật vậy, một số nghiên cứu về các chất ức chế FabH được công bố [14, 15] cho thấy, các một số chất ức chế FabH có cấu trúc khá tương đồng với dẫn chất base Schiff (2) trong nghiên cứu này. Nghiên cứu được tiếp tục thực hiện bằng việc mô phỏng *in silico* khả năng gắn kết của chất (2) vào một số cấu trúc protein FabH của *E. coli* (PDB-ID: 6X7R) và của *S. aureus* (PDB-ID: 6KVS) [16] bằng phần mềm Autodock Vina 1.1.2. [17]. Kết quả cho thấy, chất (2) có khả năng gắn kết trên khoang xúc tác của enzyme FabH trên cả 2 chủng vi khuẩn. Kết quả phân tích các tương tác trong khoang gắn kết của chất (2) và enzyme FabH được trình bày ở hình 9 (FabH của *E. coli*) và hình 10 (FabH của *S. aureus*).



Hình 9. Mô phỏng sự gắn kết của chất (2) vào enzyme FabH của *E. coli* (PDB-ID: 6X7R).



Hình 10. Mô phỏng sự gắn kết của chất (2) vào enzyme FabH của *S. aureus* (PDB-ID: 6KVS).

4. Kết luận

5 dẫn chất mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole kết hợp với các nhóm chức hóa học và khung cấu trúc đa dạng khác nhau đã được tổng hợp trong nghiên cứu này, 4 chất trong số đó có cấu trúc hoàn toàn mới theo tra cứu trên SciFinder. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn cho thấy, chất (2) với cấu trúc kết hợp giữa base Schiff và vòng 1,3-benzodioxole cho hoạt tính ở mức trung bình trên 4 chủng vi khuẩn bao gồm cả gram âm và gram dương, trong đó có chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh MRSA. Nghiên cứu dự đoán và mô phỏng tương tác *in silico* gợi ý về khả năng gắn kết của chất (2) đối với enzyme FabH của vi khuẩn. Các kết quả trên tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về nhóm cấu trúc base Schiff và 1,3-benzodioxole nhằm phát triển thành thuốc kháng sinh tiềm năng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organisation (2022), *2021 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis*, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655>, accessed 27 July 2022.
- [2] Drug Administration of Vietnam (2022), *Drug Bank*, <https://drugbank.vn>, accessed 27 July 2022.
- [3] L. Popiolek (2017), "Hydrazide-hydrazones as potential antimicrobial agents: Overview of the literature since 2010", *Med. Chem. Res.*, **26**(2), pp.287301, DOI: 10.1007/s00044-016-1756-y.
- [4] H.T.N. Phuong, T.N. Chau, L.N.H. Huyen, et al. (2014), "Synthesis and investigation of antibacterial activity of some Schiff bases and corresponding amine derivatives", *Journal Ho Chi Minh City Medicine*, **18**(2), pp.347-352 (in Vietnamese).
- [5] S. Prasad, V. Radhakrishna, T.K. Ravi (2019), "Synthesis, spectroscopic and antibacterial studies of some Schiff bases of 4-(4-bromophenyl)-6-(4-chlorophenyl)-2-aminopyrimidine", *Arab. J. Chem.*, **12**(8), pp.3943-3947, DOI: 10.1016/j.arabjc.2016.03.003.
- [6] N.B. Putarov, J.S. Cruz, E.M. Carvalho, et al. (2020), "Synthesis and bioactivity screening of dihydroisoxazoles derived from Eugenol", *Rev. Virtual Quim.*, **12**(2), pp.345-355, DOI: 10.21577/1984-6835.20200027.
- [7] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete (2017), "SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules", *Sci. Rep.*, **7**(1), DOI: 10.1038/srep42717.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*, 11th Ed. (M2-A11), **32**(1), 76pp.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute (2018), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th Ed., 13pp.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute (2021), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, M100-ed31, 31th Ed., 16pp.
- [11] T. Budiati, D.A. Stephanie, E.C. Widajakusuma (2012), "Rapid solvent-free microwave assisted synthesis of some n'-benzylidene salicylic acid hydrazides", *Indo. J. Chem.*, **12**(2), pp.163-166, DOI: 10.22146/ijc.21357.
- [12] SciFinder (2022), <https://scifinder.cas.org>, accessed 27 July 2022.
- [13] M.J. Keiser, B.L. Roth, B.N. Armbruster, et al. (2007), "Relating protein pharmacology by ligand chemistry", *Nat. Biotechnol.*, **25**(2), pp.197-206, DOI: 10.1038/nbt1284.
- [14] Y. Zhou, Q.R. Du, J.Sun, et al. (2013), "Novel Schiff-base-derived FabH inhibitors with dioxxygenated rings as antibiotic agents", *ChemMedChem*, **8**(3), pp.433-441, DOI: 10.1002/cmdc.201200587.
- [15] X. Zhang, C.B. Sangani, L.X. Jia, et al. (2014), "Synthesis and antibacterial evaluation of novel Schiff's base derivatives of nitroimidazole nuclei as potent *E. coli* FabH inhibitors", *RSC Adv.*, **4**(97), pp.54217-54225, DOI: 10.1039/C4RA08567A.
- [16] RCSB Protein Data Bank (2022), RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB), <https://www.rcsb.org/>, accessed 3 March 2022.
- [17] O. Trott, A.J. Olson (2010), "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading", *J. Comput. Chem.*, **31**(2), pp.455-461, DOI: 10.1002/jcc.21334.

Xây dựng quy trình định lượng đồng thời 2 hợp chất phenol orcinol glucoside và curculigoside trong Sâm cau (*Curculigo orchoides*) bằng UPLC-PDA

Nguyễn Thị Ánh Nguyệt^{1*}, Nguyễn Huỳnh Thanh Tuyền¹, Lê Văn Huân², Trần Thị Vân Anh¹

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 141 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Dược, Trường Đại học Bình Dương, 504 đại lộ Bình Dương, phường Hiệp Thành, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

Ngày nhận bài 14/2/2023; ngày chuyển phản biện 17/2/2023; ngày nhận phản biện 6/3/2023; ngày chấp nhận đăng 10/3/2023

Tóm tắt:

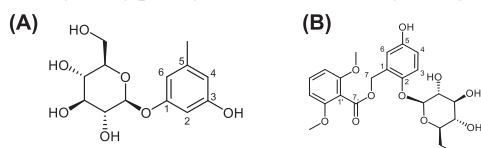
Ở Việt Nam, thân rễ Sâm cau (*Rhizoma curculiginis*) được dùng chữa ho, liệt dương, tử cung lạnh... Các hợp chất phenol tìm thấy trong Sâm cau được xem là thành phần có tác dụng chữa bệnh, tuy nhiên chuyên luận Sâm cau trong Dược điển Việt Nam hiện nay chưa có chỉ tiêu định lượng các thành phần phenol chính. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng quy trình định lượng đồng thời 2 hợp chất phenol orcinol glucoside (OG) và curculigoside (CG) trong Sâm cau bằng UPLC-PDA nhằm phục vụ việc tiêu chuẩn hóa dược liệu. Quy trình định lượng đồng thời OG và CG được thực hiện trên hệ thống Acquity UPLC-PDA (Waters), cột InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 (3,0x150 mm, 2,7 μ m). Quy trình định lượng được đánh giá theo hướng dẫn của Hội nghị quốc tế về hài hòa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (ICH). Quy trình định lượng OG và CG đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính ($R^2 > 0,999$), độ lặp lại trong ngày và liên ngày ($RSD < 2,0\%$), độ đúng của phương pháp có tỷ lệ phục hồi OG là 97,08-103,60% và CG là 100,28-111,25. 6 mẫu Sâm cau thu tại Sơn La, Lào Cai, Đắk Nông có hàm lượng OG và CG phụ thuộc vào vùng trồng và thời gian thu hái với OG là 0,36-1,301% và CG 0,041-0,123%.

Từ khóa: curculigoside, orcinol glucoside, sắc ký lỏng hiệu suất cao, Sâm cau.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Sâm cau là một cây thuốc được phân bố rộng rãi ở Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Malaysia, Nhật Bản và Úc [1]. Trong các bài thuốc cổ truyền, thân rễ Sâm cau thường dùng để chữa phong thấp, lưng lạnh đau, thần kinh suy nhược... [1]. Thành phần hoá học chính của thân rễ Sâm cau là các hợp chất phenol glycosid gồm OG và CG (A) [2, 3] (hình 1) có các tác dụng sinh học như chống loãng xương [2], chống trầm cảm, chống oxy hoá, tăng cường miễn dịch và cải thiện chứng loãng xương ở người già [4]. Ngoài ra, cùng với đặc tính sinh thái như dễ trồng, phát triển tốt với điều kiện khí hậu tại Việt Nam [1] nên Sâm cau được coi là loại dược liệu tiềm năng trong phòng và chữa bệnh trong tương lai.



Hình 1. Công thức cấu tạo của OG (A) và CG (B).

Dược liệu Sâm cau đã được đưa vào chuyên luận Dược điển của Trung Quốc, Hồng Kông, Việt Nam [5-7] và đưa mức chỉ tiêu chất lượng cho thân rễ Sâm cau dựa vào hàm lượng CG là chất điểm chỉ (marker) quan trọng cho định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Tuy nhiên, Dược điển Việt Nam V chỉ có chỉ tiêu định lượng về “hàm lượng chất chiết được trong dược liệu” [7]. Do đó, việc bổ sung chỉ tiêu hàm lượng bằng phương pháp hiện đại HPLC là cần thiết nhằm nâng cao tiêu chuẩn chất lượng cho Sâm cau và phù hợp với tiêu chuẩn của nhiều nước

trên thế giới. Nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của Sâm cau cho thấy, ngoài CG, OG cũng là một thành phần chính đáng chú ý [2, 4]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng quy trình định lượng đồng thời OG và CG trong Sâm cau bằng phương pháp UPLC-PDA phục vụ cho việc kiểm soát chất lượng và xây dựng tiêu chuẩn dược liệu cũng như các chế phẩm từ Sâm cau ở Việt Nam.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mẫu thân rễ Sâm cau tươi thu tại Sín Chéng, huyện Si Ma Cai, tỉnh Lào Cai vào tháng 3/2021 được rửa sạch, phơi khô, xay và rây làm nguyên liệu xây dựng quy trình định lượng. Mẫu được định danh thuộc loài *Curculigo orchoides* bằng cách phân tích trình tự gen *trnH-psbA* và *rps16*, được thực hiện bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Dược Sài Gòn (Sapharcen) thuộc Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh. 5 mẫu Sâm cau khác (thân rễ và rễ) thu hái tại Đắk Nông, Sơn La và Lào Cai tại các thời điểm khác nhau từ năm 2021 đến 2022, được dùng để định lượng so sánh hàm lượng của OG và CG theo quy trình đã xây dựng. Các mẫu được lưu tại Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh.

2.2. Các dung môi, hóa chất, thiết bị

Chất chuẩn gồm OG (98,57%, HPLC) và CG (99,02%, HPLC) được cung cấp bởi Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh. Các dung môi đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC gồm methanol (Scharlau, Tây Ban Nha), acid trifluoroacetic - TFA (Scharlau, Tây

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

Method development for the simultaneous quantification of orcinol glucoside and curculigoside in *Curculigo orchoides* by UPLC-PDA

Thi Anh Nguyet Nguyen^{1*}, Huynh Thanh Tuyen Nguyen¹,
Van Huan Le², Thi Van Anh Tran¹

¹Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City,

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

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

²Faculty of Pharmacy, Binh Duong University,

504 Binh Duong Avenue, Hiep Thanh Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong province, Vietnam

Received 14 February 2023; revised 6 March 2023; accepted 10 March 2023

Abstract:

In Vietnam, the rhizomes of *Curculigo orchoides* have been traditionally used for the treatment of cough, impotence, cold uterus, etc. The phenolic compounds were determined as active constituents of *C. orchoides*; however, there is no quantitative criterion for these compounds in *C. orchoides* in the Vietnamese Pharmacopoeia. Therefore, this study aimed to develop a simultaneous quantification method for orcinol glucoside (OG) and curculigoside (CG) by UPLC-PDA system, required for the standardisation of *C. orchoides* rhizome. The simultaneous quantification of OG and CG was performed on the Acquity UPLC-PDA (Waters) system, InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 (3,0×150 mm, 2.7 µm). The method was evaluated according to The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines. The quantitative analysis of OG and CG met all validation requirements, including system suitability, specificity, linearity ($R^2 > 0.999$), inter-day and intra-day precisions (RSD < 2.0%), accuracy with OG and CG recovery rate of 97.08-103.60 and 100.28-111.25, respectively. The contents of OG and CG in 6 samples of *Rhizoma curculiginis* collected in Son La, Lao Cai, and Dak Nong varied according to the growing region and harvest time with the yield of OG and CG 0.36-1.301 and 0.041-0.123%, respectively.

Keywords: *Curculigo orchoides*, curculigoside, orcinol glucoside, Ultra performance liquid chromatography.

Classification number: 3.4

Ban Nha), acetonitril - ACN (Merck, Đức) và acid formic - FA (J.T. Baker, Mỹ), nước cất 2 lần. Quy trình định lượng được xây dựng trên hệ thống Acquity UPLC-PDA (Waters) và cột InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 (3,0×150 mm, 2,7 µm).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát điều kiện sắc ký UPLC: Khảo sát bước sóng phát hiện được thực hiện trên mẫu chuẩn OG (200 µg/ml) và CG (200 µg/ml) pha trong ethanol 70%. Mẫu thử (2 g bột dược liệu/50 ml ethanol 70%) được khảo sát về điều kiện phân tách các pic định lượng trên hệ thống UPLC với thành phần pha động gồm các loại acid như FA, TFA và tỷ lệ của các acid với CAN, tốc độ dòng và

chương trình dung môi sao cho pic OG và CG đạt yêu cầu về các thông số sắc ký (%RSD của thời gian lưu và diện tích pic, hệ số bất đối xứng và độ phân giải).

Khảo sát quy trình chiết xuất dược liệu: Sử dụng phương pháp UPLC để khảo sát điều kiện chiết xuất mẫu thử (40 mg/ml trong ethanol 70%), bao gồm phương pháp chiết xuất (đun hồi lưu và siêu âm), dung môi (methanol 100 và 70%, ethanol 96, 70 và 50%), thời gian (15, 30, 45, 60, 75 và 90 phút), số lần chiết xuất được liệu (1, 2 và 3 lần) với thể tích dung môi chiết (10, 20 và 25 ml) để thu được hàm lượng của OG và CG đạt hiệu suất cao dựa trên việc so sánh diện tích đỉnh của các pic định lượng ở các điều kiện chiết xuất khác nhau trong cùng điều kiện phân tích.

Quy trình định lượng đồng thời OG và CG trong Sâm cau:

- Mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn vào bình định mức 10 ml, thêm ethanol 70%, siêu âm và bổ sung dung môi đến vạch để được 2 dung dịch chuẩn gốc (OG và CG) có nồng độ là 1 mg/ml. Từ các dung dịch này, pha dãy hỗn hợp chuẩn gồm 6 nồng độ có thành phần gồm OG (10, 50, 125, 250, 500 và 1000 µg/ml) và CG (5, 10, 50, 125, 250 và 500 µg/ml). Các dung dịch chuẩn này được lọc qua màng lọc PTFE 0,22 µm.

- Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu, thêm chính xác 20 ml ethanol 70%, đun hồi lưu trong 60 phút ở 95°C, để nguội và lọc qua bông vào bình định mức 25 ml. Tiếp tục chiết lần 2 với 5 ml dung môi ethanol 70% trong 30 phút ở cùng điều kiện như chiết lần 1, lọc qua gòn, rửa bã dược liệu và bông gòn sau khi lọc. Bổ sung ethanol 70% vừa đủ 25 ml trong bình định mức, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Điều kiện UPLC: Máy Acquity UPLC-PDA (Waters), đầu dò PDA, cột sắc ký InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 (3,0×150 mm, 2,7 µm), bước sóng phát hiện 220 nm (OG) và 283 nm (CG). Pha động gồm TFA 0,05% (A) và ACN (B). Chương trình dung môi gồm: 8-12% B (1 phút), 12-15% B (8 phút), 15-25% B (4 phút), 25-46% B (9 phút), 46-70% B (1 phút) (tổng 20 phút). Nhiệt độ cột 25°C, tốc độ dòng 0,3 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 3 µl.

Xác định hàm lượng (%) OG và CG: Tính hàm lượng của OG và CG trong dược liệu dựa vào diện tích pic của các hợp chất này trên sắc ký đồ của dung dịch thử, đường chuẩn đã lập của các chuẩn tương ứng của chúng. Cụ thể, hàm lượng của OG và CG được tính toán theo công thức sau:

$$X\% = \frac{St}{a} \times \frac{25}{m} \times p \times 100$$

trong đó St là diện tích pic của OG và CG trong mẫu thử (µV×s); a là hệ số phương trình hồi quy đường tuyến tính của chuẩn; p là độ tinh khiết của chất chuẩn %; m là khối lượng cân của mẫu thử đã trừ độ ẩm (mg).

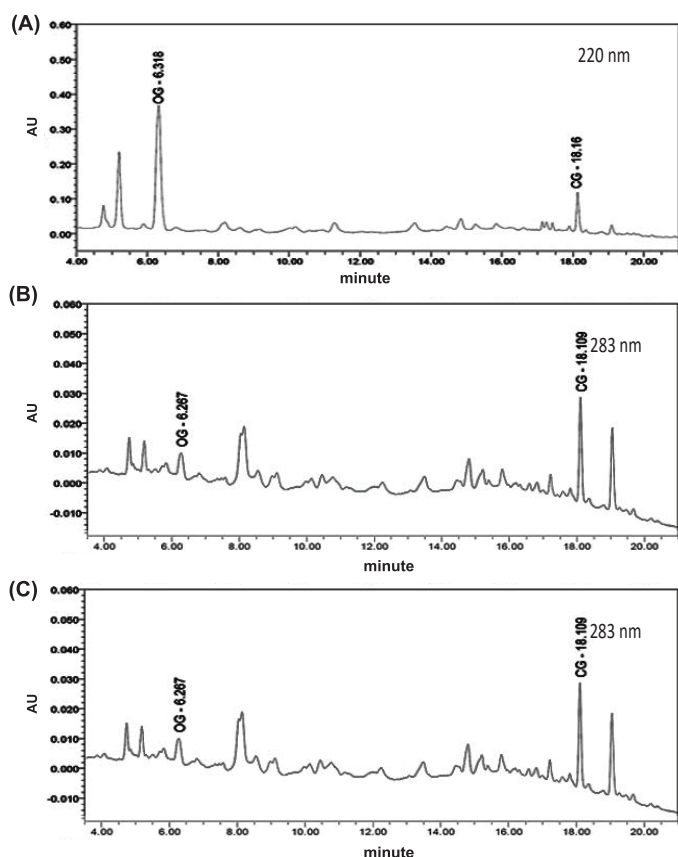
Đánh giá quy trình định lượng: Quy trình định lượng đã khảo sát được đánh giá theo hướng dẫn của ICH [8], bao gồm tính phù hợp hệ thống, tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại trong ngày, độ chính xác trung gian và độ đúng.

Định lượng OG và CG trong các mẫu thử: Ứng dụng quy trình định lượng đã xây dựng để so sánh hàm lượng của OG và CG trong 6 mẫu Sâm cau. Các kết quả hàm lượng được hiển thị bằng hàm lượng (%) trung bình (TB $\pm$ SD) và được phân tích thống kê bằng phương pháp One-Way ANOVA và phép kiểm định Tukey bằng phần mềm Minitab 19. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$ với độ tin cậy 95%.

3. Kết quả

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

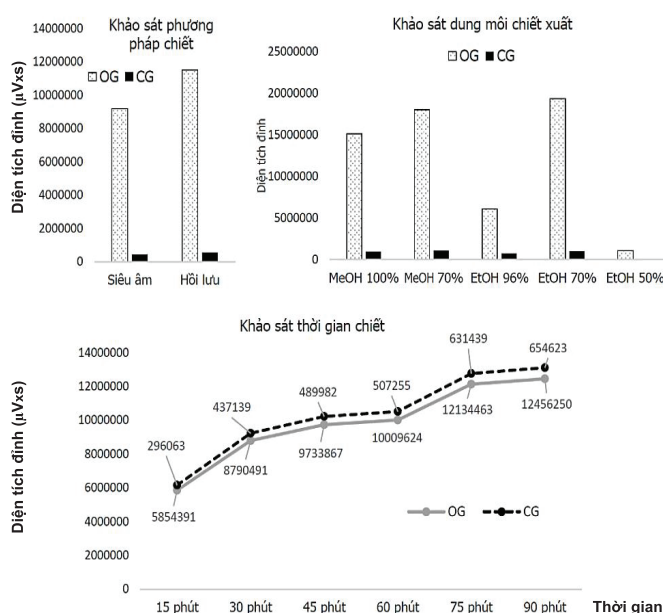
Kết quả khảo sát phổ UV của mẫu chuẩn pha trong methanol cho thấy, các đỉnh hấp thụ cực đại (λ_{max}) tại các bước sóng lần lượt là 202,2, 220,1 và 270,8 nm (OG); 199,9 và 282,7 nm (CG). Do đó, chọn bước sóng định lượng là 220 nm (OG) và 283 nm (CG) vì các đỉnh hấp thụ này có tín hiệu ổn định, độ nhạy cao và ít bị ảnh hưởng bởi đường nền. Pha động phù hợp được lựa chọn để phân tích mẫu thử gồm TFA 0,05% (A) và ACN (B). Chương trình dung môi gồm: 8-12% B (1 phút), 12-15% B (8 phút), 15-25% B (4 phút), 25-46% B (9 phút), 46-70% B (1 phút) (tổng 20 phút). Nhiệt độ cột 25°C, tốc độ dòng 0,3 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 3 μ l. Điều kiện sắc ký đã lựa chọn (hình 2) để định lượng đồng thời OG và CG cho thấy các pic cần định lượng tách hoàn toàn với các tạp kế cận và đạt các thông số sắc ký.



Hình 2. Sắc ký đồ UPLC-PDA của mẫu thử ở các bước sóng: (A) 220 nm, (B) 283 nm và (C) mẫu chuẩn.

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu thử

Kết quả khảo sát ở hình 3 cho thấy, phương pháp chiết hồi lưu có ưu thế hơn phương pháp siêu âm. Về khảo sát dung môi chiết xuất mẫu thử, dung môi EtOH 70% thể hiện hiệu quả chiết xuất OG và CG cao nhất. Về khảo sát thời gian chiết, diện tích đỉnh OG và CG trong thời gian đun hồi lưu 75 và 90 phút cao hơn đáng kể so với các thời gian khác, tuy nhiên giữa thời gian đun 75 và 90 phút không có sự khác biệt nhiều. Do đó, chọn thời gian đun 90 phút nhằm đảm bảo chiết kiệt hoạt chất cần định lượng. Về khảo sát số lần chiết và tỷ lệ dung môi chiết xuất, các chất chiết được trên 92% ở lần chiết đầu tiên và đạt trên 98% ở lần chiết thứ 2 (bảng 1). Do đó, chọn cách chiết liên tục 2 lần để đảm bảo chiết kiệt hoạt chất cần định lượng. Đối với tỷ lệ thể tích, dung môi 25 ml đạt hiệu suất chiết cao hơn so với các tỷ lệ thể tích còn lại.



Hình 3. Kết quả khảo sát điều kiện chiết.

Bảng 1. Kết quả khảo sát thể tích dung môi và số lần chiết xuất mẫu thử.

Số lần chiết	Thể tích dung môi chiết					
	10 ml		20 ml		25 ml	
	OG	CG	OG	CG	OG	CG
L1	92,80%	93,22%	95,72%	95,94%	96,96%	97,32%
L2	5,86%	5,63%	3,64%	3,59%	2,41%	2,25%
L3	1,34%	1,15%	0,64%	0,47%	0,63%	0,43%
L1+L2	98,66%	98,85%	99,36%	99,53%	99,37%	99,57%

3.3. Đánh giá quy trình định lượng theo ICH

Khảo sát tính phù hợp hệ thống: 6 lần tiêm liên tiếp mẫu thử Sâm cau (40 mg/ml) pha trong ethanol 70% có kết quả độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của các thông số sắc ký như diện tích pic, thời gian lưu không quá 2%, độ phân giải, hệ số bất đối, số đĩa lý thuyết đều đạt yêu cầu phân tích. Do đó, quy trình định lượng đạt tính phù hợp hệ thống (bảng 2).

Bảng 2. Tính phù hợp hệ thống của quy trình định lượng OG và CG (n=6).

	t_R (phút) (RSD %)	S ($\mu V \times s$) (RSD %)	$^a R_s$	As	N
OG	6,3 (0,4)	3365744 (0,2)	1,97	0,99	11071
CG	18,1 (0,2)	188846,5 (0,6)	1,83	1,01	277370
Yêu cầu	RSD $\leq$ 2	RSD $\leq$ 2	$R_s > 1,5$	$0,8 \leq As \leq 1,5$	≥ 2000

a : độ phân giải của pic định lượng so với pic liền trước; t_R : thời gian lưu; S: diện tích đỉnh; R_s : độ phân giải; As: hệ số bất đối xứng; N: số đĩa lý thuyết.

Tính đặc hiệu: Phân tích 4 mẫu gồm mẫu trắng (ethanol 70%), mẫu thử, mẫu chuẩn (OG và CG có nồng độ 200 $\mu g/ml$ trong ethanol 70%) và mẫu thử thêm chuẩn. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy, mẫu trắng không có pic của các chất cần định lượng, phổ UV và thời gian lưu (t_R) của OG (6,3 phút) và CG (18,1 phút) trong mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn tương đương nhau. Khi thêm chuẩn vào mẫu thử, chiều cao và diện tích pic của OG và CG trong mẫu thử tăng cao hơn so với trước khi thêm chuẩn.

Khoảng tuyến tính, LOD và LOQ: Kết quả bảng 3 cho thấy, quy trình định lượng đối với OG và CG có khoảng áp dụng tương đối rộng, với hàm lượng trong khoảng tuyến tính của OG (10-1000 $\mu g/ml$, $R^2=0,999$) và CG (5-500 $\mu g/ml$, $R^2=0,9991$). Giá trị LOD của OG và CG tại nồng độ lần lượt là 10 và 5 $\mu g/ml$ ghi nhận tín hiệu của S/N (H tín hiệu/h nhiễu) đạt khoảng 2-3 (trong đó, H là chiều cao pic OG hoặc CG; h là chiều cao tín hiệu nhiễu nền lớn nhất). Giá trị LOQ là 0,83 $\mu g/ml$ (OG) và 1,67 $\mu g/ml$ (CG) được suy ra từ LOD ($LOQ=3 \times LOD$) [8].

Bảng 3. Đường tuyến tính, LOD, LOQ của OG và CG của quy trình định lượng.

Hợp chất	Phương trình hồi quy a	R^2	Khoảng áp dụng ($\mu g/ml$)	LOD ($\mu g/ml$)	LOQ ($\mu g/ml$)
OG	$y=15853x+241632$	0,9990	10-1000	0,25	0,83
CG	$y=5357,9x+544,09$	0,9991	5-500	0,5	1,67

a : phương trình hồi quy có tính tương thích ($F > F_{0,05}$).

Độ chính xác và độ đúng: Kết quả ở bảng 4 và 5 cho thấy, quy trình định lượng OG và CG trong Sâm cau đã xây dựng có độ lặp lại cao, trong đó độ lặp lại trong ngày của 6 mẫu thử được phân tích trong cùng một ngày có RSD của OG và CG đạt 0,52-1,41% và RSD của 12 mẫu thử được phân tích ở hai ngày khác nhau là 1,3-1,7%. Độ đúng của phương pháp có tỷ lệ phục hồi của OG là 97,08-103,60% (RSD=0,41-1,85%) và CG là 100,28-111,25 (RSD=0,98-1,70%).

Bảng 4. Độ chính xác của quy trình định lượng OG và CG.

Hợp chất	$\bar{X} \pm SD$ (n=6) (mg/g)	Hàm lượng (%)	Độ chính xác	
			RSD % (n=6) a	RSD % (n=12) b
OG	6,10 $\pm$ 0,03	0,610 $\pm$ 0,003	0,52	1,30
CG	0,95 $\pm$ 0,01	0,095 $\pm$ 0,001	1,41	1,70

trong đó: a : độ lặp lại trong ngày, b : độ chính xác trung gian.

Bảng 5. Độ đúng của quy trình định lượng OG và CG.

Hợp chất	OG			CG		
Tỷ lệ thêm vào	10%	20%	30%	30%	60%	90%
Độ phục hồi	96,3-98,4	99,7-100,5	102,2-105,8	98,9-101,3	106,0-108,0	109,1-112,5
Trung bình	97,08	100,01	103,60	100,28	107,18	111,25
RSD %	1,18	0,41	1,85	1,25	0,98	1,70

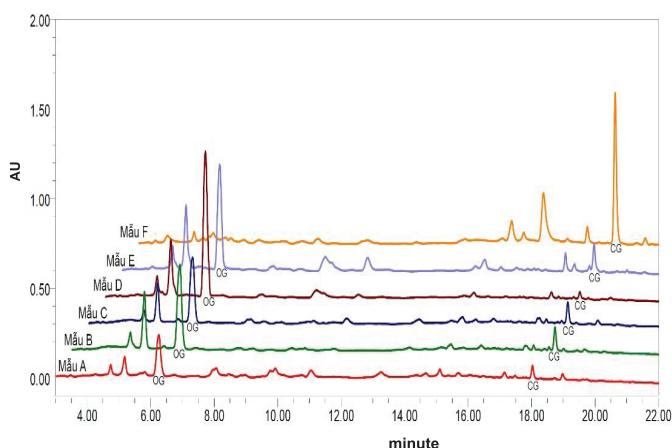
3.4. Kết quả định lượng OG và CG trong 6 mẫu Sâm cau

Kết quả bảng 6 và hình 4 cho thấy, các mẫu dược liệu Sâm cau ở các địa phương khác nhau có sự chênh lệch hàm lượng OG và CG. Kết quả định lượng 6 mẫu cho thấy, thân rễ Sâm cau thu hái tại Sơn La (mẫu **D**) có hàm lượng OG cao nhất (1,301%) nhưng hàm lượng CG lại thấp nhất. Trong khi mẫu rễ thu hái tại Đắk Nông (mẫu **F**) chứa hàm lượng CG cao nhất (0,703%) nhưng lại không phát hiện được OG ở điều kiện phân tích. Mẫu **E** (thân rễ, Đắk Nông) chứa cả 2 hợp chất này tương đối cao với OG (0,903%) và CG (0,123%). Cả 3 mẫu **A**, **B** và **C** (thân rễ) trồng tại Lào Cai đều có chứa hàm lượng OG và CG ở mức độ trung bình với OG là 0,36-0,773% và CG 0,061-0,107%.

Bảng 6. Hàm lượng của OG và CG trong 6 mẫu Sâm cau (TB $\pm$ SD%, n=3).

Mẫu	Nơi trồng	Thu hái	OG (%)	CG (%)
A	Lào Cai a	3/2021	0,360 $\pm$ 0,03 c	0,061 $\pm$ 0,001 m
B	Lào Cai a	10/2021	0,773 $\pm$ 0,008 c	0,107 $\pm$ 0,000 b
C	Lào Cai a	3/2022	0,555 $\pm$ 0,002 d	0,092 $\pm$ 0,001 i
D	Sơn La a	5/2022	1,301 $\pm$ 0,024 a	0,041 $\pm$ 0,000 k
E	Đắk Nông a	5/2022	0,903 $\pm$ 0,011 b	0,123 $\pm$ 0,002 g
F	Đắk Nông b	6/2022	n.d	0,703 $\pm$ 0,007 f

n.d: non-detected = không thể phát hiện; a : thân rễ; b : rễ con. Các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey, $p < 0,05$).



Hình 4. Sắc ký đồ UPLC-PDA ($\lambda_{max}=220$ nm) định lượng OG và CG trong 6 mẫu Sâm cau.

4. Bàn luận

OG và CG thường được xem là chất chỉ điểm quan trọng của dược liệu Sâm cau. Do đó, quy trình định lượng OG và CG bằng HPLC [9, 10] hoặc UHPLC [3] cũng đã được xây dựng. Dược điển Trung Quốc [5] và Hồng Kông [6] chỉ yêu cầu kiểm nghiệm hàm lượng CG trong thân rễ Sâm cau. Tuy nhiên, trong đa số các tài liệu đã công bố đều cho thấy pic của OG xuất hiện khá cao và là pic chính trên sắc ký đồ HPLC/UHPLC phân tích dịch chiết thân rễ Sâm cau ở bước sóng 220 nm [9, 10]. Hàm lượng của OG thường cao hơn so với CG ở các mẫu Sâm cau trồng tại Trung Quốc [10] và Việt Nam [9]. Chính vì vậy, việc xây dựng quy trình định lượng đồng thời cả 2 hợp chất phenol glycosid này (OG và CG) nhằm phục vụ cho việc tiêu chuẩn hóa dược liệu Sâm cau là các nghiên cứu thiết thực hiện nay.

Về điều kiện sắc ký, nghiên cứu đã lựa chọn phương pháp UPLC để xây dựng quy trình định lượng vì có nhiều ưu điểm hơn so với HPLC như tiết kiệm về dung môi, thời gian phân tích cũng như là hiệu quả phân tách tốt hơn. Quy trình định lượng OG và CG bằng HPLC của Dược điển Trung Quốc và Hồng Kông có thời gian phân tích 35-60 phút [5, 6]. Tuy nhiên, quy trình định lượng của nghiên cứu này được thực hiện trên cột C18 (cỡ hạt là 2,7 μm) có thời gian phân tích khá ngắn (20 phút) nhưng các pic định lượng vẫn đạt các yêu cầu phân tích theo ICH. Bước sóng phát hiện của OG là 220 nm và CG là 283 nm trong ethanol 70% cũng phù hợp với Dược điển Trung Quốc và Hồng Kông phát hiện OG và CG ở các bước sóng tương ứng là 220 và 285 nm trong methanol [5, 6].

Về khảo sát quy trình chuẩn bị mẫu thử, trong số các quy trình định lượng đã công bố, ngoại trừ nghiên cứu của Q. Bian và cs (2013) [10], đa phần các nghiên cứu khác đều không khảo sát điều kiện chiết xuất (phương pháp chiết xuất, dung môi, nhiệt độ, thời gian) để đạt được hiệu suất chiết OG hoặc CG là tối ưu. Kết quả khảo sát của chúng tôi cho thấy, phương pháp đun hồi lưu và dung môi ethanol 70% là lựa chọn tối ưu để chiết xuất đồng thời OG và CG trong thân rễ Sâm cau, phù hợp với đa số các nghiên cứu đã công bố. Bên cạnh đó, các quy trình định lượng OG và CG trong thân rễ Sâm cau đã công bố đều thực hiện trên khối lượng mẫu thử khá lớn (2-5 g) do hàm lượng CG tương đối thấp. Quy trình định lượng của nghiên cứu này thực hiện trên khối lượng mẫu là 1,0 g nhưng vẫn đảm bảo đạt các yêu cầu về thẩm định theo ICH. Về thời gian chiết xuất mẫu thử cũng có sự khác biệt giữa các quy trình đã công bố với thời gian đun hồi lưu là 60 phút [6] và 120 phút [10]. Kết quả nghiên cứu của Q. Bian và cs (2013) [10] đã cho thấy tổng thời gian chiết xuất ở 120 phút có thể chiết được OG và CG là tốt nhất. Nghiên cứu này cũng đã khảo sát động học về thời gian chiết xuất cho thấy hàm lượng của OG và CG tăng dần ở thời gian đun hồi lưu từ 15 đến 90 phút. Tuy nhiên, hàm lượng của các hợp chất này tăng không nhiều ở thời điểm từ 75 phút trở đi do hàm lượng các

chất đã được bão hòa trong dung môi. Do vậy, đề tài đã chọn thời gian đun là 90 phút (trên 1,0 g mẫu thử) vẫn đảm bảo chiết được các chất định lượng OG và CG là tối ưu. Bên cạnh đó, đề tài còn khảo sát tỷ lệ dung môi và số lần chiết xuất mẫu thử để đảm bảo chiết kiệt các hợp chất cần định lượng.

Về kết quả định lượng OG và CG trong 6 mẫu Sâm cau, chỉ tiêu hàm lượng của CG (HPLC-PDA) được quy định không được dưới 0,1% (Dược điển Hồng Kông [6]) và 0,08% (Dược điển Trung Quốc [5]), Dược điển Việt Nam chưa có chỉ tiêu về hàm lượng của CG hay OG. Kết quả định lượng 6 mẫu Sâm cau thu hái tại Tây Nguyên (Đắk Nông) và miền Bắc (Sơn La, Lào Cai) có hàm lượng OG là 0,360-1,301% và CG 0,04-0,123%. Như vậy, trong số các mẫu Sâm cau định lượng có 4 mẫu đạt chỉ tiêu hàm lượng của CG theo Dược điển Hồng Kông và Trung Quốc với hàm lượng của CG là 0,092-0,123% và chỉ có 2 mẫu gồm mẫu A (Lào Cai, 3/2021) và mẫu D (Sơn La, 5/2022) có hàm lượng CG khá thấp (0,04-0,06%) và điều này còn phụ thuộc vào thời gian thu hái mẫu, vì các mẫu ở Lào Cai thu hái vào các thời điểm khác (10/2021 và 3/2022) đều có hàm lượng CG cao hơn (0,092-0,107%). Kết quả định lượng hàm lượng của OG và CG trong thân rễ Sâm cau của nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả của N.T.H. Ly và cs (2019) [9] đã định lượng trên các mẫu Sâm cau thu hái tại 10 tỉnh của Việt Nam với hàm lượng OG là 0,14-1,10% và CG 0,09-0,48%. Về hàm lượng của OG và CG so với các mẫu Sâm cau tại Trung Quốc, công bố của Q. Bian và cs (2019) [10] cho thấy hàm lượng của OG là 0,143-1,158% và CG >0,174%. Kết quả của chúng tôi và nghiên cứu của N.T.H. Ly và cs (2019) [9] đều cho thấy hàm lượng OG trong các mẫu Sâm cau của Việt Nam cũng tương đương với các mẫu được trồng tại Trung Quốc. Trong khi đó, hàm lượng của CG trong các mẫu Sâm cau trồng tại Việt Nam hơi thấp hơn so với các mẫu tại Trung Quốc. Tuy nhiên, điều đáng chú ý là mẫu F (Đắk Nông, 6/2022) có bộ phận dùng là rễ cho thấy hàm lượng của CG cao hơn đáng kể so với trong thân rễ, nhưng ngược lại hàm lượng của OG không phát hiện được (hình 4). Rễ có thể là nguyên liệu tiềm năng giàu hợp chất CG, tuy nhiên cần phải có khảo sát thêm ở nhiều mẫu rễ khác của Sâm cau.

5. Kết luận

Quy trình định lượng đồng thời OG và CG trong thân rễ Sâm cau bằng UPLC-PDA được xây dựng có thời gian phân tích ngắn cùng với quy trình xử lý mẫu thử cũng đã được khảo sát nhằm đảm bảo kết quả định lượng chính xác hàm lượng của OG và CG trong Sâm cau. Bên cạnh đó, quy trình định lượng đạt tất cả các yêu cầu theo hướng dẫn thẩm định của ICH về tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính ($R^2 > 0,999$) trong khoảng áp dụng của OG (10-1000 $\mu\text{g/ml}$) và CG (5-500 $\mu\text{g/ml}$), độ đặc hiệu, độ lặp lại và độ chính xác trung gian ($\text{RSD} < 2,0\%$), độ đúng của phương pháp có tỷ lệ phục hồi OG là 97,08-103,60% và CG là 100,28-111,25. Ngoài ra, quy trình định

lượng cũng đã được ứng dụng để so sánh hàm lượng của 2 hợp chất phenol glycosid này trong 6 mẫu Sâm cau thu tại Sơn La, Lào Cai, Đắk Nông. Hàm lượng OG và CG trong các mẫu Sâm cau phụ thuộc vào vùng trồng và thời gian thu hái với OG là 0,36-1,301% và CG 0,041-0,123%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí của Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Đắk Nông, các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D.T. Loi (2004), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Medical Publishing House, 1294pp (in Vietnamese).

[2] W. Gong, M. Liu, Q. Zhang, et al. (2022), "Orcinol glucoside improves senile osteoporosis through attenuating oxidative stress and autophagy of osteoclast via activating Nrf2/Keap1 and mTor signaling pathway", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2022**(2), pp.1-18, DOI: 10.1155/2022/5410377.

[3] Y. He, X. Dong, X. Jia, et al. (2015), "Qualitative and quantitative analysis on chemical constituents from *Curculigo orchoides* using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **102**, pp.236-245, DOI: 10.1016/j.jpba.2014.09.024.

[4] Q. Bian, D.X. Fu, A.J. Hou, et al. (2005), "Antioxidative phenols and phenolic glycosides from *Curculigo orchoides*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **53**(8), pp.1065-1067, DOI: 10.1248/cpb.53.1065.

[5] Chinese Pharmacopoeia Commission (2020), *Pharmacopoeia of The People's Republic of China*, China Medical Science and Technology Press, Beijing, 337pp.

[6] Chinese Medicine Regulatory Office (2012), "*Curculiginis Rhizoma*", *Lists of Chinese Materia Medica in HKCMMS*, **4**, pp.124-132.

[7] Ministry of Health (2017), *Vietnam Pharmacopoeia V*, Medical Publishing House, **1**, 1078pp (in Vietnamese).

[8] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use (2005), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, Harmonised Tripartite Guideline, 17pp.

[9] N.T.H. Ly, N.D. Quan, N.T. Phuong, et al. (2019), "Development of an analysis method using HPLC-UV for simultaneous quantification of orcinol glycosid and curculigosid in *Rhizoma curculiginis*", *Journal of Medicinal Materials*, **24**(3), pp.144-148.

[10] Q. Bian, H. Yang, C.O. Chan, et al. (2013), "Fingerprint analysis and simultaneous determination of phenolic compounds in extracts of *Rhizoma curculiginis* by Hplc-diode array detector", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **61**(8), pp.802-808, DOI: 10.1248/cpb.c12-01058.

Giá trị chẩn đoán sớm nhồi máu cơ tim cấp của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica

Nguyễn Thị Ngọc Lan^{1*}, Phan Thị Thu Hương²

¹Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện Đa khoa Thái Bình, 530 Lý Bôn, phường Quang Trung, TP Thái Bình, tỉnh Thái Bình, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/9/2022; ngày chuyển phản biện 29/9/2022; ngày nhận phản biện 21/10/2022; ngày chấp nhận đăng 25/10/2022

Tóm tắt:

Các xét nghiệm đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán nhồi máu cơ tim (NMCT) cấp, giúp bác sĩ lâm sàng có thể ra quyết định sớm trên bệnh nhân nghi ngờ NMCT. Từ đó, tăng hiệu quả điều trị, giảm tỷ lệ biến chứng sau NMCT cũng như tăng tỷ lệ sống sót của bệnh nhân NMCT. Troponin là một thành phần trong phức hợp cơ cơ, đã được sử dụng là dấu hiệu chẩn đoán NMCT trên thực hành lâm sàng với các loại Troponin T và Troponin I siêu nhạy. Tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, trước khi triển khai xét nghiệm Troponin I siêu nhạy đã tiến hành xác nhận giá trị sử dụng nhằm so sánh hiệu năng của phương pháp mà phòng xét nghiệm khảo sát được với các công bố của nhà sản xuất và đặc biệt khảo sát giá trị chẩn đoán hội chứng vành cấp (HCVC) của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy. Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica đều đáp ứng được các tiêu chuẩn của Viện Tiêu chuẩn Phòng thí nghiệm và Lâm sàng Hoa Kỳ CLSI và nhà sản xuất công bố. Độ nhạy, độ đặc hiệu và diện tích dưới đường cong (AUC) của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy tương ứng là 90,2, 78,7 và 0,881%. Như vậy, đặc tính kỹ thuật của phương pháp xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica về độ chụm, độ đúng, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LoD), giới hạn định lượng (LoQ) đáp ứng được các tiêu chuẩn của CLSI và nhà sản xuất công bố. Nghiên cứu đã chứng minh được hiệu quả của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica trong chẩn đoán và tiên lượng NMCT cấp.

Từ khóa: giá trị chẩn đoán, nhồi máu cơ tim, Troponin I siêu nhạy.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

NMCT cấp là bệnh cảnh nội khoa cần được can thiệp cấp cứu, đứng đầu trong các nguyên nhân gây tử vong và gánh nặng toàn cầu. Có tới 20% các bệnh nhân HCVC không có các biến đổi tức thời và rõ ràng trên điện tâm đồ. Việc xác định chính xác và nhanh chóng các bệnh nhân NMCT cấp là rất quan trọng để cứu sống và tránh các thủ tục không cần thiết, thời gian nằm viện kéo dài và quá tải ở khoa cấp cứu, giảm sự lo lắng của bệnh nhân và chi phí chăm sóc sức khỏe liên quan.

Trên thế giới, có nhiều loại xét nghiệm Troponin siêu nhạy đã và đang được đưa vào sử dụng trong hỗ trợ chẩn đoán sớm NMCT cấp và có nhiều nghiên cứu về vấn đề này. Tại Việt Nam, đã có một số nghiên cứu về giá trị chẩn đoán của Troponin T siêu nhạy, tuy nhiên, nghiên cứu về giá trị chẩn đoán của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trong HCVC chưa được triển khai. Bên cạnh đó, để đảm bảo chất lượng xét nghiệm theo tiêu chuẩn ISO 15189:2012 về đảm bảo chất lượng và năng lực của các phòng thí nghiệm y tế và Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/06/2017 của Bộ Y tế về ban hành tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, trước khi triển khai một xét nghiệm mới tại bệnh viện, cần thực hiện xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp xét nghiệm. Vì vậy, nghiên cứu được tiến hành

nhằm hai mục tiêu: xác nhận giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica IM 1600 và đánh giá giá trị chẩn đoán HCVC của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu mục tiêu 1: Toàn bộ các kết quả xét nghiệm phân tích theo hướng dẫn xác nhận phương pháp tại Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

Vật liệu nghiên cứu: Mẫu QC: Biorad liquichek cardiac troponins control, mẫu calibration: Atellica TNIH Calibrator.

Đối tượng nghiên cứu mục tiêu 2: Bệnh nhân có triệu chứng nghi ngờ NMCT cấp đến khám và điều trị tại Bệnh viện Đa khoa Thái Bình, Bệnh viện Tim Hà Nội trong thời gian từ tháng 7/2021 đến tháng 8/2022.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân không được chụp mạch vành chẩn đoán xác định, Bệnh nhân mới có NMCT trong vòng 30 ngày, Bệnh nhân thực hiện các thủ thuật trong buồng tim, mang máy tạo nhịp, bệnh nhân suy thận nặng, bệnh nhân chấn thương ngực, bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

*Tác giả liên hệ: Email: ngoclannguyen@hmu.edu.vn

The value of early diagnosis of acute myocardial infarction of the high-sensitivity Troponin I assay on the Atellica analyzer

Thi Ngoc Lan Nguyen^{1*}, Thi Thu Huong Phan²

¹Hanoi Medical University,

1 Ton That Tung, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Thai Binh General Hospital,

530 Ly Bon, Quang Trung Ward, Thai Binh City, Thai Binh Province, Vietnam

Received 26 September 2022; revised 21 October 2022; accepted 25 October 2022

Abstract:

Laboratory tests play an extremely important role in the diagnosis of acute myocardial infarction (MI), helping clinicians to make early decisions on patients with suspected MI. Thereby helping to increase the effectiveness of treatment, reduce the rate of complications after MI, and increase the survival rate of MI patients. Troponin is a component of the muscle contraction complex, which has been used as a diagnostic marker of MI in clinical practice with the high-sensitivity Troponin T and Troponin I types. At Hanoi Medical University Hospital, before deploying the high-sensitivity Troponin I assay, validation was conducted to compare the performance of the method surveyed by the laboratory with the manufacturer's announcements. And especially investigating the diagnostic value of acute coronary syndromes of the high-sensitivity Troponin I assay. Validation results of the high-sensitivity troponin I test method all meet the standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the manufacturer's announcement. The sensitivity, specificity and area under the curve (AUC) of the high-sensitivity Troponin I assay on the Atellica analyzer were 90.2, 78.7, and 0.881%, respectively. Thus, the technical characteristics of the high-sensitivity Troponin I assay with precision, accuracy, linear range, LoD, and LoQ meet the standards of CLSI and the manufacturer. The study has demonstrated the effectiveness of the high-sensitivity Troponin I assay in the diagnosis and prognosis of acute MI.

Keywords: acute myocardial infarction, diagnostic value, high-sensitivity Troponin I.

Classification number: 3.5

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Cỡ mẫu nghiên cứu: Áp dụng công thức tính cỡ mẫu theo độ đặc hiệu cho nghiên cứu về chẩn đoán. Theo một kết quả phân tích gộp độ đặc hiệu tổng hợp của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy của Siemens là 95,9%. Tỷ lệ NMCT theo thống kê của Hiệp hội Tim mạch Hoa Kỳ năm 2020 là 3,0%.

$$n_{sp} = \frac{Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 \times p_{sp} \times (1-p_{sp})}{w^2 (1-p_{dis})} = \frac{1.96^2 \times 0.959 \times 0.041}{0.05^2 (1-0.03)} = 63$$

trong đó n_{sp} : cỡ mẫu tối thiểu tính theo độ đặc hiệu, chọn mức ý nghĩa thống kê $\alpha=0,05$, $Z_{1-\frac{\alpha}{2}}=1,96$; w: mức sai số (lựa chọn: $w=0,05$); p_{sp} : độ đặc hiệu²; p_{dis} : tỷ lệ mắc bệnh hiện hành.

Phương pháp chọn mẫu: Chọn mẫu thuận tiện.

Bệnh nhân đến khám và điều trị tại Bệnh viện Đa khoa Thái Bình, Bệnh viện Tim Hà Nội có triệu chứng nghi ngờ NMCT cấp, có cơn đau thắt ngực kiểu mạch vành, được thực hiện xét nghiệm sinh hóa và chỉ định chụp mạch vành chẩn đoán. Lưu mẫu bệnh phẩm ở -20°C , vận chuyển mẫu, phân tích tại Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Đánh giá giá trị chẩn đoán của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy so với kết quả chụp mạch vành.

Chẩn đoán hẹp mạch vành có ý nghĩa khi hẹp thân chung động mạch vành trái: $\geq 50\%$ đường kính; hẹp ba nhánh chính: $\geq 70\%$ đường kính; tổn thương ba thân động mạch vành: mỗi động mạch vành hẹp $\geq 70\%$ đường kính.

Chỉ số nghiên cứu:

Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp xét nghiệm: kiểm định các đặc tính: độ chụm, độ đúng, khoảng tuyến tính, LoD, LoQ, khoảng tham chiếu theo các hướng dẫn của CLSI.

Giá trị chẩn đoán của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy: độ nhạy, độ đặc hiệu, diện tích dưới đường cong AUC, giá trị tiên lượng biến cố trong 30 ngày.

Xử lý số liệu: số liệu được thu thập vào bệnh án nghiên cứu mẫu, mã hóa, xử lý bằng phần mềm Excel, SPSS 20.0 và sử dụng các thuật toán thống kê phù hợp.

Đạo đức nghiên cứu: Các mẫu bệnh phẩm sử dụng trong nghiên cứu để phân tích xét nghiệm Troponin I siêu nhạy được thu gom từ huyết tương thừa có sẵn của bệnh nhân tại Khoa Xét nghiệm tại Bệnh viện Đa khoa Thái Bình và Bệnh viện Tim Hà Nội. Trong quá trình nghiên cứu, nhóm nghiên cứu hoàn toàn không can thiệp vào quá trình chẩn đoán và điều trị của bệnh nhân, vì vậy nghiên cứu không ảnh hưởng tới quá trình điều trị, kết quả và chi phí điều trị của bệnh nhân.

3. Kết quả

Trong thời gian từ tháng 7/2021 đến tháng 8/2022, nhóm nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu 86 bệnh nhân nghi ngờ HCVC được chụp động mạch vành tại Bệnh viện Đa khoa Thái Bình và Bệnh viện Tim Hà Nội, có 56 bệnh nhân được chẩn đoán HCVC sau khi chụp động mạch vành.

3.1. Đặc điểm của nhóm nghiên cứu

Tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là $66,5 \pm 13,85$, tuổi cao nhất là 93 tuổi, thấp nhất là 25 tuổi. Sự khác nhau về độ tuổi trung bình của nhóm có HCVC và nhóm không có HCVC khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p=0,200$). Trong nhóm trên 65 tuổi ($n=48$), nhóm có HCVC chiếm tỷ lệ cao hơn (67,9%) so với nhóm không có HCVC (33,3%), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p=0,003$).

Bảng 1. Đặc điểm của nhóm nghiên cứu và yếu tố nguy cơ kèm theo.

Biến số nghiên cứu	$\bar{X} \pm SD$ hoặc n %			p
	Chung	Hội chứng vành cấp	Không có hội chứng vành cấp	
Tuổi (năm)	$66,5 \pm 13,85$	$69,88 \pm 11,04$	$66,2 \pm 16,38$	0,200
Tuổi >65 (n)	48 (55,8%)	38 (67,9%)	10 (33,3%)	0,003
Nam (n)	60 (69,8%)	43 (76,8%)	17 (59,7%)	0,083
Tăng huyết áp (n)	55 (64,0%)	40 (71,4%)	15 (26,8%)	0,061
Hút thuốc lá (n)	15 (17,4%)	14 (25,0%)	1 (3,3%)	0,015
Đái tháo đường (n)	19 (22,1%)	15 (26,8%)	4 (13,3%)	0,182
Rối loạn chuyển hóa lipid (n)	27 (31,4%)	17 (30,4%)	10 (33,3%)	0,811
Đoạn ST chênh lên	40 (46,5%)	34 (60,7%)	6 (20%)	

Tỷ lệ nam giới trong nhóm nghiên cứu chiếm 69,8%, nam giới có HCVC là 76,8% cao hơn so với nam giới được loại trừ HCVC (59,7%), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p=0,083$).

Trong 4 yếu tố nguy cơ được khảo sát ở nhóm nghiên cứu, tăng huyết áp chiếm tỷ lệ cao nhất (64,0%), sau đó là rối loạn chuyển hóa lipid (31,4%), đái tháo đường (22,1%), hút thuốc lá có tỷ lệ thấp nhất (17,4%).

Số bệnh nhân có biến đổi đoạn ST chênh lên chiếm 46,5%. Trong số các bệnh nhân có HCVC, tỷ lệ bệnh nhân có ST chênh lên là 60,7% (bảng 1).

3.2. Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy

Bảng 2. Độ chính xác, độ đúng của kỹ thuật xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica.

	Mẫu nồng độ thấp (43,6 pg/ml)	Mẫu nồng độ trung bình (4426 pg/ml)	Mẫu nồng độ cao (12247 pg/ml)
Độ chính xác ngắn hạn (CV%)	0,97-2,17 (NSX: 2,4)	0,62-1,65 (NSX: 1,8)	0,98-1,27 (NSX: 1,3)
Độ chính xác dài hạn (CV%)	1,97 (NSX: 3,9)	1,98 (NSX: 3,2)	1,27 (NSX: 2,5)
Độ chệch (Bias%)	1,84	4,53	4,46

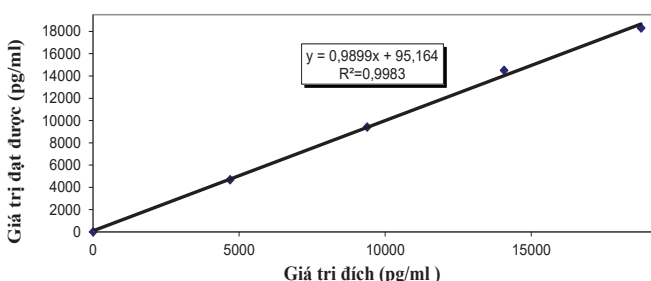
NSX: nhà sản xuất.

Kết quả bảng 2 cho thấy, độ chính xác ngắn hạn và dài hạn của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica ở cả 3 mức nồng độ thấp, trung bình và cao đều nhỏ hơn giá trị nhà sản xuất công bố. Độ chệch của xét nghiệm đạt mục tiêu chất lượng theo biến thiên sinh học ($<7,03\%$) [1].

Bảng 3. Kết quả xác nhận LoD, LoQ của Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica.

Thông số	LoD	LoQ
Giá trị (pg/ml)	1,6	2,5

Kết quả bảng 3 cho thấy, LoD=1,6 pg/ml và LoQ=2,5 pg/ml của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy phù hợp với công bố của nhà sản xuất.



Hình 1. Khoảng tuyến tính của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica.

Xét nghiệm Troponin I siêu nhạy tuyến tính trong khoảng 2,7-18034 pg/ml với hệ số tương quan $R^2=0,9983$ (hình 1).

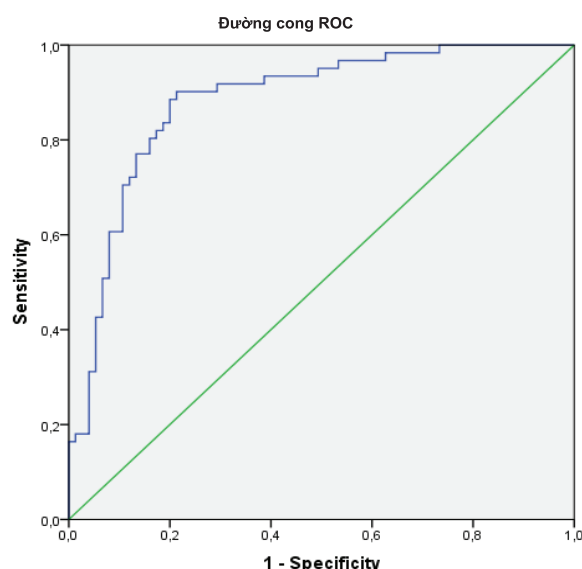
3.3. Giá trị chẩn đoán của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica trong HCVC.

Kết quả bảng 4 cho thấy, nồng độ Troponin I siêu nhạy của nhóm bệnh nhân NMCT và không phải NMCT ở hai nhóm bệnh nhân là khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,0001$.

Bảng 4. Nồng độ Troponin I siêu nhạy của nhóm nghiên cứu.

Xét nghiệm	Troponin I siêu nhạy		
	Min (pg/ml)	Max (pg/ml)	Trung bình (pg/ml)
NMCT	2,58	18820	7612,77±8976,2
Không phải NMCT	3,16	25750	2244,92±5287,68
p	0,0001		

Khả năng dự đoán HCVC của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy ở mức tốt với AUC=0,881 (95%CI: 0,823-0,94) (hình 2).



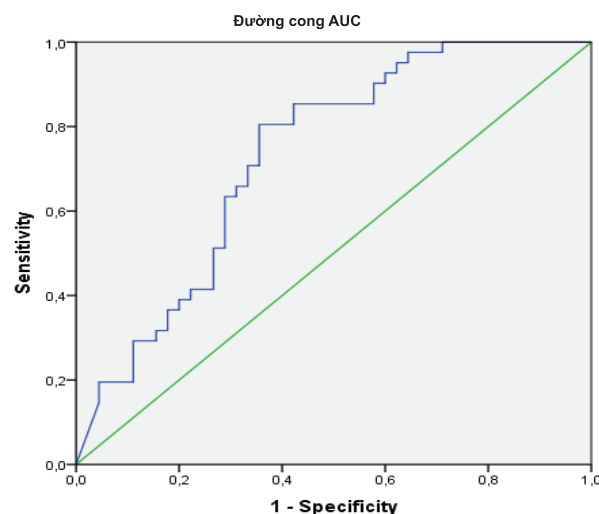
Hình 2. Đường cong ROC thể hiện giá trị chẩn đoán HCVC của Troponin I siêu nhạy khi vào viện.

Bảng 5. Một số giá trị cut-off của Troponin I siêu nhạy khi nhập viện và khả năng chẩn đoán tương ứng.

Giá trị (pg/ml)	Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)
3,1	100	26,7
5,08	96,7	40,0
34,31	90,2	70,7
46,99	90,2	73,3
55,77	90,2	74,7
140,06	88,5	80,0
386,28	77,0	85,3
19583	16,4	100
Chung	90,2	78,7

Mức cut-off tối ưu của Troponin I siêu nhạy là 140,06 pg/ml, tại giá trị này độ nhạy và độ đặc hiệu của chẩn đoán lần lượt là 88,5 và 80,0%. Muốn độ nhạy tăng lên 100%

thì có thể hạ ngưỡng cut-off xuống 3,1 pg/ml, tuy nhiên ở ngưỡng này độ đặc hiệu chỉ còn 26,7%. Nếu muốn nâng độ đặc hiệu lên 100%, có thể chọn giá trị cut-off là 19583 pg/ml, tuy nhiên độ nhạy chỉ còn 16,4% (bảng 5).



Hình 3. Đường cong AUC thể hiện khả năng tiên lượng biến cố suy tim của Troponin I siêu nhạy.

Trong các biến cố tim mạch chính trong 30 ngày sau khi nhập viện của nhóm bệnh nhân nghiên cứu, biến cố suy tim chiếm tỷ lệ cao nhất (41,9%), có 5 bệnh nhân tái nhập viện vì lý do bệnh lý tim mạch khác (5,8%), 2 bệnh nhân nhồi máu não sau can thiệp, 1 bệnh nhân nhập viện vì NMCT tái phát, không có bệnh nhân tử vong. Khả năng tiên lượng của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy với biến cố suy tim ở mức độ trung bình (AUC=0,73), điểm cắt tối ưu là 492,8 pg/ml với độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng là 80,5 và 64,4%. Khả năng tiên lượng các biến cố khác ở mức không tốt (AUC<0,60) (hình 3).

4. Bàn luận

4.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Nghiên cứu của nhóm có đặc điểm tương đương với các nghiên cứu khác ở trong nước và quốc tế về tuổi, giới tính và yếu tố nguy cơ. Tuổi cao là một yếu tố tiên lượng nặng trong HCVC do bệnh nhân cao tuổi thường có triệu chứng đau ngực không điển hình, tổn thương động mạch vành nhiều nhánh và phức tạp. Trong nhóm trên 65 tuổi (n=48), nhóm có HCVC chiếm tỷ lệ cao hơn (67,9%) so với nhóm không có HCVC (33,3%), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (p=0,003). Trong 86 bệnh nhân nghiên cứu, nam giới có 60 bệnh nhân (chiếm 69,8%) cao hơn so với nữ (30,2%), tỷ lệ này cao hơn so với nghiên cứu của P.Q. Tuan (2019) [2] (66,4%), A.R. Chapman và cs (2018) [3] (61,1%) có lẽ

nguyên nhân liên quan đến nguy cơ hút thuốc lá ở nhóm nam giới (14/15 nam giới hút thuốc lá có HCVC). Hai yếu tố nguy cơ tăng huyết áp chiếm tỷ lệ cao nhất (64,0%) và rối loạn chuyển hóa lipid (31,4%), có sự khác biệt nhiều về yếu tố nguy cơ giữa hai nhóm HCVC và không có HCVC, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê trừ yếu tố nguy cơ về hút thuốc lá ($p=0,003$).

4.2. Về đặc tính kỹ thuật của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica

Thực nghiệm xác nhận các đặc tính về độ chụm, độ đúng, khoảng tuyến tính, LoD và LoQ của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy thực hiện theo hướng dẫn xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp xét nghiệm hiện đang áp dụng tại Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội đã đáp ứng được các tiêu chuẩn theo quy định về độ chụm, độ đúng (CLSI EP15) độ lệch chuẩn của phòng xét nghiệm nhỏ hơn độ lệch chuẩn nhà sản xuất công bố và độ lặp lại $\leq 0,25$ TEA, độ tái lặp $\leq 0,33$ TEA, điều này đã chứng minh được tính chính xác của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica 1600 [1].

Khoảng tuyến tính được thực hiện theo tiêu chuẩn CLSI EP 06 với $R^2=0,9983$, xét nghiệm tuyến tính trong khoảng 2,7-18034 pg/ml [1].

LoD=1,6 pg/ml và LoQ=2,5 pg/ml đáp ứng được các giá trị loại trừ của Troponin I siêu nhạy ở thời điểm nhập viện là <3 pg/ml có giá trị tin cậy.

4.3. Giá trị chẩn đoán HCVC và tiên lượng biến cố tim mạch của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica

HCVC được chẩn đoán dựa trên sự thay đổi của 3 thành phần chính, bao gồm đặc điểm lâm sàng, thay đổi trên điện tâm đồ và dấu ấn sinh học ưu tiên là Troponin. Trong đó troponin I đặc biệt đặc hiệu với tế bào cơ tim và các phương pháp xét nghiệm hiện đại cho phép phát hiện được những tổn thương rất nhỏ khi mà các phương pháp xét nghiệm enzyme chưa phát hiện được. Ở ngưỡng xấp xỉ bách phân vị thứ 99 chung cho cả 2 giới 46,99, độ nhạy và độ đặc hiệu của chẩn đoán lần lượt là 90,2 và 73,3%. Mức cut-off tối ưu 140,06 pg/ml độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng là 88,5 và 80,0%, diện tích dưới đường cong AUC 0,881%. Các nghiên cứu trong nước trên giá trị chẩn đoán của Troponin I siêu nhạy của tác giả P.Q. Tuan (2019) [2] ở mức cut-off 16,5 pg/ml (giới hạn ở 99% bách phân vị là 14 pg/ml) có độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng là 84,3 và 87,1%, diện tích dưới đường cong AUC=0,90. Nghiên cứu của N.T. Khoa và cs (2021) [4] trong HCVC không ST chênh lên cũng sử dụng hs-TnT có diện tích dưới đường cong

AUC=0,863 (95% CI 0,814-0,912) tương tự trong nghiên cứu của M. Roffi và cs (2016) [5], diện tích dưới đường cong AUC=0,92. Nghiên cứu của tác giả J. Boeddinghaus và cs (2018) [6] trên Troponin I siêu nhạy Centaur thực hiện trên 1755 bệnh nhân cũng có diện tích dưới đường cong AUC dự báo HCVC là 0,94. Nghiên cứu của A.R. Chapman và cs (2018) [3] trên 1920 bệnh nhân có độ nhạy 90,8% và độ đặc hiệu 74,4%, tương tự trong nghiên cứu của chúng tôi khi sử dụng ngưỡng cut-off chung cho cả hai giới.

Trong các biến cố xảy ra sau NMCT, biến cố suy tim chiếm tỷ lệ cao nhất (41,9%), cao hơn so với nghiên cứu của P.Q. Tuan (2019) [2] (23,1%), khả năng dự kiến biến cố suy tim của Troponin I siêu nhạy ở mức khá là 0,73. Nồng độ Troponin I siêu nhạy trung bình ở nhóm có biến chứng suy tim cao hơn ($7959,4 \pm 9194$ pg/ml) so với nhóm không có biến chứng suy tim ($3718,3 \pm 6005$ pg/ml), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p=0,18$. Nguyên nhân tỷ lệ biến chứng suy tim trong nhóm nghiên cứu cao hơn có thể do nguyên nhân dịch bệnh COVID-19, người bệnh đến viện muộn hơn nên nguy cơ biến chứng xảy ra cao hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.N. Carey, A.P. Durham, W.W. Hauck, et al. (2014), "User verification of precision and estimation of bias", *The Clinical and Laboratory Standards Institute*, **3**, pp.1-14.
- [2] P.Q. Tuan (2019), *Research on the diagnostic role of serum IMA in combination with hs-Troponin T in patients with acute coronary syndrome*, Doctoral thesis in medicine, University of Medicine and Pharmacy, Hue University, 170pp (in Vietnamese).
- [3] A.R. Chapman, T. Fujisawa, K.K. Lee, et al. (2018), "Novel high-sensitivity cardiac Troponin I assay in patients with suspected acute coronary syndrome", *BMJ Journal Heart*, **8**, pp.1-7, DOI: 10.1136/heartjnl-2018-314093.
- [4] N.T. Khoa, B.H. Hoang (2021), "Diagnostic value of hs-Troponin T at 0-1 h in patients with chest pain coming to the emergency room", *Vietnam Medical Journal*, **509(1)**, pp.172-176, DOI: 10.51298/vmj.v509i1.1727 (in Vietnamese).
- [5] M. Roffi, C. Patrono, C. Mueller, et al. (2016), "2015 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent st-segment elevation of the european society of cardiology (ESC)", *European Heart Journal*, **37(3)**, pp.267-315, DOI: 10.1093/eurheartj/ehv320.
- [6] J. Boeddinghaus, R. Twerenbold, T. Nestelberger, et al. (2018), "Clinical validation of a novel high-sensitivity cardiac Troponin I assay for early diagnosis of acute myocardial infarction", *Clinical Chemistry*, **64(9)**, pp.1347-1360, DOI: 10.1373/clinchem.2018.286906.

Phân lập, tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng kích thích sinh trưởng và đối kháng chống lại nấm bệnh *Fusarium oxysporum* và tuyến trùng nốt sừng *Meloidogyne* sp. ở Việt Nam

Lê Thị Thanh Tâm^{1*}, Phạm Thị Lương¹, Lê Thị Phương Thảo¹, Jennifer Jähne², Peter Lasch², Rainer Borriss³

¹Viện Bảo vệ Thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Việt Nam· Phố Viên, phường Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

²Trung tâm ZBS6, Viện Nghiên cứu Robert Koch, CHLB Đức, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

³Viện Công nghệ Sinh học Biển, CHLB Đức, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

Ngày nhận bài 21/11/2022; ngày chuyển phản biện 24/11/2022; ngày nhận phản biện 16/12/2022; ngày chấp nhận đăng 20/12/2022

Tóm tắt:

Cà chua và cà phê là những cây trồng và cây công nghiệp rất quan trọng ở Việt Nam. Tuy nhiên, cả hai loại cây này đều bị gây hại nặng bởi nấm bệnh *Fusarium oxysporum* và tuyến trùng nốt sừng *Meloidogyne* sp. Cho đến nay, chưa có nhiều chế phẩm sinh học vừa phòng bệnh hiệu quả vừa an toàn với sức khỏe con người và môi trường. Với mục tiêu tìm ra các tác nhân hữu ích để sản xuất thử nghiệm các chế phẩm sinh học trong phòng trừ bệnh nấm và tuyến trùng gây hại, nghiên cứu này đã phân lập, tuyển chọn và xác định được 3 chủng vi khuẩn bản địa có triển vọng trong phòng trừ nấm bệnh và tuyến trùng gây hại vùng rễ cây cà chua, cà phê và kích thích sinh trưởng (KTST) cây trồng, gồm các chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* được ký hiệu là S1, S2 và TL7 bằng giải trình tự toàn bộ bộ gen vi khuẩn với các mã GenBank lần lượt là VEW000000000, VEWX000000000 và VEZW000000000.

Từ khóa: *Bacillus velezensis*, cà chua, cà phê, chỉ số bệnh, *Fusarium oxysporum*, *Meloidogyne* sp., tuyến trùng nốt sừng rễ.

Chỉ số phân loại: 4.1

Isolation, selection and identification of indigenous bacterial strains having the ability to promote plant growth and antagonise the fungal disease *Fusarium oxysporum* and root-knot nematode *Meloidogyne* sp. in Vietnam

Thi Thanh Tam Le^{1*}, Thi Luong Pham¹, Thi Phuong Thao Le¹, Jennifer Jähne², Peter Lasch², Rainer Borriss³

¹Plant Protection Research Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences, Vietnam, Vien Street, Duc Thang Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

²Proteomics and Spectroscopy Unit (ZBS6), Centre for Biological Threats and Special Pathogens, Robert Koch Institute, Germany, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

³Institute of Marine Biotechnology e.V., Germany, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

Received 21 November 2022; revised 16 December 2022; accepted 20 December 2022

Abstract:

Tomato and coffee are very important crops and industrial plants in Vietnam. However, both are severely damaged by the fungus *F. oxysporum* and the knot root nematode *Meloidogyne* sp. To date, there are not many biological products that are both effective for prevention and safe for human health and the environment. With the goal of finding beneficial agents for experimental bioproduction in the prevention and suppression of harmful fungal and nematode diseases, this study isolated, selected and identified three indigenous bacterial strains with potential in both plant growth promotion plant and the control of fungal diseases and nematodes harmful to the roots of tomato plants, and ability in plant growth promotion, including strains of *Bacillus velezensis* TL7, S1 and S2 by sequencing the whole bacterial genome with GenBank codes VEW000000000, VEWX000000000 and VEZW000000000, respectively.

Keywords: *Bacillus velezensis*, coffee, disease index, *Fusarium oxysporum*, *Meloidogyne* sp., root-knot nematode, tomato.

Classification number: 4.1

1. Đặt vấn đề

Cà chua là loại rau ăn quả có giá trị dinh dưỡng cao được trồng phổ biến quanh năm ở khắp các vùng khí hậu khác nhau của Việt Nam. Theo số liệu của tổ chức GAP (Quy trình thực hành sản xuất nông nghiệp tốt - Good Agricultural Practices),

năm 2011 Việt Nam đứng thứ 27 trên toàn cầu về sản lượng cà chua xuất khẩu, với tổng giá trị 2.417.000 USD. Tuy nhiên, xuất khẩu cà chua của Việt Nam đã giảm 30,7% trong năm 2011-2014 chủ yếu do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh, nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây bệnh nốt sừng rễ cũng như là tác

*Tác giả liên hệ: Email: lethithanhtam.bvtv@gmail.com

nhân tấn công mở đường cho bệnh nấm và vi khuẩn gây hại thêm nghiêm trọng. Tiềm năng thị trường xuất khẩu của cà chua Việt Nam rất lớn, tuy nhiên cũng như nhiều cây trồng khác, việc sản xuất bị hạn chế đáng kể bởi bệnh hại nông nghiệp và ảnh hưởng của biến đổi khí hậu. Cà phê là cây công nghiệp quan trọng ở Việt Nam đã từng được xuất khẩu đứng thứ 2 trên thế giới chỉ sau Brazil. Tuy nhiên, theo số liệu của Tổng cục Thống kê, năm 2015 sản xuất cà phê đã bị sụt giảm 20% sản lượng, tương đương giá trị kim ngạch xuất khẩu giảm 13% so với 2014. Thiệt hại gây ra chủ yếu bởi nấm bệnh *F. oxysporum* và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. khiến cây bị vàng lá, thối rễ, mất năng suất. Trước đây, các loại thuốc hóa học bảo vệ thực vật được sử dụng để phòng trừ bệnh trên cây cà phê nhưng đã bị hạn chế hoặc cấm do để lại dư lượng độc tố không đảm bảo sức khỏe con người và môi trường tự nhiên, cũng như các sản phẩm cà phê tạo ra không đủ điều kiện xuất khẩu sang các quốc gia phát triển.

Trên thế giới, việc sử dụng các chế phẩm sinh học làm từ các chủng vi khuẩn *Bacillus* nội sinh hoặc vùng rễ có khả năng KTST cây trồng và diệt trừ nguồn nấm bệnh và tuyến trùng gây hại thay thế cho các hóa chất nông nghiệp như phân bón, thuốc hóa học bảo vệ thực vật đang là xu hướng phát triển [1-3]. Các vi khuẩn này thường tác động thông qua việc tiết ra các hợp chất có khả năng KTST như indole-3-acetic acid (IAA), phytase, các hợp chất bay hơi [4-6] cùng các hoạt chất sinh học tự nhiên có tác dụng kháng vi khuẩn nấm bệnh như bacillomycinD và fengycin [7] hay plantazolicin trừ tuyến trùng [8-10]. Ở Việt Nam bước đầu có một số nghiên cứu sử dụng các chế phẩm sinh học từ vi khuẩn, giúp giảm việc sử dụng phân hóa học, an toàn với môi trường và giảm chi phí sản xuất [11]. Tuy nhiên, việc sử dụng các chế phẩm sinh học để phòng trừ các tác nhân nấm và tuyến trùng gây bệnh trên các cây trồng nói chung và cây cà chua, cây cà phê nói riêng với hiệu quả cao, ổn định chưa có nhiều vì chưa tìm được nhiều chủng vi khuẩn bản địa có đồng thời cả khả năng KTST và hoạt tính đối kháng cao với nấm bệnh và tuyến trùng.

Do vậy nghiên cứu này được thực hiện nhằm sàng lọc, tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có cả khả năng KTST và đối kháng với nấm và tuyến trùng gây bệnh nốt sần trên cây cà chua, bệnh vàng lá thối rễ trên cây cà phê.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Địa điểm thu thập nguồn mẫu

Chủng nấm *F. oxysporum* gây bệnh vàng lá cà phê cùng các chủng vi khuẩn bản địa đã được phân lập từ các mẫu đất vùng rễ cây cà phê, thân lá cây cà phê thu thập tại Đà Lạt, Lâm Đồng và Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk, các mẫu đất, thân, lá cây ký chủ khác thu thập được ở các vùng khác (bảng 1) sau đó được làm thuần, lưu giữ tại Bộ môn Bệnh cây và Miễn dịch thực vật, Viện Bảo vệ Thực vật.

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn bản địa có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh và tuyến trùng gây hại trên cây cà phê.

STT	Chủng vi khuẩn	Hình thái khuẩn lạc	Vị trí lấy mẫu	Địa điểm thu thập mẫu
1	TL7	Tròn, nhúm và lõm ở giữa, màu trắng đục, nhầy nhớt	Thân lá non cây cà phê khỏe	Cầu Đất, Đà Lạt, Lâm Đồng
2	S1	Tròn, có hình tròn nhỏ lõm ở giữa, có viền rìa xung quanh, có tia ít, màu trắng kem	Đất vùng rễ cây cà phê	Hoài Đông, Krông Pak, Đắk Lắk
3	S2	Tròn, có hình tròn nhỏ lõm ở giữa, có viền rìa xung quanh, có tia nhiều, màu trắng kem	Đất vùng rễ cây cà phê	Ea Tiêu, Cu Kuin, Đắk Lắk
4	A22	Hình thủy lá, trắng kem, có bụi bào tử trên bề mặt, có tia quanh rìa khuẩn lạc	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Ea Tiêu, Cu Kuin, Đắk Lắk
5	CD3-6	Tròn, màu trắng kem	Mẫu đất xung quanh rễ cây cà phê ở vườn rau hữu cơ	Xuân Thượng, Bái Thượng, Sóc Sơn, Hà Nội
6	CD3-1	Tròn, màu trắng kem	Mẫu đất xung quanh rễ cây cà phê ở vườn rau hữu cơ	Xuân Thượng, Bái Thượng, Sóc Sơn, Hà Nội
7	A35	Tròn, có viền gờ xung quanh rìa, màu trắng vàng	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Vĩnh Thành, Vĩnh Linh, Quảng Trị
8	A25	Tròn, lõm, nhúm, có vòng viền rìa bao quanh, màu trắng đục, nhớt	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Vĩnh Thành, Vĩnh Linh, Quảng Trị
9	A24	Tròn, bề mặt phủ bột mịn bào tử, có nhiều tia xung quanh, trắng kem	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Vĩnh Thành, Vĩnh Linh, Quảng Trị
10	A31	Tròn, bề mặt lõm có bột bào tử, ở giữa có thể có giọt nhớt lỏng, có rìa viền tròn bao quanh, màu trắng đục, nhớt	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Vĩnh Thành, Vĩnh Linh, Quảng Trị
11	A8	Tròn khi nhỏ, khi to, phát triển có hình thủy lá, trắng kem, có bụi bào tử trên bề mặt, có tia quanh rìa khuẩn lạc	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Ea Tiêu, Cu Kuin, Đắk Lắk
12	KT1	Tròn, nhúm nhúm ở giữa, trắng đục, trong suốt, lỏng nhớt	Đất vùng rễ cây hồ tiêu khỏe	Chư Sê, Gia Lai
13	CD3-5	Tròn, màu trắng kem	Mẫu đất xung quanh rễ cây cà phê ở vườn rau hữu cơ	Xuân Thượng, Bái Thượng, Sóc Sơn, Hà Nội
14	SN4-3	Tròn, màu trắng kem	Sâu yếu trên cây ngô ở vườn nhà không dùng thuốc và phân bón hóa học	Xuân Thượng, Bái Thượng, Sóc Sơn, Hà Nội

Tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây nốt sần trên cây cà phê cũng được thu thập tại Đà Lạt, Lâm Đồng và Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk, lưu giữ và nhân nguồn tại nhà lưới Bộ môn Bệnh cây và Miễn dịch thực vật, Viện Bảo vệ Thực vật.

2.2. Vật liệu, hóa chất nghiên cứu

Hạt giống *Arabidopsis thaliana* dòng Col-0 được nhập khẩu từ Mỹ vào Việt Nam.

Tuyến trùng *Caenorhabditis elegans* N2 (Carolina - USA, code 173500) ăn *Escherichia coli* OP50 (In stock Freezedried OP50 Vials 40 Units (LabTIE), code 1.17.040).

Hạt giống cây cà chua hè chịu nhiệt được mua ở Công ty Giống cây trồng Hà Nội.

Các hóa chất, dụng cụ dùng để tách chiết gDNA, giải trình tự gen, khử trùng, môi trường nuôi cấy mua từ các công ty hóa chất của Đức, Mỹ, Anh và Trung Quốc.

Địa điểm thực hiện thí nghiệm: Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn cho các thử nghiệm trong phòng và nhà lưới được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm của Bộ môn Bệnh cây và Miễn dịch thực vật, Viện Bảo vệ Thực vật. Các thí nghiệm giải trình tự toàn bộ bộ gen vi khuẩn (Whole genome sequencing - WGS) được thực hiện tại Viện Bảo vệ Thực vật và Viện Nghiên cứu Robert Koch (Robert Koch Institute - RKI) cùng Viện Công nghệ Sinh học biển (IMab) tại Đức.

2.3. Thu thập, phân lập mẫu

Thu thập, phân lập mẫu vi khuẩn nội sinh theo theo phương pháp nghiên cứu của X. Wang và cs (2014) [12], trong đó mẫu lá, thân và rễ được lấy từ các cây không bị nhiễm bệnh và biểu hiện sức sống khỏe mạnh trong vườn cà phê bị bệnh. Các vi khuẩn vùng rễ được phân lập từ các mẫu đất theo phương pháp của L.W. Burgess và cs (2009) [13].

2.4. Tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh *F. oxysporum*

Sàng lọc nhanh các chủng vi khuẩn có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh như phương pháp của S.H. Ji và cs (2013) [14] với một số điều chỉnh nhỏ như sau:

Đánh giá nhanh hoạt tính đối kháng với nấm bệnh *F. oxysporum* của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập. Một mẫu thạch agar (đường kính 5 mm) chứa nấm bệnh *F. oxysporum* được đặt ở trung tâm của đĩa thạch PDA. Các chủng vi khuẩn cần kiểm tra được nuôi cấy trong môi trường LB (Luria - Bertani) lỏng sau 2 ngày nuôi cấy ở 28°C. Đặt các đĩa giấy hình tròn (đường kính 5 mm) đã được khử trùng vào trong các đĩa PDA này và nhỏ 100 µl dung dịch của mỗi chủng vi khuẩn được kiểm tra vào mỗi đĩa giấy, trong khi đối chứng chỉ nhỏ môi trường LB. Sau đó, các đĩa được ủ ở 28°C trong 7 ngày. Hoạt tính kháng nấm được chỉ ra khi vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh đĩa giấy được nhỏ dung dịch vi khuẩn bản địa được kiểm tra. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi chủng vi khuẩn được sàng lọc.

Sử dụng phương pháp đối kháng trực tiếp để khảo sát đặc tính đối kháng với nấm *F. oxysporum*. Trước thử nghiệm, chủng nấm *F. oxysporum* được nhân nuôi 5 ngày trên môi trường PDA và các chủng vi khuẩn cũng được nhân nuôi 2 ngày trong môi trường LB lỏng trước thử nghiệm. Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa thạch PDA. Tiến hành cấy 1 chủng vi khuẩn ở tâm đĩa và đặt khoanh khuẩn ty nấm với đường kính 5 mm ở 2 bên của chủng vi khuẩn, cách mép đĩa 1/3 bán kính đĩa, công thức đối chứng không được cấy vi khuẩn. Sau 7 ngày đánh giá khả năng đối kháng thông qua hiệu quả ức chế (%) theo công thức sau:

$$H = [(Ddc - D)/Ddc] \times 100$$

trong đó H: hiệu quả ức chế (%); D: kích thước tán nấm bệnh trung bình trên đĩa đối kháng; Ddc: đường kính tán nấm bệnh trung bình trên đĩa đối chứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi chủng vi khuẩn cần chọn lọc, kết quả là giá trị trung bình cộng của các lần lặp lại.

2.5. Tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn có khả năng KTST thông qua cây mô hình *A. thaliana*

Thử nghiệm đánh giá khả năng tăng cường KTST cây trồng với hạt giống cây *A. thaliana* theo phương pháp của A. Budiharjo và cs (2014) [15]. Các hạt *A. thaliana* được cho vào trong ống eppendorf có chứa 1 ml dung dịch 10% sodium hypochlorite lắc trong 3 phút. Sau đó dùng pipet hút loại bỏ dung dịch sodium hypochlorite, rửa lại bằng nước cất vô trùng và lặp lại các bước khử trùng 4 lần. Các hạt đã khử trùng được đặt trên các đĩa petri chứa môi trường Murashige và Skoog (MS) với nồng độ các chất giảm 50% so với ban đầu cùng 0,6% agar, 3% sucrose và để nảy mầm trong 7 ngày ở 22°C. Sau 7 ngày nhổ các cây con *A. thaliana* và nhúng rễ vào trong huyền phù vi khuẩn (1×10^5 CFU/ml) trong 5 phút và 5 cây con được chuyển vào trong các đĩa petri chứa môi trường MS đã được chuẩn bị ở trên với 1% agar. Sau đó, các đĩa này được đặt trong buồng sinh trưởng ở 22°C với quang chu kỳ 14 giờ. Sau 21 ngày tiến hành cân trọng lượng của các cây *A. thaliana* để đánh giá khả năng KTST của các chủng vi khuẩn thí nghiệm.

2.6. Thử nghiệm hoạt tính đối kháng chống lại tuyến trùng

Thử nghiệm hoạt tính đối kháng chống lại tuyến trùng thông qua mô hình tuyến trùng sinh học *Caenorhabditis elegans* N2 sử dụng thức ăn là vi khuẩn *E. coli* OP50 theo phương pháp của Z. Liu và cs (2013) [16] với một số thay đổi nhỏ được chi tiết như sau: Sau khi nuôi cấy qua đêm, 50 µl *E. coli* OP50 được cung cấp làm thức ăn cho *C. elegans* trên các đĩa thạch chứa môi trường sinh trưởng tuyến trùng (NGM) [50 mM NaCl, 0,25% (w/v) peptone, 1 mM CaCl₂, 5 µg/ml cholesterol, 25 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄ và 1,7% (w/v) agar]. Chủng Bristol N2 của *C. elegans* được nuôi cấy trong 2-3 ngày ở 20°C trên nền vi khuẩn. Khi đủ trứng tuyến trùng (20-50 trứng/cm²) đem rửa bằng 4 ml môi trường M9 đã khử trùng (5,8 g Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g KH₂PO₄, 5 g NaCl, 0,25 g MgSO₄·7H₂O) từ một đĩa thạch NGM và tiếp tục rửa thường xuyên trong môi trường M9 để giảm bớt nồng độ vi khuẩn. Sau khi loại bỏ dung dịch lỏng phía trên, xử lý bằng alkaline hypochlorite được thực hiện để tách các trứng với 1-1,5 ml dung dịch tẩy rửa có khả năng dung giải (5 M NaOH 0,3 ml, 8% NaClO 1,2 ml, dung dịch H₂O 3,5 ml). Các trứng được rửa lại lần nữa bằng môi trường M9, sau đó được ủ trong 4-5 ml môi trường M9 medium ở 25°C trong 18 giờ để nhận được tuyến trùng giai đoạn ấu trùng tuổi 1 (L1). Các L1 này sau đó được chuyển lại tới các đĩa thạch NGM chứa *E. coli* OP50 và được ủ ở 25°C trong 2-3 ngày tới giai đoạn tuổi 4 (L4). Các L4 được sử dụng cho các thử nghiệm sinh học đối kháng tuyến trùng.

Tất cả thử nghiệm chết nhanh và chết chậm đều được thực hiện [17-19] như sau: Trong thử nghiệm diệt chậm, sấp xỉ 60 tuyến trùng L4 *C. elegans* được thêm vào các đĩa NGM chứa nền vi khuẩn cần được kiểm tra khả năng đối kháng với tuyến trùng. Các tuyến trùng sau đó được ủ ở 25°C và kiểm tra kết quả sau 24, 48 và 72 giờ. Trong thử nghiệm diệt nhanh, các chủng vi khuẩn kiểm tra được nuôi cấy qua đêm ở 37°C và lắc ở 200

rpm trong 3 ml môi trường lỏng thí nghiệm (4,0 g NaCl, 2,5 g peptone, 5,0 g tryptone, 2,5 g yeast extract, 5 mg cholesterol, 7,5 ml glycerol, thêm nước tới 1 lít). Sau đó, mỗi 100 µl dung dịch nuôi cấy vi khuẩn được pha loãng bằng môi trường M9 tới 600 µl và chuyển vào mỗi giếng bên trong bản nhựa chứa 12 giếng. Mỗi giếng được cho khoảng 60 tuyến trùng L4 ủ trong 24 giờ ở 25°C. Trong các thí nghiệm sinh học này, các tuyến trùng được xem là chết khi không di chuyển hoặc phản ứng khi bị chạm nhẹ bởi kim. Tỷ lệ chết của tuyến trùng được xác định như tỷ số của các tuyến trùng chết trên tổng số tuyến trùng thả trong 1 giếng thí nghiệm. Tất cả các thử nghiệm sinh học được thực hiện trong 3 lần lặp riêng biệt.

2.7. Thử nghiệm hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn bản địa chống lại tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây bệnh nốt sừng trên rễ cây cà chua trong nhà lưới

Tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây bệnh hại cà phê được chuẩn bị theo phương pháp của D.J. Hooper và cs (2005) [20], sau đó nhân lên bằng các cây cà chua sạch bệnh theo phương pháp của J.A.L. Pérez và cs (2011) [21] với những biến đổi như sau: Hạt giống cây cà chua được khử trùng bề mặt bằng 70% ethanol trong 5 phút, sau đó bằng NaOCl 1% trong 15 phút và được rửa lại 4 lần bằng nước cất khử trùng để loại bỏ dư lượng NaOCl 1%. Sau đó, hạt giống cây cà chua được gieo trong các chậu đất đã được khử trùng và được thêm 200 con tuyến trùng tuổi 2 (J2) vào trong mỗi chậu đất. Chăm sóc cây tới 1 tháng tuổi, nhổ rễ cây và thu thập các rễ có nốt sừng. Các rễ này được rửa dưới vòi nước chảy sau đó khử trùng bằng NaOCl 4% trong 5 phút, sau đó rửa lại 3 lần bằng nước cất đã khử trùng. Sử dụng kim để nhấc túi trứng bên trong nốt sừng ở rễ cà chua ra, ủ trong nước cất được khử trùng và cung cấp với oxy ở nhiệt độ phòng tới khi trứng nở (6-10 ngày). Thu thập tuyến trùng J2 từ các trứng được thu lại trong các rây lưới lọc 500 µm và rửa nhẹ bằng nước vòi trong 5 phút [22].

Do yêu cầu nhiệt độ của các cây cà chua, thử nghiệm được thiết lập trong nhà lưới có nhiệt độ trung bình khoảng 28°C, giống cà chua được sử dụng là giống xuân hè chịu nhiệt, được trồng trong các chậu đất có pH 7,5 (kiềm nhẹ), lượng phân bón MO: 0,5% (thấp), NH₄ 15,0 (thấp), P 32,0 (cao) và K 0,80 (cao).

Chủng nấm vi khuẩn và tuyến trùng theo thứ tự trong quy trình như sau: Các hạt cà chua được khử trùng tương tự như trong bước nhân nguồn cho tuyến trùng, sau đó được gieo vào các khay chứa đất khử trùng tới khi mọc lên được 2 lá thật hay khoảng 2 tuần sau gieo, các cây con được chuyển vào trong các chậu đất đường kính 20 cm chứa 1 kg đất đã được hấp khử trùng. Sau 2 tuần chuyển cây vào chậu, xử lý các chủng vi khuẩn bản địa cần kiểm tra về khả năng đối kháng với tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trên cây cà chua ở mật độ 3,65x10⁸ CFU/ml; công thức đối chứng: không xử lý vi khuẩn. Sau 2 tuần xử lý chủng vi khuẩn tiềm năng, chủng nấm 1000 con tuyến trùng J2 *Meloidogyne* sp. được chuyển vào trong mỗi chậu trồng cà chua của cả công thức xử lý và công thức đối chứng [23].

Sau 2,5 tháng, thu rễ cây cà chua và đánh giá cấp bệnh tuyến trùng *Meloidogyne* sp. theo thang phân cấp của J. Bridge và S.L.J. Page (1980) [24], trong đó chỉ số bệnh (CSB, %) được tính bằng tổng của các tích số cây bị bệnh nhân với cấp bệnh tương ứng chia cho tổng số cây điều tra nhân với cấp bệnh cao nhất trong thang phân cấp, sau đó nhân với 100. Tính hiệu quả (%) trong công thức so sánh với đối chứng như sau:

$$\text{Hiệu quả (\%)} = [(\text{Đối chứng} - \text{Công thức}) / \text{Đối chứng}] \times 100$$

trong đó hiệu quả (%): hiệu quả của việc phòng chống bệnh tuyến trùng *Meloidogyne* sp. của các chủng vi khuẩn trong so sánh với đối chứng không xử lý chủng vi khuẩn; đối chứng: số tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong 100 g đất vùng rễ hoặc trong 5 g rễ cây cà chua hoặc CSB nốt sừng cà chua ở công thức đối chứng không xử lý chủng vi khuẩn nào; công thức: số tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong 100 g đất vùng rễ hoặc trong 5 g rễ cây cà chua hoặc CSB nốt sừng cà chua ở các công thức xử lý các chủng vi khuẩn.

2.8. Định danh các chủng vi khuẩn bằng WGS

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên các đĩa chứa môi trường LB agar, các khuẩn lạc đơn được lựa chọn sau 24 giờ ở 37°C. DNA bộ gen vi khuẩn được tách chiết sử dụng kit The DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Giải trình tự được tiến hành ở LGC Genomics (Berlin, Germany) với hệ thống Illumina HiSeq sử dụng việc đọc các đoạn 150 bp được bắt cặp cuối. Các tham số được mặc định đặt trước được sử dụng cho tất cả các phần mềm trừ khi được chỉ ra cụ thể. Phần mềm tính toán khoảng cách từ bộ gen tới bộ gen (Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) v2.1 cung cấp bởi DSMZ (<http://ggdc.dsmz.de>) được sử dụng cho việc phân biệt loài dựa trên bộ gen được đánh giá thông qua các giá trị lai DNA-DNA (dDDH) đối với một bộ gen tham khảo đối chứng [25, 26].

2.9. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng Excel, phần mềm phân tích thống kê Statistical Analysis Systems (SAS) và phân tích phương sai (ANOVA).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Điều tra, thu thập và phân lập mẫu

Các chủng vi sinh có khả năng đối kháng với nấm *F. oxysporum* và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây cà phê thuộc tỉnh Lâm Đồng, Đắk Lắk được thu thập. Từ 50 mẫu rễ và đất đã thu thập phân lập được 14 chủng vi khuẩn với các đặc điểm nhận dạng *Bacillus* như: trực khuẩn hình que, gram dương, sinh nội bào tử, di động, khuẩn lạc tròn hoặc tròn méo, có màu trắng trong đến trắng đục, rìa tròn đều, lượn sóng hoặc răng cưa (bảng 1).

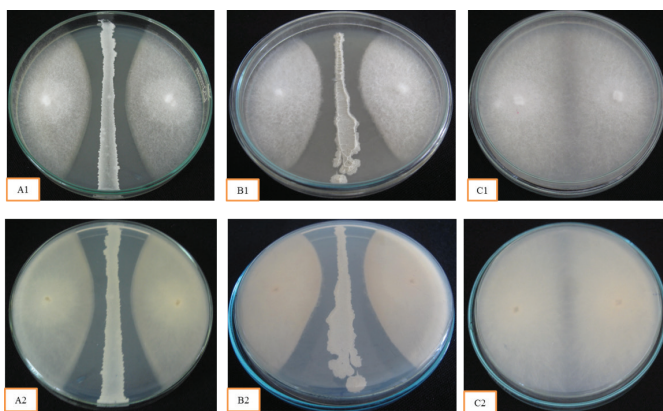
3.2. Tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn có tiềm năng đối kháng với nấm *F. oxysporum*

Kết quả thử nghiệm đánh giá khả năng đối kháng nấm bệnh *F. oxysporum* của các chủng *Bacillus* xác định thông qua hiệu quả ức chế cho thấy, 100% các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm bệnh *F. oxysporum*, hiệu quả ức chế đạt 4,73-88,83%. Trong đó, 4 chủng vi khuẩn ký hiệu là KT1, TL7, S1 và S2 có hoạt tính đối kháng nấm bệnh *F. oxysporum* mạnh nhất với hiệu quả ức chế lần lượt là 88,83, 79,11, 69,76 và 60,42% (bảng 2, hình 1).

Bảng 2. Khả năng đối kháng nấm bệnh *F. oxysporum* gây bệnh văng lá cà phê của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập được.

STT	Chủng vi khuẩn	Bán kính tán nấm (mm)	Hiệu quả ức chế (%)
1	TL7	4,49 ^k	79,11 ^b
2	S1	6,5 ^j	69,76 ^c
3	S2	8,53 ⁱ	60,42 ^d
4	A22	11,53 ^e	46,41 ^f
5	CD3-6	19,53 ^c	9,36 ^g
6	CD3-1	18,75 ^{cd}	13,04 ^g
7	A35	12,57 ^f	41,58 ^e
8	A25	10,57 ^h	50,88 ^e
9	A24	20,54 ^b	4,73 ^k
10	A31	17,57 ^c	18,47 ^h
11	A8	19,54 ^c	9,37 ^j
12	KT1	2,41 ^l	88,83 ^a
13	CD3-5	18,49 ^{de}	14,20 ^g
14	SN4-3	19,53 ^c	9,40 ^j
15	Đối chứng	21,56 ^d	0 ^l
	LSD 5%	0,93	1,78
	CV %	3,93	3,09

Nhóm Duncan được thực hiện trong quy trình ANOVA với t Tests (LSD=5%), trong đó các giá trị trung bình trong cùng một cột được phân lớp có chữ giống nhau thì không khác nhau về mặt ý nghĩa thống kê.



Hình 1. Hình ảnh về thử nghiệm khả năng đối kháng của một số chủng vi khuẩn bản địa với nấm *F. oxysporum*. (A1-A2) Ảnh chụp đối kháng nấm của chủng vi khuẩn S1 từ mặt trước và mặt sau của đĩa thử nghiệm; (B1-B2) Ảnh chụp đối kháng nấm của chủng vi khuẩn TL7 từ mặt trước và mặt sau của đĩa thử nghiệm; (C1, C2) Ảnh chụp mặt trước và mặt sau của đĩa đối chứng chỉ có nấm *F. oxysporum* cấy đối xứng.

Nhằm xác định nhanh tiềm năng đối kháng với tuyến trùng gây bệnh của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập được trong điều kiện phòng thí nghiệm, các thử nghiệm giết chết nhanh và giết chết chậm tuyến trùng được thực hiện thông qua mô hình tuyến trùng sinh học *C. elegans*. Kết quả được thể hiện ở bảng 3 và hình 2 cho thấy 100% các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng thông qua tỷ lệ chết nhanh tuyến trùng đạt 15,37-100%, trong đó 3 chủng vi khuẩn ký hiệu là TL7, S2 và S1 có hoạt tính đối kháng tuyến trùng *C. elegans* mạnh nhất với tỷ lệ chết nhanh lần lượt là 100, 98,52 và 97,59%, trong khi chủng KT1 chỉ đạt tỷ lệ chết nhanh là 55,74%. Tỷ lệ chết chậm ở 4 chủng vi khuẩn này có chiều hướng tương tự và giá trị thấp hơn tỷ lệ chết nhanh.

Bảng 3. Tiềm năng đối kháng với tuyến trùng của các chủng vi khuẩn bản địa thông qua mô hình tuyến trùng *C. elegans*.

STT	Chủng vi khuẩn	Tỷ lệ chết nhanh (sau 24 giờ) (%)	Tỷ lệ chết chậm (sau 72 giờ) (%)
1	TL7	100,00 ^a	76,41 ^a
2	S1	97,59 ^a	69,15 ^c
3	S2	98,52 ^a	72,96 ^b
4	A22	28,7 ^e	23,71 ^e
5	CD3-6	30,74 ^e	22,82 ^b
6	CD 3-1	21,85 ^f	14,44 ⁱ
7	A35	58,52 ^c	51,33 ^e
8	A25	56,85 ^c	50,29 ^{ef}
9	A24	57,41 ^c	48,67 ^f
10	A31	51,85 ^d	26,52 ^g
11	A8	23,15 ^f	21,86 ^b
12	KT1	55,74 ^c	48,93 ^f
13	CD3-5	15,37 ^g	10,89 ^j
14	SN4-3	74,07 ^b	58,26 ^d
15	Đối chứng	0,00 ^h	0,00 ^k
	CV	4,01	3,9
	LSD	3,44	2,81

Nhóm Duncan được thực hiện trong quy trình ANOVA với t Tests (LSD=5%), trong đó các giá trị trung bình trong cùng một cột được phân lớp có chữ giống nhau thì không khác nhau về mặt ý nghĩa thống kê.

3.3. Tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng KTST cây trồng thông qua cây mô hình *A. thaliana*

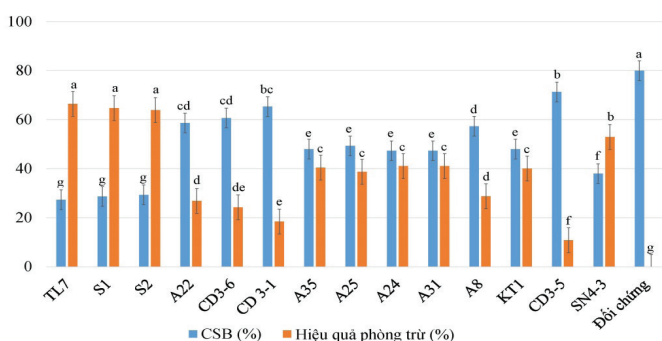
Đã có nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước sử dụng cây *A. thaliana* để đánh giá khả năng thúc đẩy tăng trưởng cây trồng của các PGPR. Ở Việt Nam, kết quả nghiên cứu của C.N. Thanh và cs (2018) [11] cho thấy, 2 chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. P112 và P113 có khả năng KTST rễ và chồi của cây *A. thaliana* gấp 4,1-4,9 và 2,3-2,5 lần so với đối chứng. Ở thí nghiệm này, cây mô hình *A. thaliana* được sử dụng để đánh giá khả năng KTST cây trồng của 14 chủng vi khuẩn *Bacillus* đã được tuyển chọn, kết quả ghi nhận được 4/14 chủng có khả năng KTST của cây *A. thaliana* vượt trội so với đối chứng gồm S1, S2, A35 và TL7 thể hiện qua phần trăm tăng trọng lượng so với cây ở công thức đối chứng không xử lý lần lượt là 34,16, 32,68, 27,09 và 25,21% (bảng 4).

Bảng 4. Thử nghiệm khả năng kích thích sinh trưởng của vi khuẩn bản địa thông qua mô hình cây *A. thaliana*.

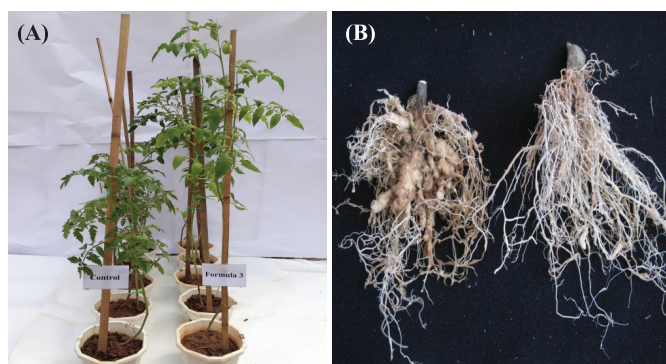
STT	Chủng vi khuẩn	Trọng lượng cây (mg)	% tăng so với đối chứng
1	TL7	158,20 ^b	25,21 ^d
2	S1	169,70 ^a	34,16 ^a
3	S2	167,90 ^a	32,68 ^b
4	A22	133,5 ^c	5,56 ^e
5	CD3-6	128,02 ^{cd}	1,22 ⁱ
6	CD 3-1	128,65 ^{cd}	1,71 ^{hi}
7	A35	160,63 ^b	27,09 ^c
8	A25	130,61 ^{cd}	3,22 ^e
9	A24	132,25 ^{cd}	4,58 ^f
10	A31	129,37 ^{cd}	2,24 ^h
11	A8	129,52 ^{cd}	2,37 ^h
12	KT1	129,47 ^{cd}	2,32 ^h
13	CD3-5	130,86 ^{cd}	3,43 ^e
14	SN4-3	131,25 ^{cd}	3,73 ^e
15	Đối chứng	126,52 ^c	0,00 ^j
	LSD 5%	6,01	0,67
	CV %	2,59	4,04

Nhóm Duncan được thực hiện trong quy trình ANOVA với t Tests (LSD=5%), trong đó các giá trị trung bình trong cùng một cột được phân lớp có chữ giống nhau thì không khác nhau về mặt ý nghĩa thống kê.

Tuyến trùng nốt rỗ như *Meloidogyne* sp. là một trong các tác nhân gây thiệt hại nhất trên cây trồng nông nghiệp nhiệt đới ở Việt Nam, trong đó có cà chua và cà phê. Bản thân cây cà chua được sử dụng như cây chỉ thị và nhân nguồn cho tuyến trùng nốt sừng vì cây cà chua rất dễ nhiễm tuyến trùng và biểu hiện bệnh rõ ràng trong một thời gian ngắn. Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở các công thức thí nghiệm xử lý các chủng vi khuẩn TL7, S1, S2, cây cà chua có CSB thấp lần lượt là 27,33, 28,67 và 29,33%, thấp hơn nhiều so với CSB ở công thức đối chứng là 80%. Nói cách khác, hiệu quả phòng trừ bệnh tuyến trùng nốt sừng trên cây cà chua của 3 chủng vi khuẩn TL7, S1, S2 này so với đối chứng không xử lý lần lượt là 66,46, 64,77 và 63,94% (hình 2 và 3).



Hình 2. Đồ thị biểu diễn hiệu quả giảm bệnh tuyến trùng nốt sừng *Meloidogyne* sp. trên cây cà chua của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập được.



Hình 3. Hiệu quả giảm bệnh tuyến trùng nốt sừng *Meloidogyne* sp. trên cây cà chua của chủng vi khuẩn TL7. (A) Phần cây cà chua trên mặt đất ở đối chứng (bên trái), CT xử lý TL7 (bên phải); (B) Phần rễ cây cà chua ở đối chứng (bên trái), CT xử lý TL7 (bên phải).

3.4. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng KTST và hoạt tính đối kháng cao bằng phương pháp WGS

Từ các thử nghiệm khả năng KTST và đối kháng với nấm bệnh cùng tuyến trùng trong phòng thí nghiệm cũng như thử nghiệm giảm bệnh tuyến trùng nốt sừng trên cà chua trong nhà lưới của Viện Bảo vệ Thực vật, 3 chủng vi khuẩn phân lập từ đất được lựa chọn gồm S1, S2 và TL7 để định danh bằng phương pháp WGS nhằm xác định đến loài. Kết quả lắp ráp trình tự bộ gen được gửi lưu giữ trong ngân hàng gen với các mã và thông số được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả giải trình tự toàn bộ bộ gen của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Ký hiệu chủng vi khuẩn	Mã GenBank	Kích cỡ bộ gen (bp)	G+C (%)	Contig N ₅₀ (bp)	Tổng số các gen	dDDH (%)	AnIb (%)
S1	VEWW000000000	3.866.305	46,1	486.485	3.893	85,80	97,01
S2	VEWX000000000	3.864.301	46,1	397.838	3.893	85,70	97,12
TL7	VEWZ000000000	3.865.047	46,4	428.384	3.879	85,70	97,94

Căn cứ vào giá trị phân biệt loài của AnIb từ 96% trở lên [25] và giá trị phân biệt loài của dDDH từ 70% trở lên [26], trình tự bộ gen của 3 chủng vi khuẩn S1, S2, TL7 đều là chủng *Bacillus velezensis* và chủng tương tự trong ngân hàng gen là *B. velezensis* KCTC13012. Bộ gen của cả 3 chủng vi khuẩn *B. velezensis* này đều chứa đồng thời gen *fen* mã hóa hoạt chất fengycin có tác dụng diệt trừ nấm bệnh và gen *pnz* mã hóa hoạt chất plantazolicin có tác dụng diệt trừ tuyến trùng [11].

4. Kết luận

1. Đã phân lập và tuyển chọn được 5 chủng vi khuẩn *Bacillus* gồm TL7, S1, S2, A35, KT1 từ đất vùng rễ và thân lá cây cà phê có khả năng đối kháng cao với nấm bệnh *F. oxysporum* và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. cũng như có khả năng KTST cây trồng.

2. Ba chủng vi khuẩn gồm S2, S1 và TL7 được tuyển chọn có khả năng phòng trừ tuyến trùng nốt sùng trên cây cà chua với hiệu quả phòng trừ cùng mức phân lớp là 63,94-66,46%.

3. Ba chủng vi khuẩn được định danh đến loài từ việc giải WGS và căn cứ vào các giá trị dDDH và ANI xác định loài đã được tính toán là *B. velezensis* S1, *B. velezensis* S2 và *B. velezensis* TL7 với các mã số đăng ký trên GenBank lần lượt là VEW000000000, VEWX000000000 và VEZW000000000. Cả 3 chủng vi khuẩn đều chứa gen *fen* và *pzn* mã hóa các hoạt chất fengycin và plantazolin có tác dụng diệt trừ nấm bệnh và tuyến trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Lugtenberg, F. Kamilova (2009), "Plant-growth-promoting rhizobacteria", *Ann. Rev. Microbiol.*, **63**, pp.541-556, DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- [2] R. Borriss (2011), "Use of plant-associated bacillus strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture", *Bacteria in Agrobiol.: Plant Growth Responses*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.41-76.
- [3] D.M. Weller (1988), "Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria", *Ann. Rev. of Phytopathol.*, **26**, pp.379-407, DOI: 10.1146/annurev.py.26.090188.002115.
- [4] T. Beric, M. MilanKojic, S. Stankovic, et al. (2012), "Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria", *Food Technol. Biotechnol.*, **50(1)**, pp.25-31.
- [5] E.E. Idris, O. Makarewicz, A. Farouk, et al. (2002), "Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plantgrowth-promoting effect", *Microbiology*, **148(Pt7)**, pp.2097-2109, DOI: 10.1099/00221287-148-7-2097.
- [6] E.E. Idris, D.J. Iglesias, M. Talon, et al. (2007), "Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plantgrowth-promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42", *Mol. Plant Microbe Interact.*, **20**, pp.619-626, DOI: 10.1094/MPMI-20-6-0619.
- [7] C.M. Ryu, M.A. Farag, C.H. Hu, et al. (2003), "Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100(8)**, pp.49274932, DOI: 10.1073/pnas.073084510.
- [8] A. Koumoutsis, X.H. Chen, A. Henne, et al. (2004), "Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42", *J. Bacteriol.*, **186(4)**, pp.1084-1096, DOI: 10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004.
- [9] M.F. Rabbee, M.S. Ali, J. Choi, et al. (2019), "*Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes", *Molecules*, **24(6)**, DOI: 10.3390/molecules24061046.
- [10] B. Fan, C. Wang, X. Song, et al. (2018), "*Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol", *Front. Microbiol.*, **9**, DOI: 10.2289/fmicb.2018.02491.
- [11] C.N. Thanh, N.Y. Nhi, D.N. Diep, et al. (2018), "Evaluating the ability to stimulate plant growth of two *Pseudomonas* strains isolated from the root zone of corn plants", *Journal of Scientific Development and Technology: Journal of Natural Sciences*, **2(2)**, pp.38-46 (in Vietnamese).
- [12] X. Wang, G. Liang (2014), "Control efficacy of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain BZ6-1 against peanut bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*", *BioMed Research International*, **2014**, DOI: 10.1155/2014/465435.
- [13] L.W. Burgess, T.E. Knight, L. Tesoriero, et al. (2009), *Diagnostic Manual for Plant Diseases in Vietnam*, Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR), 212p (in Vietnamese).
- [14] S.H. Ji, N.C. Paul, J.X. Deng, et al. (2013), "Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases", *Mycobiology*, **41(4)**, pp.234-242, DOI: 10.5941/MYCO.2013.41.4.234.
- [15] A. Budiharjo, S.P. Chowdhury, K. Dietel, et al. (2014), "Transposon mutagenesis of the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 revealed that the *nfrA* and *RBAM17410* genes are involved in plantmicrobe-interactions", *PLOS ONE*, **9(5)**, e98267, DOI: 10.1371/journal.pone.0098267.
- [16] Z. Liu, A. Budiharjo, P. Wang, et al. (2013), "The highly modified peptide plantazolin is associated with nematocidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, pp.1081-1090, DOI: 10.1007/s00253-013-5247-5.
- [17] S. Brenner (1974), "The genetics of *Caenorhabditis elegans*", *Genetics*, **77(1)**, pp.71-94, DOI: 10.1093/genetics/77.1.71.
- [18] C.L. Kurz, S. Chauvet, E. Andres, et al. (2003), "Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening", *EMBO J.*, **22(7)**, pp.1451-1460, DOI: 10.1093/emboj/cdg159.
- [19] S. Garvis, A. Munder, G. Ball, et al. (2009), "Caenorhabditis elegans semi-automated liquid screen reveals a specialized role for the chemotaxis gene *cheB2* in *Pseudomonas aeruginosa* virulence", *PLOS Pathog.*, **5(8)**, DOI: 10.1371/journal.ppat.1000540.
- [20] D.J. Hooper, J. Hallmann, S.A. Subbotin (2005), "Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes", *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, DOI: 10.1079/9780851997278.00.
- [21] J.A.L. Pérez, M. Escuer, M.A.D. Rojo, et al. (2011), "Host range of *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 (Nematoda: Meloidogynidae) in Spain", *Nematropica*, **41**, pp.130-140.
- [22] N.S.E. Sandoval, M.M.E. Guadalupe, J.L.J. Nakayo, et al. (2020), "Effect of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) and *Trichoderma harzianum* (Rifai) on *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.)", *Acta Scientiarum Biological Sciences*, **42**, pp.1-8, DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v42i1.47522.
- [23] F. Gharabadiyan, S. Jamali, A.A. Yazdi, et al. (2012), "Source of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato cultivars", *Journal of Agricultural Technology*, **8(6)**, pp.2011-2021.
- [24] J. Bridge, S.L.J. Page (1980), "Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart", *Tropical Pest Management*, **26(3)**, pp.296-298, DOI: 10.1080/09670878009414416.
- [25] J.P.M. Kolthoff, A.F. Auch, H.P. Klenk, et al. (2013), "Genome sequencebased species delimitation with confidence intervals and improved distance functions", *BMC Bioinformatics*, **14**, DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.
- [26] M. Richter, R.R. Móra, F.O. Glöckner, et al. (2016), "JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison", *Bioinformatics*, **32**, pp.929-931, DOI: 10.1093/bioinformatics/btv681.

Kích thích cá hồng mi Ấn Độ (*Sahyadria denisonii*) sinh sản bằng kích dục tố khác nhau

Nguyễn Thị Kim Liên^{1*}, Trương Thị Thúy Hằng², Lâm Hoàng Lai², Nguyễn Hồng Yên², Ngô Khánh Duy²

¹Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao, ấp 1, xã Phạm Văn Cội, huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, ấp 1, xã Phạm Văn Cội, huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 6/3/2023; ngày chuyển phản biện 9/3/2023; ngày nhận phản biện 22/3/2023; ngày chấp nhận đăng 27/3/2023

Tóm tắt:

Nghiên cứu kích thích cá hồng mi Ấn Độ (*Sahyadria denisonii*) sinh sản được thực hiện từ tháng 6/2022 đến tháng 10/2022 tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao với 3 loại kích dục tố là HCG, Ovaprim và LHRHa + Domperidone. Mỗi mức nồng độ của một loại kích dục tố dùng trong thí nghiệm đều được sử dụng trên 5 cặp cá bố mẹ. Cá được tiêm vào vùng trước của vây lưng và sử dụng ống tiêm 1 ml, với phương pháp tiêm 1 lần duy nhất và thời gian tiêm cho cá là 18 giờ. Kết quả nghiên cứu ghi nhận Ovaprim có tác dụng gây rụng trứng và đẻ trứng ở cá hồng mi Ấn Độ với liều 0,4-0,5 ml/kg cá cái. Thời gian hiệu ứng là 11 giờ 25 phút đến 11 giờ 28 phút sau khi tiêm, tỷ lệ sinh sản 80%, sức sinh sản tuyệt đối đạt 747,67-750,33 trứng/cá cái, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở khoảng 84%, thời gian phát triển phôi là 30 giờ ở nhiệt độ nước 29°C. Lúc mới nở, chiều dài trung bình của ấu trùng là 3,2 mm với lượng noãn hoàng nhiều và thời gian tiêu hết noãn hoàng là 3-4 ngày. HCG và LHRHa + Domperidone chưa có tác dụng gây rụng trứng và đẻ trứng ở cá hồng mi Ấn Độ.

Từ khóa: cá hồng mi Ấn Độ, hormone, sản xuất giống, sinh sản, sự thành thực.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Bên cạnh những loài cá sản xuất trong nước để xuất khẩu, hiện nay nhu cầu cá cảnh ngoại nhập trên thị trường TP Hồ Chí Minh cũng ngày một tăng cao, các loài cá mới lạ độc đáo từ các nước như Thái Lan, Indonesia, Singapore... đang được người chơi cá cảnh trong nước ưa chuộng. Cá cảnh ngoại nhập tại TP Hồ Chí Minh hiện nay có xu hướng tăng dần theo thời gian. Cá nhập khẩu có giá thành cao và việc cung cấp cá chưa ổn định nên ảnh hưởng đến việc sản xuất và kinh doanh cá cảnh tại thị trường nước ta. Một trong các đối tượng có giá trị kinh tế và phù hợp nuôi trong bể thủy sinh là cá hồng mi Ấn Độ - thường được nhập khẩu từ Indonesia, Thái Lan, Malaysia... Cá hồng mi Ấn Độ thuộc họ *Cyprinidae*, có nguồn gốc từ Ấn Độ, kích thước của cá trưởng thành từ 9 cm trở lên, màu sắc chủ đạo là đen, đỏ, trắng, nổi bật với màu bạc và một sọc đen chạy dọc cơ thể, một sọc đỏ chạy từ phía miệng qua mi trên rồi dọc ra quá nửa thân phía sau. Thức ăn của cá bao gồm cả động và thực vật để duy trì vẻ đẹp tự nhiên cũng như để cá sinh trưởng và phát triển tốt. Cá thường sống ở những nơi có dòng chảy mạnh, giàu oxy và theo bầy nên thích hợp nuôi trong bể thủy sinh [1].

Ngoài tự nhiên, mùa vụ sinh sản của cá tập trung từ tháng 11 đến tháng 4 năm sau, tùy thuộc vào kích cỡ và tuổi của các cặp sinh sản [2-4]. Với tiềm năng có thể trở thành đối tượng có giá trị kinh tế cao, cá hồng mi Ấn Độ đang được quan tâm nghiên cứu tại các nước trên thế giới. Các tài liệu về nghiên cứu sinh sản của loài cá này tại nước ta hiện nay chưa được đề cập. Trong khi đó,

trên thế giới đã có một số kết quả nghiên cứu về đặc điểm sinh sản, sinh sản nhân tạo cá đã được công bố như T.V.A. Mercy và cs (2015) [1], S. Sajan (2015) [5], T.V.A. Mercy và cs (2014) [6]. Chính vì thế, để có thể chủ động được nguồn giống, làm đa dạng thêm nguồn cá xuất khẩu trong nước, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “Kích thích cá hồng mi Ấn Độ (*Sahyadria denisonii*) sinh sản bằng kích dục tố khác nhau”.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Cá thí nghiệm

Cá hồng mi Ấn Độ sử dụng làm bố mẹ được nhập khẩu từ Indonesia (theo Giấy phép nhập khẩu giống thủy sản Số 1698/GP-TCTS-NTTS ngày 3/9/2020 của Cục Thủy sản), cá khỏe mạnh, có ngoại hình đẹp, không dị tật, đồng đều, kích thước cá trung bình 11 cm, khối lượng cá dao động 19-22 g/con. Sau khi vận chuyển về, cá được thuần dưỡng và nuôi vỗ trong bể kính kích thước 1,2x0,8x0,6 m trong 2 tuần. Cá được nuôi chung đực cái, mật độ nuôi là 50 con/bể.

2.2. Thức ăn thí nghiệm

Thức ăn sử dụng trong thời gian nuôi vỗ cá bố mẹ là sinh khối *Artemia* và trùn chỉ. Sinh khối *Artemia* được nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, TP Hồ Chí Minh. Thức ăn tự chế biến là 50% thức ăn viên 32% protein, 50% tép bò, bổ sung vitamin C với liều lượng 3 g/kg thức ăn, chất kết dính với liều 2 g/kg thức ăn, hỗn hợp được xay, sau đó ép thành viên nhỏ và phơi khô ở nhiệt độ phòng.

*Tác giả liên hệ: Email: lienkimnguyen85@gmail.com

Induced breeding of *Sahyadria denisonii* using different hormonal substances

Thi Kim Lien Nguyen^{1*}, Thi Thuy Hang Truong²,
Hoang Lai Lam², Hong Yen Nguyen², Khanh Duy Ngo²

¹Center for Business Incubation of Agricultural High Technology, Ho Chi Minh City, Hamlet 1, Pham Van Coi Commune, Cu Chi District, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Research and Development Center for Hi-Tech Agriculture, Ho Chi Minh City, Hamlet 1, Pham Van Coi commune, Cu Chi district, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 6 March 2023; revised 22 March 2023; accepted 27 March 2023

Abstract:

Research on spawning stimulation of *Sahyadria denisonii* was carried out from June 2022 to October 2022 at the Research and Development Center for High-Tech Agriculture with three inducing agents, HCG, Ovaprim, and LHRHa + Domperidone. Each concentration of a hormone used in the experiment was applied on 5 pairs of brood fish. A 1 ml syringe was used for injecting to the anterior region of the dorsal fin by using a single-injection method and the injection timing of fish was 18 hours. Results showed that Ovaprim had an effect on inducing ovulation and laying eggs at a dose of 0.4-0.5 ml/kg of female fish. Female fish were exposed to hormones and ovulated after 11 hours 25 minutes to 11 hours 28 minutes from the time of injecting, 80% reproduction rate, actual fecundity from 747.67 to 750.33 eggs/female, 84% fertilisation rate, 84% hatching rate, time of embryo development was 30 hours at a water temperature of 29°C. The average length of new-hatched larvae was 3.2 mm with a large amount of yolk sac, the time to consume the yolk was from 3 to 4 days. HCG and LHRHa + Domperidone did not have any effect on ovulation and spawning in fish.

Keywords: hormones, maturation, production, *Sahyadria denisonii*, seed reproduction.

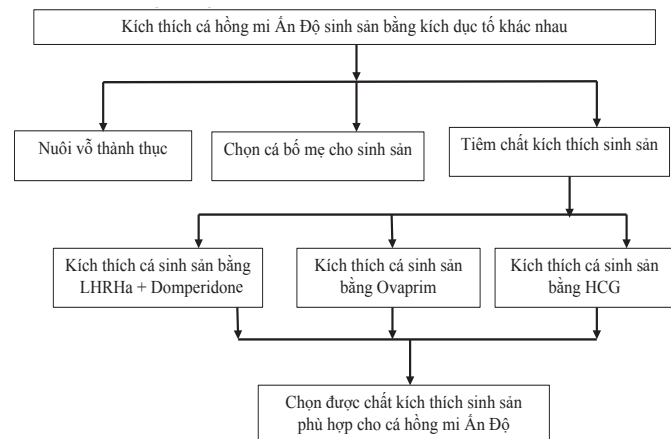
Classification number: 4.5

Nguồn nước dùng cho nghiên cứu là nước đã và đang sử dụng để nuôi cá cảnh tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao (nguồn nước giếng) được điều chỉnh các yếu tố chất lượng nước trong ngưỡng thích hợp cho cá. Các yếu tố chất lượng nước trong bể nuôi vỗ cá bố mẹ cụ thể là pH nước 6,0-6,8, độ cứng 53,7 mg CaCO₃/l, nhiệt độ nước dao động 27-28°C.

Các dụng cụ thực hiện trong thí nghiệm bao gồm 9 bể kính kích thước 1,2x0,8x0,6 m, máy kiểm tra chất lượng nước pH, DO và nhiệt độ. Hệ thống sục khí, ống xi phông, thau, xô, vợt, cân phân tích và ống tiêm 0,5 ml. Cân điện tử hai số lẻ dùng để cân khối lượng cá, thước kẹp có độ chính xác 0,05 mm để đo chiều dài cá.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Các nội dung của nghiên cứu được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ thí nghiệm trong nghiên cứu.

Chọn cá cho sinh sản:

Cá cái: Chọn cá khỏe mạnh, không bị xây xát, không bị thương tật. Khi cá đã thành thực sinh dục thì cá có phân bụng dưới to, mềm đều, lỗ sinh dục lõm và màu hồng.

Cá đực: Chọn con đực thân thon dài, khỏe mạnh, không bị xây xát, không bị thương tật có gai sinh dục nhỏ, hơi lõm và nhọn. Khi cá đã thành thực sinh dục, dùng tay vuốt nhẹ gần lỗ sinh dục cá thấy có sẹ màu trắng sữa chảy ra.

Tiêm chất kích thích sinh sản cho cá: Chọn cá cái và đực có sản phẩm sinh dục đạt giai đoạn chín muồi, tiến hành tiêm chất kích thích sinh sản cho cá. Sau thời gian hiệu ứng thì cá cái sẽ rụng trứng, vuốt trứng, vuốt tinh dịch và thụ tinh nhân tạo. Nghiên cứu kích thích sinh sản cho cá hồng mi Ấn Độ được thực hiện bằng các loại chất kích thích sinh sản là LHRHa + Domperidone (bảng 1), Ovaprim (bảng 2) và HCG (bảng 3). Mỗi mức nồng độ của một loại chất kích thích sinh sản dùng trong thí nghiệm đều được sử dụng trên 5 cặp cá bố mẹ, cá đực tiêm vào vùng trước của vây lưng và sử dụng ống tiêm 1 ml tiêm 1 lần duy nhất, thời gian tiêm cho cá là 18 giờ. Cá bố mẹ rất nhạy cảm và dễ chết trong quá trình tiêm, vì vậy cá được gây mê bằng thuốc Nika Transmore Fish Medicine 28 ml (1 ml/13,5 lít nước, quan sát cá có dấu hiệu nằm yên không vùng vẫy thì tiến hành tiêm) trước khi tiêm chất kích thích sinh sản. Cá hồng mi Ấn Độ được tiêm với các liều lượng như sau:

Thí nghiệm 1: Kích thích cá sinh sản bằng LHRHa + Domperidone.

Bảng 1. Kích thích cá sinh sản bằng LHRHa + Domperidone.

Nghiệm thức	Liều tiêm/kg cá cái (LHRHa + Domperidone)	Liều tiêm/kg cá đực (LHRHa + Domperidone)
NT1	20 µg + 0,5 mg	10 µg + 0,25 mg
NT2	30 µg + 0,5 mg	15 µg + 0,25 mg
NT3	40 µg + 0,5 mg	20 µg + 0,25 mg

Thí nghiệm 2: Kích thích cá sinh sản bằng Ovaprim.

Bảng 2. Kích thích cá sinh sản bằng Ovaprim.

Nghiệm thức	Liều tiêm/kg cá cái	Liều tiêm/kg cá đực
NT1	0,4 ml/kg	0,2 ml/kg
NT2	0,5 ml/kg	0,25 ml/kg
NT3	0,6 ml/kg	0,3 ml/kg

Thí nghiệm 3: Kích thích cá sinh sản bằng HCG.

Bảng 3. Kích thích cá sinh sản bằng HCG.

Nghiệm thức	Liều tiêm/kg cá cái	Liều tiêm/kg cá đực
NT1	2.000 IU/kg cá	1.000 IU/kg cá
NT2	2.500 IU/kg cá	1.250 IU/kg cá
NT3	3.000 IU/kg cá	1.500 IU/kg cá

Gieo tinh nhân tạo cho trứng cá hồng mi Ấn Độ: Sau khi tiêm cá xong khoảng 10-11 giờ tiến hành kiểm tra sự rụng trứng của cá, vuốt nhẹ bụng cá cái ở gần lỗ sinh dục nếu thấy trứng chảy ra thì trứng đã rụng và tiến hành vuốt trứng. Vuốt nhẹ bụng cá cái theo hướng từ đầu xuống bụng cá, trứng cá được vuốt cho vào chén. Vuốt trứng cá cái xong, tinh cá đực (dùng bơm tiêm hút tinh dịch) được đổ trực tiếp vào trứng, thêm vào 5 ml nước muối sinh lý sau đó khuấy đều trứng 1-2 phút bằng lông gà để trứng được thụ tinh hoàn toàn.

Ấp trứng: Áp dụng phương pháp ấp trứng dính trên giá thể, trứng được rải dính đều trên giá thể là lưới có kích thước mắt lưới 1 mm như ở hình 2. Trong quá trình ấp, cho nước chảy nhẹ tạo dòng chảy và sục khí để cung cấp đủ oxy. Khi trứng nở toàn bộ thì vớt giá thể ra ngoài. Sau khi cá nở, cá sử dụng dinh dưỡng bằng chất noãn hoàng trên cơ thể cá, sau 3-4 ngày cá bột tiêu hết noãn hoàng (hình 3) sẽ ăn thức ăn bên ngoài, giai đoạn này chuyển cá bột sang bể ương.



Hình 2. Ấp trứng cá hồng mi Ấn Độ trên giá thể.



Hình 3. Cá bột cá hồng mi Ấn Độ.

Phương pháp đo chất lượng nước: Các thông số nhiệt độ nước, DO và pH được đo bằng máy đo Hanna. Các thông số chất lượng nước được đo hàng ngày trong bể thí nghiệm vào lúc 9 giờ sáng.

Chỉ tiêu theo dõi:

- Thời gian hiệu ứng (giờ): Được tính từ khi tiêm chất kích thích sinh sản đến khi cá cái rụng trứng.

- Xác định thời gian phát triển phôi: Trứng cá từ lúc mới đẻ được quan sát dưới kính hiển vi và chụp hình ảnh lại theo các giai đoạn phát triển phôi của cá.

- Tỷ lệ thụ tinh (%) = (Tổng số trứng thụ tinh x 100)/tổng số trứng cá đẻ ra.

- Tỷ lệ nở (%) = (Tổng số cá nở x 100)/Tổng số trứng được thụ tinh.

Phương pháp xử lý số liệu: So sánh các chỉ tiêu theo dõi trong thí nghiệm giữa các nghiệm thức bằng phương pháp One way anova. Nếu có sự khác biệt, tiếp tục dùng Tukey test với mức ý nghĩa 95% để xác định sự khác biệt giữa từng cặp nghiệm thức. Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Minitab 16.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Các yếu tố môi trường trong bể để cá hồng mi Ấn Độ

Cá là động vật biến nhiệt nên nhiệt độ là yếu tố môi trường ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất từ đó ảnh hưởng đến suốt quá trình sinh sản của cá. Trong sinh sản nhân tạo, nhất là gieo tinh nhân tạo nhiệt độ cũng là yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ nở và thời gian phát triển phôi của cá. Nếu nhiệt độ quá cao thường làm giảm tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ nở và tăng tỷ lệ dị hình. Trong phạm vi nhiệt độ thích hợp thì nhiệt độ càng cao càng rút ngắn thời gian nở của cá. Sự biến động của các yếu tố môi trường nước sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến các quá trình sinh sản của cá.

Bảng 4. Các yếu tố môi trường trong sinh sản nhân tạo cá hồng mi Ấn Độ.

Thông số	Giá trị
Nhiệt độ nước (°C)	29,2±0,24
DO (mg/l)	5,45±0,07
pH	6,86

Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

Mỗi loài cá chỉ thực hiện việc đẻ trứng ở một phạm vi nhiệt độ nhất định, nếu nhiệt độ quá thấp cá không đẻ trứng nhưng nhiệt độ quá cao thường ảnh hưởng đến chất lượng cá con. Kết quả bảng 4 cho thấy, các yếu tố chất lượng nước trong khoảng thích hợp cho cá hồng mi Ấn Độ sinh sản với pH nước 6,86. Nhiệt độ nước luôn ở 29,2°C trong suốt thời gian cho đẻ cá, DO luôn ở mức 5,45 mg/l do trong bể để có bố trí sục khí liên tục.

3.2. Thí nghiệm với LHRHa + Domperidone

Khi cho cá hồng mi Ấn Độ sinh sản bằng LHRHa + Domperidone đã không gây ra sự chín và rụng trứng ở cả 3 nghiệm thức sau 24 giờ. Kết quả này phù hợp với công bố của A.M.A.N. Adikari và cs (2018) [7] kết luận rằng, khi sinh sản cá hồng mi Ấn Độ bằng phương pháp tiêm chất kích thích sinh sản là LHRHa với liều 20, 30 và 40 µg/kg cá cái kết hợp với 0,5 ml Domperidone; con đực sử dụng một nửa liều cá cái và tiêm một lần duy nhất thì kết quả cá không sinh sản. N.T. Anh và cs (2005) [8], K. Suzuki và cs (1987) [9] cho biết, kích thích cá hủ (*P. conchophilus*) và cá trê vàng (*Clarias macrocephalus*) đẻ bằng 17,20 P (17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one) cần có một lượng kích dục tố HCG hoặc dịch chiết tuyến yên cá. Trong thí nghiệm này, có thể LHRHa mới chỉ dừng ở mức làm tăng kích thước của noãn bào nhưng cần có sự tham gia của kích dục tố tác động qua nang trứng, gây nên hiện tượng rụng trứng. Đây là yếu tố cần thiết cho quá trình phóng

thích noãn bào, trong khi đó Domperidone lại chưa phát huy hết vai trò chất đối kháng nên hiện tượng rụng trứng chưa xảy ra.

3.3. Thí nghiệm với Ovaprim

Ovaprim là một hoạt chất dùng để kích thích sinh sản ở cá, trong thành phần có chứa 20 µg sGnRHa và 10 mg Domperidone trong khoảng 1 ml propylen glycol [10]. Hiện nay, chất kích thích này được sử dụng khá rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản để kích thích cá sinh sản. Thí nghiệm sử dụng Ovaprim được thực hiện trên 15 cặp cá bố mẹ, cá được tiêm Ovaprim với các nồng độ khác nhau 0,4, 0,5 và 0,6 ml/kg cá. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả kích thích cá hồng mi Ấn Độ sinh sản bằng Ovaprim.

Chỉ tiêu so sánh	Thí nghiệm		
	NT 1 (n=5)	NT2 (n=5)	NT3 (n=5)
Thời gian hiệu ứng (giờ)	11,25±0,09 ^a	11,28±0,03 ^a	0
Tỷ lệ sinh sản (%)	80,00±0,00 ^a	80,00±0,00 ^a	0
Sức sinh sản tuyệt đối (trứng/cá cái)	747,67±7,51 ^a	750,33±1,53 ^a	0
Tỷ lệ thụ tinh (%)	84,7±0,44 ^a	84,86±0,34 ^a	0
Tỷ lệ nở (%)	84,07±0,51 ^a	84,62±0,24 ^a	0

Nhiệt độ lúc cá đẻ và ấp trứng là 29°C.

Kết quả trình bày ở bảng 5 cho thấy, Ovaprim có tác dụng kích thích gây chín và rụng trứng cá ở thí nghiệm thứ 1 (0,4 ml/kg cá) và thí nghiệm thứ 2 (0,5 ml/kg cá), ở thí nghiệm thứ 3 với liều 0,6 ml/kg cá khi tiêm vào thì xảy ra hiện tượng cá chết. Chúng tôi quan sát và ghi nhận khi tiêm Ovaprim với liều 0,6 ml/kg thì cá vùng lưng của cá chuyển sang màu đen, điều này có thể do ở liều cao gây sốc cá hồng mi Ấn Độ và dẫn đến cá chết. Điều này phù hợp với kết luận của A.M.A.N. Adikari và cs (2018) [7] là cá hồng mi Ấn Độ rất nhạy cảm với hormone kích thích sinh sản ở liều cao.

Tỷ lệ sinh sản của cá ở cả 2 thí nghiệm thứ là 80%, thời gian hiệu ứng của cá với chất kích dục tố từ 11 giờ 25 phút đến 11 giờ 28 phút, sức sinh sản tuyệt đối của cá là 747-750 trứng/cá cái, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở khoảng 84%. B. Harvey và cs (1993) [11] ghi nhận thời gian hiệu ứng của cá hồng mi Ấn Độ là 10-12 giờ. Theo kết quả nghiên cứu của T.V.A. Mercy và cs (2015) [1], khi sinh sản cá hồng mi Ấn Độ thời gian hiệu ứng là 12,78±0,83 giờ. Cũng theo kết quả của nhóm tác giả này, tỷ lệ thụ tinh là 86,11±5,23% và tỷ lệ nở là 85,89±2,98% khi sinh sản cá hồng mi Ấn Độ bằng Ovaprim. Theo T.V.A. Mercy và cs (2014) [6], sức sinh sản tuyệt đối của *S. densonii* dao động từ 293 đến 967 trứng trên mỗi con cái, trong khi S. Solomon và cs (2011) [4] ghi nhận là 376 đến 1.098 trứng/cá thể cái.

Kết quả nghiên cứu đã ghi nhận thời gian hiệu ứng, tỷ lệ sinh sản, tỷ lệ thụ tinh và sức sinh sản của trứng không có sự khác biệt giữa thí nghiệm thứ 1 và 2. Một số nghiên cứu về sinh sản nhân tạo cá da trơn đã khẳng định không có mối tương quan giữa liều lượng chất kích thích với các chỉ số sinh sản như tỷ lệ cá đẻ, số trứng thu được [10, 12]. Vì hiệu quả của vấn đề kích thích cá đẻ trứng phụ thuộc vào nhiều vấn đề như sức khỏe của cá, hoạt tính của chất kích thích, không gian cá đẻ cùng với các điều kiện khác [13].

Ngoài ra, tỷ lệ nở của phôi cá trong thí nghiệm này cũng không có sự khác biệt giữa 2 thí nghiệm, điều đó chứng tỏ mức độ chín muồi của sản phẩm sinh dục đã quyết định đến quá trình phát triển phôi chứ không phải tác nhân chất kích thích. Kết quả nghiên cứu của S. Haider và cs (1994) [14], B.H. Pederson (2003) [15] cũng cho thấy không có mối liên hệ giữa nồng độ chất kích thích (17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one) với tỷ lệ nở của phôi cá chình Nhật Bản và cá trê vàng.

Như vậy, kết quả sinh sản cá hồng mi Ấn Độ ở thí nghiệm thứ Ovaprim với liều 0,4 và 0,5 ml/kg cá không có sự khác biệt. Do vậy, trong phạm vi thí nghiệm này, liều lượng Ovaprim được khuyến cáo sử dụng khi kích thích cá sinh sản là 0,4 ml/kg.

3.4. Thí nghiệm với HCG

HCG là loại kích dục tố dị chủng được dùng có hiệu quả cho nhiều loài cá như cá mè, cá trê, cá chày, cá trôi, cá bống... [10]. Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu thí ở cả 3 liều lượng 2000, 2500, 3000 UI/kg cá cái (bảng 3) cũng không mang lại hiệu quả cho cá hồng mi Ấn Độ. Kết quả kiểm tra cá ở thí nghiệm thứ sử dụng LHRHa + Domperidone và HCG cho thấy, cá đều không có biểu hiện rụng trứng, quan sát và phân tích cho thấy hormone chỉ có tác dụng thúc đẩy buồng trứng phát triển, thể hiện rõ nhất là sau khi tiêm khoảng 8-9 giờ kiểm tra thấy bụng cá căng tròn so với lúc chưa tiêm kích dục tố. Chúng tôi đã giải phẫu 2 cá thể ở thí nghiệm thứ LHRHa + Domperidone và HCG thì thấy buồng trứng căng, tuy nhiên trứng vẫn chưa tách ra khỏi nang trứng, chưa thấy trứng rụng và tách tự do.

Khi kích thích cá hồng mi Ấn Độ sinh sản với 3 loại chất kích thích sinh sản là Ovaprim, HCG, LHRHa + Domperidone thì chỉ có cá ở thí nghiệm thứ sử dụng Ovaprim chín và rụng trứng. Với kết quả trên, chúng tôi đặt ra 2 giả thuyết: (1) Liều lượng, số lần tiêm LHRHa + Domperidone và HCG trong thí nghiệm bố trí chưa đủ để gây ra sự chín và rụng trứng cá hồng mi Ấn Độ; (2) Điều này có thể do tác dụng đặc hiệu của kích dục tố, với mỗi loài cá nuôi sẽ thích ứng với từng loại kích dục tố khác nhau về liều lượng, số lần tiêm. Giả thuyết này cũng phù hợp với nhận xét của N.T. Anh (1999) [10] là một số loài cá chỉ hiệu ứng tốt nhất với một chất kích thích sinh sản khác nhau và mỗi chất kích thích sinh sản cũng có tác dụng mang tính chọn lọc với mỗi loài cá khác nhau như cá mè vinh, cá he, cá leo... cũng không phản ứng với HCG.

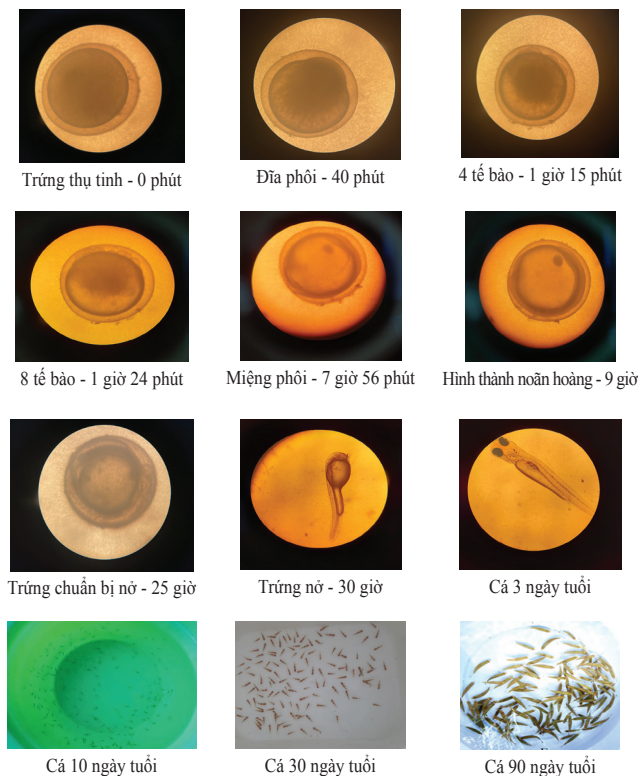
Như vậy, kết quả của thí nghiệm có khả năng xảy ra theo giả thuyết thứ 2 là có thể do tác dụng đặc hiệu của kích dục tố, với mỗi loài cá nuôi sẽ thích ứng với từng loại kích dục tố khác nhau về liều lượng, số lần tiêm. Đối với cá hồng mi Ấn Độ thì Ovaprim là kích dục tố phù hợp cho cá sinh sản trong điều kiện nhân tạo tại nước ta.

3.5. Thời gian phát triển phôi của cá hồng mi Ấn Độ

Sự phát triển của phôi được tính từ lúc trứng thụ tinh đến khi cá nở, sau khi phôi phát triển đến một giai đoạn nhất định, ấu trùng sẽ thoát khỏi vỏ trứng đi vào môi trường nước. Thời gian nở của mỗi loài cá thì khác nhau, phụ thuộc rất lớn vào nhiệt độ nước, hàm lượng oxy hòa tan. Trong khoảng nhiệt độ thích hợp nếu nhiệt độ càng tăng thời gian phát triển phôi càng nhanh và ngược lại [16].

Thời gian phát triển phôi của cá hồng mi Ấn Độ là 30-36 giờ ở nhiệt độ 28-29°C, kết quả này tương đương với nghiên cứu của T.V.A. Mercy và cs (2015) [1] khi ghi nhận thời gian nở của cá hồng mi Ấn Độ là 36 giờ ở nhiệt độ nước 27,5°C. N.V. Tu (2004) [17] cũng ghi nhận thời gian phát triển phôi của cá ông tiên là 70-78 giờ. Cá Neon *Paracheirodon innesi* có thời gian nở là 48 giờ [18]. Như vậy, thời gian nở của cá hồng mi Ấn Độ tương đối ngắn hơn so với một số loài cá nêu trên.

Ở nhiệt độ nước 29°C sau 30 giờ cá nở, cá bột mới nở có chiều dài trung bình là 3,2 mm, với lượng noãn hoàng nhiều và tồn tại trong thời gian từ 3 đến 4 ngày. Sau thời gian 3 ngày, lượng noãn hoàng sẽ được tiêu giảm, lúc này cá có chiều dài trung bình là 4,2 mm và bắt đầu ăn được thức ăn bên ngoài. Thức ăn phù hợp với cá trong giai đoạn này là luân trùng và Artemia. Quá trình phát triển phôi của cá hồng mi Ấn Độ được theo dõi và ghi nhận dưới kính hiển vi quang học được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Quá trình phát triển phôi của cá hồng mi Ấn Độ qua các giai đoạn.

4. Kết luận

Ovaprim có tác dụng kích thích cá hồng mi Ấn Độ rụng trứng và đẻ trứng với liều lượng 0,4-0,5 ml/kg cá cái và 0,2 ml/kg cá đực. Kết quả ghi nhận tỷ lệ sinh sản 80%, thời gian hiệu ứng 11 giờ 25 phút đến 11 giờ 28 phút sau khi tiêm, thời gian phát triển của phôi cá là 30 giờ ở nhiệt độ nước 29°C, sức sinh sản tuyệt đối đạt 747-750 trứng/cá cái, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở là khoảng 84%. Từ kết quả trên thì có thể tiếp tục nghiên cứu kỹ thuật ương và nuôi thương phẩm cá hồng mi Ấn Độ trong điều kiện tại nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.V.A. Mercy, S. Sajan, V. Malika (2015), "Captive breeding and developmental biology of *Sahyadria denisonii* (Day 1865) (Cyprinidae), an endangered fish of the Western Ghats, India", *Indian J. Fish.*, **62**(2), pp.19-28.
- [2] T.V.A. Mercy, S. Sajan, V. Malika (2013a), "Reproductive biology of *Puntius denisonii*, (Day 1865) - An endemic ornamental fish of Western Ghats of India", *Indian J. Fish.*, **60**(2), pp.73-78.
- [3] T.V.A. Mercy, V. Malika, S. Sajan (2013b), "Use of tricaine methanesulfonate (MS 222) to induce anaesthesia in *Puntius denisonii* (Day, 1865) (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae) - An endangered barb of the Western Ghats Hotspot", *Indian J. Fish.*, **5**(9), pp.4414-4419, DOI: 10.11609/JoTT.03294.4414-9.
- [4] S. Solomon, M.R. Ramprasanth, F. Baby, et al. (2011), "Reproductive biology of *Puntius denisonii*, an endemic and threatened aquarium fish of the Western Ghats and its implications for conservation", *J. Threat. Taxa*, **3**(9), pp.2071-2077, DOI: 10.11609/JoTT.02608.2071-7.
- [5] S. Sajan (2015), *Studies on The Stock Dynamics and Reproductive Biology of Sahyadria Denisonii (Day, 1865) - An Endangered Ornamental Fish of The Western Ghats of India*, Ph.D. thesis, Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala, India, 340pp.
- [6] T.V.A. Mercy, S. Sajan (2014), "Early growth performance of an endangered barb, *sahyadria denisonii* (Day 1865) fed with different diets", *Fishery Technology*, **51**(4), pp.286-290.
- [7] A.M.A.N. Adikari, U. Edirisinghe, E.D.M. Epasinghe, et al. (2018), "Development of an artificial breeding and hatchery technique for exotic ornamental fish *Sahyadria denisonii* (Day, 1865)", *Tropical Agricultural Research*, **29**(4), pp.313-319, DOI: 10.4038/tar.v29i4.8258.
- [8] N.T. Anh, N.T.N. Duyen, N.H.T. Phong (2005), "Stimulating pangasius and howler fish to spawn: Using 17 α , 20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one in a decisive dose", *Vocational Collection Mekong River Fish*, Agriculture Publishing House, pp.378-384 (in Vietnamese).
- [9] K. Suzuki, E.S.P. Tan, B. Tamaoki (1987), "In vitro production of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one by ovarian tissue of a tropical catfish *clarias macrocephalus*, Gunther", *General and Comparative Endocrinology*, **66**(3), pp.454-456, DOI: 10.1016/0016-6480(87)90257-7.
- [10] N.T. Anh (1999), *Some Issues on Biological Endocrinology of Fish Reproduction*, Agriculture Publishing House, 238pp (in Vietnamese).
- [11] B. Harvey, J. Carolsfeld (1993), *Induced Breeding in Tropical Fish Culture*, International Development Research Centre, Ottawa, 144pp.
- [12] P.V. Khanh (1996), *Artificial Reproduction of Pangasius hypophthalmus Sauvage, 1878 in The Mekong Delta*, Doctoral Thesis in Agricultural Sciences, Nha Trang University, 168pp (in Vietnamese).
- [13] N.T. Anh, T.C. Hoc, T.Q. Trong (2000), "Effects of DOCA, 17,20P and LRH-A on yellow catfish: Comparison of the effectiveness of inducing ripening and ovulation and some indicators other reproduction", *Proceedings of the Second Scientific Conference, University of Natural Sciences, Ho Chi Minh City National University*, pp.108-113 (in Vietnamese).
- [14] S. Haider, N.V. Rao (1994), "Induced spawning of maturing Indian catfish *Clarias batrachus* (L.), using low doses of steroid hormones and salmon gonadotropin", *Aquaculture and Fisheries Management*, **25**(4), pp.401-408, DOI: 10.1111/j.1365-2109.1994.tb00705.x.
- [15] B.H. Pederson (2003), "Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs", *Aquaculture*, **1**(4), pp.323-338, DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00242-4.
- [16] B.M. Tam (2009), *Technical Eextbook on Ornamental Fish Farming*, Faculty of Fisheries, Can Tho University, 97pp (in Vietnamese).
- [17] N.V. Tu (2004), *Physiology of Fish and Crustaceans*, Lecture at the Faculty of Fisheries, Ho Chi Minh City University of Agriculture and Forestry, 102pp (in Vietnamese).
- [18] H.L.T. Loc (2011), *Research on Technology for Seed Production and Commercial Farming of some Ornamental Fish Species with Export Value*, Vietnam Academy of Science and Technology, 207pp (in Vietnamese).

So sánh hiệu quả phát sinh phôi vô tính từ các nguồn mẫu *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Lê Thị Diễm^{1,2}, Trương Hoài Phong¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đắc Khải¹, Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Trịnh Thị Hương³, Bùi Văn Thế Vinh⁴, Trần Quế⁵, Dương Tấn Nhựt^{*}

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

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 8 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Công Thương TP Hồ Chí Minh, 140 Lê Trọng Tấn, phường Tây Thạnh, quận Tân Phú, TP Hồ Chí Minh, 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

⁵Viện Nghiên cứu Hạt nhân, 1 Nguyễn Tử Lực, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

Ngày nhận bài 18/2/2022; ngày chuyển phản biện 22/2/2022; ngày nhận phản biện 11/3/2022; ngày chấp nhận đăng 16/3/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu khảo sát khả năng phát sinh phôi vô tính từ nhiều nguồn vật liệu khác nhau của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) được thực hiện nhằm chọn được vật liệu thích hợp cho sự phát sinh phôi trong nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu này, các mẫu *in vitro* từ mảnh lá, cuống lá, rễ và các phôi rời ở dạng hình cầu, hình tim và có lá mầm được khảo sát trên môi trường MS bổ sung riêng lẻ hoặc kết hợp 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid: 0,2, 0,5 và 0,7 mg/l) và TDZ (Thidiazuron: 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l). Kết quả cho thấy, tất cả các vật liệu thử nghiệm đều cho phát sinh phôi sau 6 tuần nuôi cấy (100%). Số phôi trung bình trên mẫu mảnh lá (51,00 phôi) trên môi trường tối ưu cao hơn đáng kể so với mẫu cuống lá (29,67 phôi) và mẫu rễ (18,00 phôi). Mẫu phôi hình cầu là nguồn vật liệu thích hợp nhất cho sự phát sinh phôi (68,33 phôi/mẫu) so với các nguồn mẫu cấy khác. Môi trường nuôi cấy có sự kết hợp của 2,4-D và TDZ tăng khả năng tạo phôi thứ cấp ở mẫu phôi hình cầu, kết quả đạt cao nhất tại nồng độ 0,7 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 mg/l TDZ trong môi trường chứa 0,5 mg/l NAA (1-Naphthaleneacetic acid) (73,33 phôi/mẫu).

Từ khóa: nuôi cấy *in vitro*, phát sinh phôi, phôi thứ cấp, sâm Ngọc Linh.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Sâm Ngọc Linh là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam. Đây là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin khung dammaran cao nhất (khoảng 12-15%) và lượng saponin triterpen nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới [1]. Năm 2011, sâm Ngọc Linh đã thoát nguy cơ tuyệt chủng nhưng độ an toàn còn thấp và mức độ đe dọa vẫn ở bậc E trong *Sách đỏ Việt Nam*. Do vậy, nhân giống sâm Ngọc Linh *in vitro* được cho là phương pháp hiệu quả nhất để bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm này.

Ứng dụng công nghệ sinh học trong các chương trình nhân giống cây trồng đòi hỏi các quy trình tái sinh *in vitro* hiệu quả, trong đó có phương pháp phát sinh phôi soma. Việc ứng dụng phương pháp này có thể tạo ra số lượng lớn cây con có chất lượng tốt trong một thời gian ngắn, tỷ lệ sống sót của cây con ngoài vườn ươm cao [2, 3]. Tốc độ nhân giống từ phôi cao hơn nhiều so với nhân giống từ mô phân sinh. Các mô có nguồn gốc từ phôi có khả năng phát sinh phôi cao nhất và khả năng này giảm dần ở lá mầm, cuống lá, lá và rễ [4]. Sự hình thành phôi vô tính có thể thông qua con đường trực tiếp hoặc gián tiếp. Đối với hình thành phôi vô tính trực tiếp, phôi phát triển trực tiếp trên bề mặt của mô cấy. Sự hình thành phôi vô tính gián tiếp có thể thông qua một bước trung gian liên quan đến sự hình thành mô sẹo hoặc nuôi cấy huyền phù tế bào [5, 6].

Phát sinh phôi thứ cấp là quá trình phôi được hình thành từ phôi, khác với phát sinh phôi sơ cấp là quá trình phôi được hình thành từ mẫu cấy thực vật. Quá trình phát sinh phôi soma thứ cấp mang lại nhiều ưu điểm hơn so với quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp, đặc biệt là tỷ lệ nhân lên cao và mức độ đồng đều tăng lên. Nuôi cấy *in vitro* bằng phương pháp phát sinh phôi thứ cấp đã được mô tả ở nhiều loài thực vật hạt trần và hạt kín bằng cách sử dụng chất điều hòa sinh trưởng thực vật và các loại carbohydrate khác nhau [7-9].

Trong nuôi cấy phôi, nồng độ của các chất điều hòa sinh trưởng là rất quan trọng đối với phản ứng sinh trưởng tối ưu của mẫu cấy. Khi nồng độ quá thấp sẽ không kích thích sinh trưởng, ngược lại hàm lượng quá cao có thể gây độc cho mẫu [10]. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, đặc biệt là auxin, có liên quan chặt chẽ đến quá trình chuyển đổi tế bào sinh dưỡng thành phôi. Bên cạnh việc thúc đẩy sự phân chia tế bào trong mẫu cấy, các auxin có liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến những thay đổi trong biểu hiện gen, tổng hợp protein và điều chỉnh, tái tổ chức chromatin cần thiết để khởi sự con đường phát sinh phôi [11, 12]. 2,4-D là auxin tổng hợp được nghiên cứu rộng rãi nhất và được ứng dụng trong các hệ thống tạo phôi thực vật khác nhau [10, 12, 13]. Ngoài auxin, các cytokinin cũng sử dụng cho cảm ứng phát sinh phôi ở các loài thực vật hai lá mầm [14]. Một số loại cytokinin được sử dụng nhiều trong môi trường nuôi cấy như

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

Comparison of somatic embryogenesis efficiency from *in vitro* explant sources of Ngọc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Thi Diem Le^{1,2}, Hoai Phong Truong¹, Thanh Tung Hoang¹,
Dac Khai Hoang¹, Quoc Luan Vu¹, Manh Cuong Do¹,
Thi Nhu Mai Nguyen¹, Thi Huong Trinh³, Van The Vinh Bui⁴,
Que Tran⁵, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Tay Nguyen Institute of Scientific Research, VAST,
116 Xo Viet Nghe Tinh, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, VAST,

18 Hoang Quoc Viet, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Ho Chi Minh City University of Industry and Trade (HUIT),

140 Le Trong Tan, Tay Thanh Ward, Tan Phu District, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Ho Chi Minh City University of Technology (HUTECH),

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

⁵Dalat Nuclear Research Institute,

1 Nguyen Tu Luc, Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

Received 18 February 2022; revised 11 March 2022; accepted 16 March 2022

Abstract:

This study on the efficiency of embryogenesis from various explant sources of Ngọc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) was conducted to select the appropriate materials and optimise embryogenesis *in vitro*. In this study, *in vitro* explants from leaf fragments, petioles, roots, and embryos (globular, heart-shaped, and cotyledon) were cultured on MS medium supplemented individually or in combination with 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid: 0.2, 0.5, and 0.7 mg/l) and TDZ (Thidiazuron: 0.1, 0.3, and 0.5 mg/l). The results showed that all explants had embryogenesis after 6 weeks of culture (100%). The average number of embryos per leaf fragment (51.00 embryos) on the optimal medium was significantly higher than that of petioles (29.67 embryos) and root samples (18.00 embryos). Interestingly, the globular embryo explant was noted as the most suitable material source for embryogenesis (68.33 embryos/sample). The culture medium with the combination of 2,4-D and TDZ increased the ability to create secondary embryos in globular embryos, the highest result was achieved at the concentration of 0.7 mg/l 2,4-D combined with 0.1 mg/l TDZ in the medium containing 0.5 mg/l NAA - 1-Naphthaleneacetic acid (73.33 embryos/sample).

Keywords: embryogenesis, *in vitro* culture, Ngọc Linh ginseng, secondary embryos.

Classification number: 4.6

6-Benzylaminopurine (BAP), kinetin, zeatin và TDZ cho kết quả tốt tùy thuộc vào loài thực vật [5, 10, 15]. Sự phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh đã được báo cáo bởi một số tác giả đối với một số mẫu cây như lá, cuống lá và rễ [16-20]. Tuy nhiên, việc đánh giá được hiệu quả phát sinh phôi trên các nguồn mẫu, đặc biệt là hiệu quả việc phát sinh phôi thứ cấp từ nhiều dạng phôi ban đầu vẫn còn hạn chế và chưa rõ ràng.

Với mục tiêu đánh giá được sự khác biệt của các nguồn mẫu và tìm được nguồn mẫu thích hợp nhất trong phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh, nghiên cứu này đã tiến hành khảo sát hiệu quả các nguồn mẫu cây mảnh lá, rễ, cuống lá và các dạng phôi sơ cấp (hình cầu, hình tim, có lá mầm) lên sự phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh dưới ảnh hưởng của 2 chất điều hoà sinh trưởng thường được sử dụng trong quá trình phát sinh phôi vô tính là 2,4-D và TDZ.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nguồn vật liệu sử dụng trong nghiên cứu này là mẫu lá, cuống lá và rễ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi nuôi cấy trong môi trường MS; các mẫu phôi ở các dạng hình cầu, hình tim và có lá mầm đồng nhất và không có biến dị được tách từ cụm phôi nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 1,0 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l (NAA), 0,2 mg/l kinetin, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [17] tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Các mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar chứa cố định 0,5 mg/l NAA, bổ sung 2,4-D (0,2, 0,5 và 0,7 mg/l) và TDZ (0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) riêng lẻ hoặc kết hợp ở các nồng độ khác nhau.

Bình nuôi cấy được sử dụng là bình thủy tinh có thể tích 100 ml chứa 20 ml môi trường MS. Môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 và được hấp khử trùng ở 121 °C, 1 atm trong 30 phút. Các thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng nuôi có nhiệt độ 22±2°C, độ ẩm 80%, cường độ chiếu sáng 2500±500 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ mảnh lá, cuống lá và rễ sâm Ngọc Linh

Mẫu lá được cắt theo hình vuông có kích thước 10×10 mm, cách phiến lá khoảng 1 mm; mẫu cuống lá được cắt ngang, kích thước chiều dài × đường kính khoảng 5×2 mm; khúc cắt rễ có chiều dài khoảng 10 mm và đường kính khoảng 1 mm, được nuôi cấy trong môi trường MS chứa cố định 0,5 mg/l NAA [19] + 30 g/l sucrose, có bổ sung riêng lẻ 2,4-D (0, 0,2, 0,5 và 0,7 mg/l) và TDZ (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l). Môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng làm đối chứng (ĐC).

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ các dạng phôi hình cầu, hình tim, phôi có lá mầm của sâm Ngọc Linh

Các phôi rời hình cầu, hình tim (khoảng 0,020-0,025 g), phôi có lá mầm (khoảng 0,030 g) của sâm Ngọc Linh có kiểu hình đồng nhất, không có biến dị được tách riêng và nuôi cấy trong môi trường MS + 0,5 mg/l NAA + 30 g/l sucrose, có bổ sung riêng lẻ 2,4-D (0, 0,2, 0,5 và 0,7 mg/l), TDZ (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l). Môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng làm đối chứng.

2.5. Khảo sát ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ nguồn mẫu có sự tái sinh phôi cao nhất

Nguồn mẫu cho số lượng hình thành phôi cao nhất từ kết quả của thí nghiệm trước được chọn và nuôi cấy trong môi trường MS chứa 0,5 mg/l NAA + 30 g/l sucrose, bổ sung 2,4-D (0,2; 0,5 và 0,7 mg/l) kết hợp với TDZ (0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) tại các nồng độ thí nghiệm để khảo sát sự phát sinh phôi vô tính. Môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng làm đối chứng.

2.6. Quan sát mô học

Các mẫu cấy phát sinh phôi được thu nhận và quan sát mô học. Mẫu được cắt thành lát mỏng khoảng 10-15 µm theo chiều ngang đi qua phôi, sau đó ngâm trong javen 10% trong 15 phút, rửa sạch mẫu bằng nước cất, tiếp tục ngâm mẫu trong acetic acid 45% trong 15 phút để cố định mẫu, rửa lại bằng nước cất 6 lần, ngâm mẫu đã ráo nước trong phẩm nhuộm carmine red trong 5 phút, rửa lại mẫu bằng nước cất 2 lần, cuối cùng đặt mẫu trong lam, nhỏ 1 giọt nước và đặt lamên kính lại. Quan sát dưới kính hiển vi quang học với vật kính ×10 [21].

2.7. Các chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu

Tiến hành ghi nhận một số chỉ tiêu tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ cảm ứng phôi (%), số phôi/mẫu và trọng lượng tươi cụm phôi (g) sau 6 tuần nuôi cấy. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 10 bình nuôi cấy. Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan với $p < 0,05$ [22].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh hình thái từ mảnh lá, cuống lá và rễ sâm Ngọc Linh

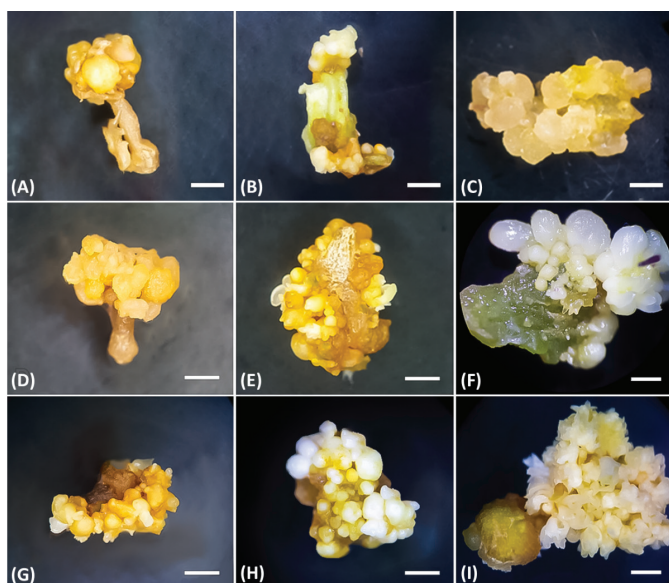
Kết quả thu nhận sau 6 tuần nuôi cấy từ mảnh lá, cuống lá và rễ của sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi cho thấy sự bổ sung các nồng độ khác nhau của 2,4-D hoặc TDZ vào môi trường nuôi cấy có tác dụng cảm ứng tạo mô sẹo; tỷ lệ cảm ứng mô sẹo/mẫu đạt 100% trên tất cả 3 loại mẫu cấy và cao hơn đáng kể so với đối chứng (nhỏ hơn 20%) (bảng 1). Tỷ lệ mẫu tạo phôi và số lượng phôi hình thành trên mẫu khác nhau ở các nghiệm thức thí nghiệm. Đối với nghiệm thức đối chứng không bổ sung 2,4-D

và TDZ cho thấy vẫn có sự xuất hiện mô sẹo và phôi trên các mẫu, nhưng số lượng thấp hơn đáng kể so với các môi trường có bổ sung 2,4-D hoặc TDZ. Tỷ lệ cảm ứng tạo phôi đạt hiệu quả nhất được ghi nhận đối với mẫu mảnh lá trên môi trường có bổ sung 0,7 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l TDZ (100%). Tương tự, mẫu rễ cũng cho tỷ lệ hình thành phôi cao khi tăng nồng độ 2,4-D và TDZ (88,67 và 93,33%), trong khi mẫu cuống lá cho tỷ lệ phát sinh phôi cao ở nồng độ thấp 0,1 mg/l TDZ (67,67%) (bảng 1). Số phôi trung bình trên mẫu cao nhất ghi nhận ở mẫu mảnh lá (51,00 phôi) trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D và cao hơn đáng kể so với số phôi hình thành cao nhất trên mẫu cuống lá (29,67 phôi) và mẫu rễ (18,00 phôi). Phôi có nhiều dạng bao gồm phôi hình cầu, phôi hình tim, phôi có lá thật, có màu từ trắng sáng đến xanh được ghi nhận trên mẫu mảnh lá và mẫu cuống lá, trong khi mẫu rễ ghi nhận chủ yếu là phôi dạng hình cầu và có màu vàng nhạt sau 6 tuần nuôi cấy (bảng 1, hình 1). Đồng thời, trọng lượng tươi của cụm phôi ở các nguồn mẫu được ghi nhận tại nồng độ 0,3-0,5 mg/l TDZ đều cao hơn so với các nghiệm thức khác (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ trong môi trường chứa 0,5 mg/l NAA lên sự phát sinh hình thái từ các mẫu mảnh lá, cuống lá và rễ sâm Ngọc Linh *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy.

Nguồn mẫu	Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Nồng độ TDZ (mg/l)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỷ lệ cảm ứng phôi (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)	Mô tả
Mảnh lá	ĐC	-	12,00 ^b	16,33 ^c	2,67 ⁱ	0,13 ^s	Phôi có dạng hình cầu, hình tim và phôi có lá thật.
	0,2	-	100,00 ^a	86,67 ^c	21,33 ^f	1,48 ^{ef}	
	0,5	-	100,00 ^a	93,67 ^b	51,00 ^a	1,59 ^{de}	
	0,7	-	100,00 ^a	100,00 ^a	35,67 ^c	1,69 ^{bcd}	
	-	0,1	100,00 ^a	74,67 ^c	16,67 ^{gh}	1,51 ^{ef}	Phôi có màu trắng sáng và có màu xanh
	-	0,3	100,00 ^a	96,33 ^b	48,33 ^b	1,76 ^{bcd}	
Cuống lá	ĐC	-	13,00 ^b	6,33 ^j	2,30 ^j	1,14 ^s	Phôi có dạng hình cầu, hình tim và phôi có lá thật.
	0,2	-	100,00 ^a	15,67 ^a	8,33 ^k	1,67 ^{bcd}	
	0,5	-	100,00 ^a	35,33 ^j	14,67 ^{hi}	1,65 ^{bcd}	
	0,7	-	100,00 ^a	47,33 ^j	25,33 ^e	1,67 ^{bcd}	
	-	0,1	100,00 ^a	67,67 ^b	16,67 ^{gh}	1,51 ^{ef}	Phôi có màu trắng sáng và có màu xanh
	-	0,3	100,00 ^a	62,67 ^b	26,00 ^c	1,64 ^{cd}	
Rễ	ĐC	-	15,00 ^b	18,33 ^k	3,30 ^j	1,15 ^s	Phôi chủ yếu hình cầu, phôi có màu vàng nhạt
	0,2	-	100,00 ^a	73,33 ^{ef}	12,00 ^{ij}	1,44 ^f	
	0,5	-	100,00 ^a	76,33 ^e	17,67 ^h	1,5 ^{ef}	
	0,7	-	100,00 ^a	88,67 ^c	11,33 ^j	1,60 ^{de}	
	-	0,1	100,00 ^a	71,33 ^f	16,33 ^{gh}	1,66 ^{bcd}	
	-	0,3	100,00 ^a	83,00 ^d	18,00 ^b	1,68 ^{bcd}	
	-	0,5	100,00 ^a	93,33 ^b	13,00 ^{ij}	1,71 ^{bcd}	

Các chữ cái khác nhau (a, b...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ tối ưu lên sự phát sinh phôi từ mẫu rễ, cuống lá và mảnh lá sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 mm). Mẫu rễ (A), cuống lá (B) và mảnh lá (C) trong môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng. Mẫu rễ (D), cuống lá (E) và mảnh lá (F) trong môi trường bổ sung 0,5, 0,7 và 0,5 mg/l 2,4-D, tương ứng. Mẫu rễ (G), cuống lá (H) và mảnh lá (I) trong môi trường bổ sung 0,3, 0,5 và 0,3 mg/l TDZ, tương ứng.

Trong thí nghiệm này, nồng độ 2,4-D và TDZ có ảnh hưởng rõ rệt đến sự hình thành phôi ở các mẫu sâm Ngọc Linh. Một số nghiên cứu cho thấy chất điều hòa sinh trưởng thực đóng một vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh phôi [14, 15, 23-25]. Việc sử dụng các auxin ngoại sinh giúp điều hòa sự phát triển của phôi soma bằng cách thay đổi hàm lượng auxin nội sinh và liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến sự khởi phát hình thành trực phôi và để thiết lập tính đối xứng hai bên trong giai đoạn phát sinh phôi sớm [11, 26]. Trong các nghiên cứu về cảm ứng phát sinh phôi vô tính ở nhiều loài thực vật, auxin, đặc biệt là 2,4-D thường cho hiệu quả phát sinh phôi cao [9, 27]. Ảnh hưởng của auxin lên sự phát sinh phôi được ghi nhận ở một số loài thực vật như *Paspalum scrobilatum* [28], *Picea abies* và *Picea omorika* [29], *Panax Ginseng* [13], *Stewartia* [30], *Camellia oleifera* [31]. Ngoài auxin, các cytokinin cũng sử dụng cho cảm ứng phát sinh phôi ở các loài thực vật hai lá mầm. Một số loại cytokinin như BAP, TDZ, kinetin và zeatin được sử dụng cho kết quả tốt trên nhiều loài thực vật [32-34].

Đối với chi *Panax*, phương pháp tạo phôi vô tính đã được nghiên cứu nhiều trên các loài *P. ginseng* [13, 35-37]. Các kết quả trên cho thấy sự phát sinh phôi phụ thuộc vào loại mẫu cây và nồng độ của 2 chất điều hòa sinh trưởng thực vật là 2,4-D và TDZ. Trong thí nghiệm này, dưới ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng, khả năng phát sinh phôi ở mẫu mảnh lá cho hiệu quả tốt hơn các mẫu cuống lá và rễ của cây *in vitro* 3 tháng tuổi. Điều này có thể do tồn tại một gradient phản ứng phát sinh phôi khác biệt giữa các cơ quan trong quá trình phát sinh phôi nhau [4, 38]. V.T. Hien và cs (2014) [18] cũng báo cáo rằng, mảnh lá cho hiệu quả phát sinh phôi trực tiếp cao nhất trên môi trường bổ sung 2

mg/l NAA (29,49 phôi/mẫu) cao hơn các mẫu cuống lá và thân rễ sâm Ngọc Linh. Tương tự, B.V.T. Vinh và cs (2014) [19] cũng báo cáo số phôi hình thành thu được mẫu lá trên môi trường bổ sung 1 mg/l NAA và 1 mg/ 2,4-D cao hơn so với mẫu cuống lá.

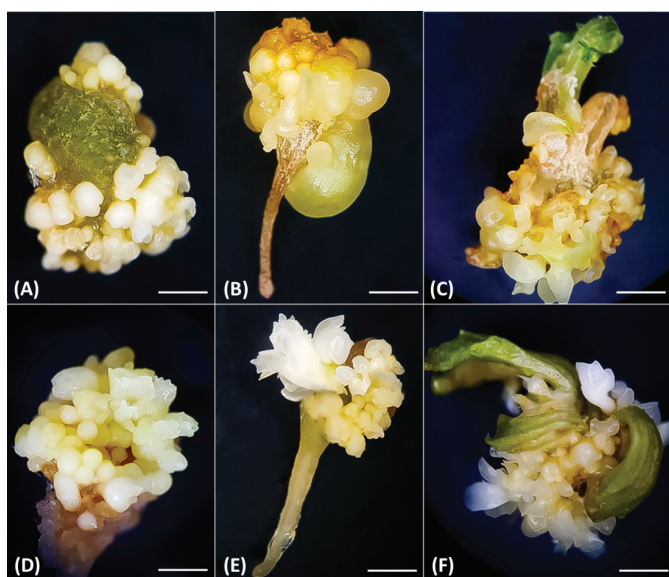
3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi của sâm Ngọc Linh

Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy tất cả các phôi ở cả 3 dạng hình cầu, hình tim và có lá mầm trên tất cả môi trường có bổ sung 2,4-D hoặc TDZ đều có sự hình thành mô sẹo (100%) và phôi (100%) cao hơn đáng kể so với đối chứng. Số phôi trung bình trên mẫu cao nhất được ghi nhận ở mẫu phôi hình cầu trên môi trường bổ sung 0,3 mg/l TDZ (68,33 phôi) (bảng 2, hình 2). Đối với môi trường bổ sung 2,4-D, nồng độ 0,5 mg/l cho số phôi hình thành trên mẫu phôi hình cầu, phôi hình tim và phôi có lá mầm đều tối ưu hơn các nồng độ khác (65,67, 54,33 và 47,33 phôi, tương ứng). Trên môi trường bổ sung TDZ, số phôi hình thành trên mẫu phôi hình tim và phôi có lá mầm tỷ lệ thuận với nồng độ (65,33 và 60,00 phôi). Tuy nhiên, với mẫu phôi hình cầu, số phôi cao nhất ghi nhận ở nồng độ 0,3 mg/l và giảm đáng kể khi tiếp tục tăng nồng độ TDZ (bảng 2). Đồng thời, trọng lượng tươi của cụm phôi ở các mẫu phôi đạt tối ưu tại nồng độ 0,3-0,5 mg/l TDZ (bảng 2) và phôi thứ cấp tạo thành có đầy đủ các dạng bao gồm phôi hình cầu và phôi hình tim và phôi có lá mầm; phôi có màu trắng sáng và màu xanh (hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ trong môi trường chứa 0,5 mg/l NAA lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi hình cầu, phôi hình tim, phôi có lá mầm của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy *in vitro*.

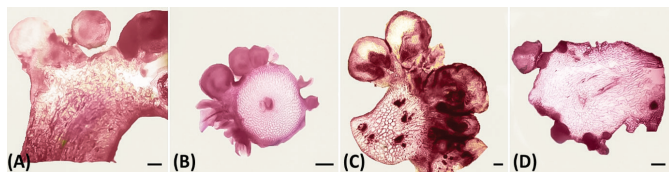
Nguồn mẫu	Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Nồng độ TDZ (mg/l)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỷ lệ cảm ứng phôi (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)
Phôi hình cầu	ĐC	-	3,33 ^b	38,33 ^b	4,33 ^a	0,13 ^g
	0,2	-	100,00 ^a	100,00 ^a	32,00 ^{lm}	2,08 ^{ef}
	0,5	-	100,00 ^a	100,00 ^a	65,67 ^b	2,20 ^{de}
	0,7	-	100,00 ^a	100,00 ^a	45,33 ^{efg}	2,27 ^{bcd}
	-	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	39,67 ^{hi}	2,11 ^{ef}
	-	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	68,33 ^a	2,26 ^{abc}
	-	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	43,67 ^{fe}	2,46 ^a
	-	0,7	100,00 ^a	100,00 ^a	36,67 ^{jk}	2,37 ^{bcd}
Phôi hình tim	ĐC	-	5,33 ^b	29,67 ^c	3,00 ^a	0,13 ^g
	0,2	-	100,00 ^a	100,00 ^a	34,00 ^{kl}	2,40 ^{bcd}
	0,5	-	100,00 ^a	100,00 ^a	54,33 ^d	2,36 ^{bcd}
	0,7	-	100,00 ^a	100,00 ^a	36,67 ^{jk}	2,37 ^{bcd}
	-	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	38,67 ^{ij}	2,34 ^{cde}
	-	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	48,67 ^e	2,36 ^{bcd}
	-	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	65,33 ^b	2,46 ^{abc}
	-	0,7	100,00 ^a	100,00 ^a	35,67 ^{kl}	2,39 ^{bcd}
Phôi có lá mầm	ĐC	-	3,67 ^b	16,67 ^d	3,33 ^a	0,15 ^g
	0,2	-	100,00 ^a	100,00 ^a	30,00 ^m	2,17 ^f
	0,5	-	100,00 ^a	100,00 ^a	47,33 ^{ef}	2,30 ^{de}
	0,7	-	100,00 ^a	100,00 ^a	42,33 ^{gh}	2,35 ^{de}
	-	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	35,67 ^{kl}	2,39 ^{bcd}
	-	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	53,00 ^d	2,43 ^{abcd}
	-	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	60,00 ^c	2,47 ^{ab}
	-	0,7	100,00 ^a	100,00 ^a	36,67 ^{jk}	2,37 ^{bcd}

Các chữ cái khác nhau (a, b...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại p<0,05 (Duncan's test).

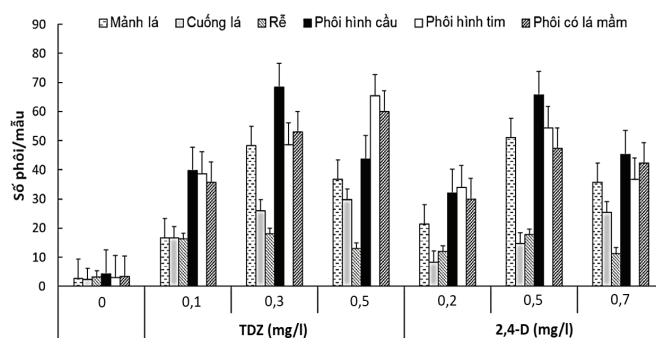


Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ tới sự phát sinh phôi từ các dạng phôi hình cầu, phôi hình tim và phôi có lá mầm sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 mm). Phôi hình cầu (A), hình tim (B) và có lá mầm (C) trong môi trường bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D. Phôi hình cầu (D), hình tim (E) và có lá mầm (F) trong môi trường bổ sung 0,3, 0,5 và 0,5 mg/l TDZ, tương ứng.

Nhìn chung, kết quả thu được từ thí nghiệm trên các môi trường bổ sung 2,4-D, TDZ riêng lẻ cho thấy tất cả các nguồn mẫu thí nghiệm đều có khả năng phát sinh phôi và các phôi chủ yếu được hình thành trực tiếp trên bề mặt của mẫu cây (hình 3). Trong đó, mẫu phôi dạng hình cầu cho số lượng phôi hình thành tối ưu ở nồng độ 0,3 mg/l TDZ và cao hơn các loại mẫu cây mảnh lá, cuống lá, rễ của cây *in vitro* 3 tháng tuổi được sử dụng trong hai thí nghiệm trước đó và các dạng phôi khác. Số phôi hình thành ở các mẫu mảnh lá, rễ và phôi hình cầu có xu hướng giảm khi tăng nồng độ TDZ và 2,4-D lên nồng độ cao nhất, trong khi các mẫu cuống lá ghi nhận xu hướng tăng. Số phôi hình thành ở các mẫu phôi hình tim và phôi có lá mầm có xu hướng tăng khi tăng nồng độ TDZ, nhưng có xu hướng giảm khi tăng nồng độ 2,4-D quá cao (hình 4). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu về sự phát sinh phôi *in vitro* cho thấy tốc độ nhân giống từ phôi cao hơn nhiều so với nhân giống từ mô phân sinh. Các mô có nguồn gốc từ phôi có khả năng phát sinh phôi cao nhất và khả năng này giảm dần ở trụ lá mầm, cuống lá, lá và rễ [4].



Hình 3. Sự phát sinh phôi từ các mẫu mảnh lá, rễ, cuống lá và phôi của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy. (A) Mảnh lá; (B) Rễ; (C) Cuống lá; (D) Phôi vô tính (thước 0,1 mm).



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và 2,4-D lên số phôi thứ cấp hình thành từ các nguồn mẫu cây khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy ($p < 0,05$).

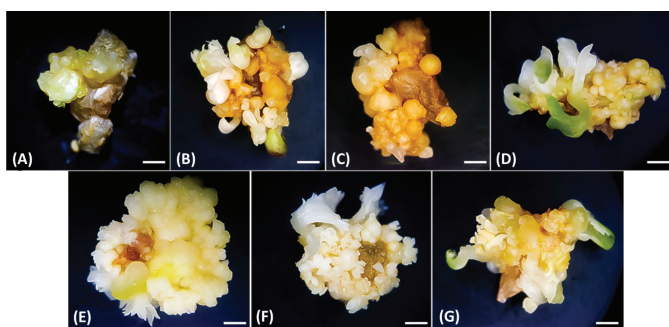
3.3. Ảnh hưởng của việc bổ sung kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ mẫu phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh

Loại vật liệu cho khả năng phát sinh phôi hiệu quả nhất được khảo sát ở các thí nghiệm trên là phôi hình cầu. Để nâng cao hiệu quả phát sinh phôi, mẫu phôi hình cầu được tiếp tục khảo sát sự phát sinh phôi dưới ảnh hưởng của sự kết hợp 2,4-D và TDZ. Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy sự kết hợp 2,4-D và TDZ ở nồng độ thích hợp cho khả năng phát sinh phôi thứ cấp đạt hiệu quả cao. Số lượng phôi hình thành cao nhất (73,33 phôi/mẫu) thu được trên môi trường có bổ sung 0,7 mg/l 2,4-D và 0,1 mg/l TDZ (bảng 3, hình 5) và cao hơn so với bổ sung riêng lẻ 0,3 mg/l TDZ (67,00 phôi/mẫu). Trọng lượng tươi cụm phôi cũng đạt cao nhất ở nồng độ 0,7 mg/l 2,4-D và 0,1 mg/l TDZ (2,73 g) (bảng 3). Bên cạnh đó, sự phát triển bình thường của phôi thứ cấp phát sinh từ phôi hình cầu ở nghiệm thức bổ sung kết hợp TDZ và 2,4-D được ghi nhận trên môi trường MS tại các mốc thời gian khác nhau (hình 6).

Bảng 3. Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ trong môi trường chứa 0,5 mg/l NAA lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ mẫu phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy.

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Nồng độ TDZ (mg/l)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỷ lệ cảm ứng phôi (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)	Mô tả
0	0	3,50 ^b	39,67 ^b	4,67 ^c	0,32 ^c	
0	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	67,00 ^c	2,35 ^c	
0,2	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	51,33 ^d	2,05 ^d	Hình thành nhiều dạng phôi,
0,5	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	55,67 ^d	2,62 ^{bc}	bao gồm phôi hình cầu, hình
0,7	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	69,00 ^b	2,57 ^{bc}	tim, phôi có lá
0,7	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	73,33 ^a	2,73 ^a	thật; phôi có màu
0,7	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	69,33 ^b	2,62 ^{bc}	trắng sáng và
0,7	0,7	100,00 ^a	100,00 ^a	59,67 ^{cd}	2,65 ^b	màu xanh

Các chữ cái khác nhau (a, b...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 5. Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 mm). (A) Đối chứng; (B-D) Môi trường bổ sung 0,2, 0,5 và 0,7 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,3 mg/l TDZ, tương ứng; (E-G) Môi trường bổ sung 0,1, 0,5 và 0,7 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,7 mg/l TDZ, tương ứng.



Hình 6. Sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của phôi thứ cấp sâm Ngọc Linh trên môi trường MS sau 3 tuần (A), 8 tuần (B), 12 tuần (C) và 16 tuần (D) nuôi cấy (thước 0,5 cm).

Sự phát sinh phôi vô tính từ nuôi cấy mô sẹo trong môi trường có chứa cytokinin kết hợp với auxin được báo cáo ở các loài ngũ cốc [39], các loài thuộc chi *Trifolium* bao gồm cỏ ba lá đỏ (*T. pratense* L.) và khoai mì [40]. Mặc dù phần lớn sự phát sinh phôi vô tính được kích thích bởi việc sử dụng auxin và cytokinin riêng lẻ hoặc kết hợp trong môi trường nhưng không phải sự kết hợp nào của cytokinin và auxin đều dẫn đến sự hình thành phôi vô tính. Trong nuôi cấy mô thực vật, kiểu phát sinh hình thái được xác định bởi sự cân bằng giữa hormone auxin và cytokinin trong môi trường. Do đó, đối với nhiều loài thực vật, quá trình hình thành phôi vô tính được cảm ứng trong môi trường có chứa auxin và cytokinin [8, 12]. Sự kết hợp của 2,4-D và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác trong phát sinh phôi đã được báo cáo ở nhiều loài cây thân gỗ [38, 41-44]. Trong thí nghiệm này, sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ cho sự phát sinh phôi tối ưu đối với mẫu phôi hình cầu cây sâm Ngọc Linh.

4. Kết luận

Sau 6 tuần nuôi cấy, nguồn vật liệu từ phôi vô tính cho hiệu quả phát sinh phôi cao hơn các nguồn vật liệu đã biệt hóa từ mảnh lá, cuống lá và rễ của cây *in vitro* 3 tháng tuổi. Số lượng phôi phát sinh cao nhất (73,33 phôi/mẫu) ghi nhận ở mẫu phôi hình cầu được nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 0,5 mg/l NAA và bổ sung kết hợp 0,7 mg/l 2,4-D với 0,1 mg/l TDZ. Kết quả của nghiên cứu này góp phần nâng cao hiệu quả vi nhân

giống từ phôi cũng như chọn được nguồn vật liệu thích hợp cho các nghiên cứu có liên quan đến quá trình phát sinh phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.T. Huong, K. Matsumoto, R. Kasai, et al. (1998), "In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components", *Biol. Pharm. Bull.*, **21**(9), pp.978-981, DOI: 10.1248/bpb.21.978.
- [2] C. Stasolla, E.C. Yeung (2003), "Recent advances in conifer somatic embryogenesis: Improving somatic embryo quality", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **74**, pp.15-35, DOI: 10.1023/A:1023345803336.
- [3] G. Raza, M.B. Singh, P.L. Bhalla (2020), "Somatic embryogenesis and plant regeneration from commercial soybean cultivars", *Plants (Basel)*, **9**(1), DOI: 10.3390/plants9010038.
- [4] K.H. Neumann (2000), *Some Studies on Somatic Embryogenesis: A Tool in Plant Biotechnology*, Institute for Plant Nutrition, Justus Liebig University, Germany, 27pp.
- [5] H.F. Sakhanokho, E.M. Babiker, B.J. Smith, et al. (2019), "Highfrequency somatic embryogenesis, nuclear DNA estimation of milkweed species (*Asclepias latifolia*, *A. speciosa*, and *A. subverticillata*), and genome size stability of regenerants", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **137**(1), pp.149-156, DOI: 10.1007/s11240-019-01559-w.
- [6] P.D. Smitha, K.R. Binoy, S.N. Ashalatha (2020), "Enhanced secondary somatic embryogenesis in suspension culture of four diploid banana cultivars from Kerala", *Int. J. Fruit Sci.*, **20**(2), pp.617-626, DOI: 10.1080/15538362.2020.1753138.
- [7] Y. Bao, G. Liu, X. Shi, et al. (2012), "Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* 'Samantha'", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **109**, pp.411-418, DOI: 10.1007/s11240-011-0105-6.
- [8] Y. Guan, S.G. Li, X.F. Fan, et al. (2016), "Application of somatic embryogenesis in woody plants", *Front. Plant Sci.*, **7**, DOI: 10.3389/fpls.2016.00938.
- [9] M.D. Bogdanovic, K.B. Cukovic, A.R. Subotic, et al. (2021), "Secondary somatic embryogenesis in *Centaurea erythraea* Rafn", *Plants*, **10**(2), DOI: 10.3390/plants10020199.
- [10] R.J. Rose, Y. Song (2017), "Somatic embryogenesis", *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, Second Edition, Academic Press, pp.474-479.
- [11] A.M. Wojcik, B. Wojcikowska, M.D. Gaj (2020), "Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants", *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(4), DOI: 10.3390/ijms21041333.
- [12] J. Yan, P. Peng, G. Duan, et al. (2021), "Multiple analyses of various factors affecting the plantlet regeneration of *Picea mongolica* (H. Q. Wu) W.D. Xu from somatic embryos", *Sci. Rep.*, **11**(1), DOI: 10.1038/s41598-021-83948-w.
- [13] Y. Yang, N. Wang, S. Zhao (2020), "Functional characterization of a WRKY family gene involved in somatic embryogenesis in *Panax ginseng*", *Protoplasma*, **257**(2), pp.449-458, DOI: 10.1007/s00709-019-01455-2.
- [14] H.A.M. Hernandez, M.L. Rodriguez, R.N.A. Montalvo, et al. (2019), "Signaling overview of plant somatic embryogenesis", *Front. Plant Sci.*, **10**, DOI: 10.3389/fpls.2019.00077.

- [15] M.T. Martinez, M.C.S. Jose, A.M. Vieitez, et al. (2017), "Propagation of mature *Quercus ilex* L. (holm oak) trees by somatic embryogenesis", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **131**, pp.321-333, DOI: 10.1007/s11240-017-1286-4.
- [16] D.T. Nhut, N.P. Huy, H.X. Chien, et al. (2012a), "In vitro culture of petiole longitudinal thin cell layer explants of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) and preliminary analysis of saponin content", *Int. J. Appl. Biol. Pharm.*, **3(3)**, pp.178-190.
- [17] D.T. Nhut, B.V.T. Vinh, T.T. Hien, et al. (2012b), "Effects of spermidine, proline and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)", *Afr. J. Biotechnol.*, **11(5)**, pp.1084-1091, DOI: 10.5897/AJB11.3186.
- [18] V.T. Hien, V.M. Luan, N.P. Huy, et al. (2014), "Direct somatic embryogenesis from leaf, petiole and rhizome explant of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.", *Academia J. Biol.*, **36**, pp.277-282, DOI: 10.15625/0866-7160/v36n1se.4408.
- [19] B.V.T. Vinh, V.T. Thuy, T.T. Hien, et al. (2014), "Factors effecting somatic embryogenesis of Ngoc Linh Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)", *Vietnam J. Sci. Technol.*, **1**, pp.73-84.
- [20] V.T. Hien, N.P. Huy, B.V.T. Vinh, et al. (2016), "Somatic embryogenesis from leaf transverse thin cell layer derived-callus of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)", *Vietnam J. Biotechnol.*, **14**, pp.63-73, DOI: 10.15625/1811-4989/14/1/9294.
- [21] R.L. Peterson, C.A. Peterson, L.H. Melville (2008), *Teaching Plant Anatomy Through Creative Laboratory Exercises*, NRC Press, **104(1)**, 164pp, DOI: 10.1093/aob/mcp112.
- [22] D.B. Duncan (1995), "Multiple range and multiple F tests", *J. Biometrics*, **11(1)**, pp.1-42, DOI: 10.2307/3001478.
- [23] I. Žur, E. Dubas, M. Krzewska, et al. (2015), "Hormonal requirements for effective induction of microspore embryogenesis in triticales ($\times$ *Triticosecale* Wittm.) anther cultures", *Plant Cell Rep.*, **34(1)**, pp.47-62, DOI: 10.1007/s00299014-1686-4.
- [24] T. Isah (2016), "Induction of somatic embryogenesis in woody plants", *Acta Physiol. Plant.*, **38(5)**, DOI: 10.1007/s11738-016-2134-6.
- [25] N. Sabooni, A. Shekafandeh (2017), "Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **130**, pp.313-321, DOI: 10.1007/s11240-017-1225-4.
- [26] C.M. Liu, Z.H. Xu, N. Chua (1993), "Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis", *Plant Cell*, **5(6)**, pp.621-630, DOI: 10.1105/tpc.5.6.621.
- [27] M. Umehara, H. Kamada (2005), "Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis", *Plant Biotechnology*, **22(4)**, pp.253-260, DOI: 10.5511/plantbiotechnology.22.253.
- [28] S. Avci, E. Can (2006), "Efficient somatic embryogenesis from immature inflorescences of Dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.)", *Prop. Orn. Plants*, **6(3)**, pp.134-139.
- [29] T.H. Przybył, E. Ratajczak, A. Obarska, et al. (2020), "Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two *Picea* species", *Int. J. Mol. Sci.*, **21(9)**, DOI: 10.3390/ijms21093394.
- [30] H.J. Gladfelter, J. Johnston, H.D. Wilde, et al. (2021), "Somatic embryogenesis and cryopreservation of *Stewartia* species", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **144**, pp.211-221, DOI: 10.1007/s11240-020-01834-1.

Nghiên cứu tạo dòng lạc năng suất và mang gen/QTL chịu hạn triển vọng

Trần Duy Việt*, Phan Thị Thanh, Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Thị Ngừ

Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ, Xã Nghi Kim, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

Ngày nhận bài 16/1/2023; ngày chuyển phản biện 18/1/2023; ngày nhận phản biện 10/2/2023; ngày chấp nhận đăng 15/2/2023

Tóm tắt:

Trong xu thế biến đổi khí hậu toàn cầu, đặc biệt là vấn đề hạn hán xảy ra ngày càng nghiêm trọng, diện tích và sản lượng lạc có xu hướng giảm dần theo thời gian, việc chọn tạo các dòng lạc mang gen/QTL chịu hạn với ngưỡng năng suất khá cao được coi là một trong những giải pháp hiệu quả và có tính chiến lược. Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp đánh giá ngoài đồng ruộng và phân tích sàng lọc gen chịu hạn, 6 giống lạc (TK10, Chùm Nghệ An, Sen Nghệ An, L20, L23 và L14) đã được chọn ra từ tập đoàn dòng/giống lạc có sẵn tại Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam làm vật liệu khởi đầu để lai tạo phục vụ cho việc chọn dòng có các đặc tính mong muốn. Với 5 tổ hợp lai tạo (giống Chùm Nghệ An làm cây mẹ; các giống làm bố gồm: TK10, Sen Nghệ An, L20, L23 và L14), nghiên cứu đã chọn lọc được 15 dòng lạc ưu tú thế hệ F_3 có năng suất đạt trên 29 tạ/ha, trong đó có 5 dòng F_{3-6} , F_{3-12} (Chùm Nghệ An $\times$ L23), F_{3-9} , F_{3-10} (Chùm Nghệ An $\times$ Sen Nghệ An) và F_{3-13} (Chùm Nghệ An $\times$ L14) mang locus quy định tính chịu hạn thông qua kỹ thuật điện di. Đáng chú ý là cả 5 dòng này đều có khả năng phục hồi cao trong môi trường hạn nhân tạo (lần lượt là 92,8-94,6, 84,4-88,4 và 80,0-83,4%), mức suy giảm năng suất trung bình (30,56-34,10%), tương ứng với khả năng chịu hạn khá ở mức điểm 3 ($G=21-40\%$).

Từ khóa: cây lạc, chịu hạn, mang gen/QTL.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) là một loại cây lấy dầu đem lại giá trị kinh tế cao và là cây họ đậu cải tạo đất. Theo P. Janila và cs (2016) [1], diện tích lạc trên thế giới chiếm 25,44 triệu ha, sản lượng 45,22 triệu tấn. Trung Quốc, Ấn Độ, Mỹ và Nigeria là các quốc gia dẫn đầu về sản xuất lạc. Khoảng 67% tổng diện tích lạc trên thế giới được trồng tại các vùng ít mưa và hạn hán, một trong những yếu tố chính ảnh hưởng đến năng suất lạc [2] và có thể khắc phục một phần bằng cách phát triển các giống lạc có khả năng thích ứng tốt hơn trong các điều kiện hạn chế nước tưới [3].

Cơ chế của tính thích ứng với điều kiện hạn hán ở lạc chủ yếu dựa vào khả năng tránh hạn của cây và tránh các thời điểm hạn hán nặng [4]. Trong khi đó, tính chịu hạn là một tính trạng phức tạp và được quyết định bởi phức hợp các gen. Do đó, chọn lọc dựa trên tính chịu hạn là công việc phức tạp và khó khăn [5]. Với cây lạc được trồng trong điều kiện bán khô hạn với đặc điểm chính là mưa trong thời gian ngắn, mưa thất thường và thời gian hạn hán kéo dài thì tính chịu hạn chủ động của cây càng trở nên quan trọng [3]. Việc chọn tạo các giống lạc chịu hạn bằng phương pháp lai truyền thống thường tốn thời gian và công sức do đây là tính trạng số lượng cũng như những khó khăn trong quá trình chọn lọc [6]. Những tiến bộ trong giải trình tự gen và nghiên cứu bản chất di truyền của các tính trạng đã phát triển phương pháp chọn lọc dựa vào chỉ thị phân tử (MAS) và được ứng dụng trên nhiều loài cây trồng cho nhiều tính trạng. Mặc dù một số locus liên quan đến tính chịu hạn trên lạc đã được xác định trong một số nghiên cứu trên thế giới, tuy nhiên có rất ít các nghiên cứu tập trung vào việc phát triển các chỉ thị phân tử để ứng dụng phương pháp MAS do các locus

quy định tính chịu hạn chỉ quyết định một phần nhỏ trong kiểu hình chịu hạn và đóng góp một phần nhỏ vào tính trạng năng suất.

Các tỉnh vùng Bắc Trung Bộ nước ta là vùng có diện tích gieo trồng lạc lớn, với diện tích hơn 55 nghìn ha (chiếm 25% so với cả nước), trong đó các tỉnh có diện tích trồng lạc lớn là Thanh Hóa hơn 10,5 nghìn ha, Nghệ An khoảng 15 nghìn ha, Hà Tĩnh khoảng 13,5 nghìn ha (theo Niên giám thống kê 2020), mặc dù cây lạc đã và đang có vị trí quan trọng trong sản xuất nông nghiệp, đặc biệt ở những vùng trồng lúa bị thiếu nước nhưng việc thiếu bộ giống tốt, năng suất cao, thích ứng với hạn hán do biến đổi khí hậu gây ra đang là vấn đề cần giải quyết kịp thời. Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “Nghiên cứu tạo dòng lạc năng suất và chịu hạn triển vọng” nhằm sớm bổ sung nguồn thực liệu đáp ứng được yêu cầu của sản xuất.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Thí nghiệm sử dụng các tập đoàn dòng/giống lạc do các đơn vị thành viên của Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam lai tạo, đột biến, nhập nội làm vật liệu khởi đầu, trong đó các giống Chùm Nghệ An, L20, TK10, L14, Sen Nghệ An và L23 được chọn lọc từ tập đoàn giống lạc hiện có tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ thông qua đánh giá và sàng lọc mang locus quy định tính trạng chịu hạn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng giống lạc Chùm Nghệ An làm mẹ (là giống có số lượng hoa ra nhiều, tập trung, phân cành sớm, số quả nhiều, vỏ mỏng...). Các giống lạc phổ biến đang được sử dụng làm các cây bố gồm: TK10, Sen Nghệ An (Sen Thắt), L20, L23 và L14 (là những giống có thân, tán gọn, năng suất, bộ rễ phát triển...).

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

A study on creating highly yielded and drought-tolerant QTL gene-possessed lines of peanut

Duy Viet Tran*, Thi Thanh Phan,
Thi Nhan Nguyen, Thi Ngu Nguyen

Agricultural Science Institute of Northern Central Vietnam (ASINCV),
Nghị Kim Commune, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

Received 16 January 2023; revised 10 February 2023; accepted 15 February 2023

Abstract:

In the trend of global climate changes and heavily occurring drought, particularly resulting in decreased productivity and cultivated areas of peanut production, the breeding and screening of highly yielded and drought-tolerant QTL gene-possessed peanut lines is considered a strategic and effective solution. In this study, the on-field assessment in combination with drought-tolerant gene screening was implemented and 6 peanut cultivars named TK10, Chum Nghe An, Sen Nghe An, L20, L23, and L14 were regarded as hybrid parents for the crossing-breeding program. Of 5 cross-breeding combinations (Chum Nghe An played the role of mother; 5 others were the fathers) 15 elite peanut lines of the F_3 generation with high yield (over 29 quintals/ha) and 5 of them coded F_{3-6} , F_{3-12} (Chum Nghe An $\times$ L23), F_{3-9} , F_{3-10} (Chum Nghe An $\times$ Sen Nghe An), and F_{3-13} (Chum Nghe An $\times$ L14) possessed the locus for drought tolerance determined by electrophoresis technology. It is also particularly mentioned that all these lines had a good recovery (92.8-94.6, 84.4-88.4, and 80.0-83.4%, respectively), average productivity loss (30.56-34.10%), and good drought tolerance (point 3: G=21-40%).

Keywords: drought tolerance, gene carrier/QTL, peanuts.

Classification number: 4.6

Các chỉ thị phân tử SSR (Simple sequence repeats) liên kết với các locus quy định tính chịu hạn trên lạc được sử dụng để xác định tính đa hình giữa các cặp bố mẹ dùng trong lai tạo và các chỉ thị phân tử SSR trội đa hình được dùng để thử nghiệm trên thế hệ F_3 của các cặp lai.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm đánh giá, chọn lọc vật liệu khởi đầu từ tập đoàn dòng/giống lạc tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ (thành phố Vinh, tỉnh Nghệ An). Các dòng/giống được bố trí thí nghiệm gieo tuần tự không lặp lại, mỗi dòng/giống gieo 10 m², với mật độ 30 hạt/m², bón phân với lượng: 40 kg N, 100 kg P₂O₅, 80 kg K₂O/ha (theo Quy chuẩn QCVN 01-57:2011/BNNPTNT về khảo nghiệm giá trị canh tác, sử dụng của giống lạc [7]). Đánh giá đặc điểm nông học, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất sử dụng phương pháp chuẩn của Viện Tài nguyên Di truyền Thực vật Quốc tế và Quy chuẩn QCVN 01-57:2011/BNNPTNT về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lạc [7].

Các dòng/giống có các tính trạng mong muốn sau khi đã chọn lọc sơ bộ được lấy mẫu lá (lá bánh tẻ) ở giai đoạn sau ra hoa để tách chiết DNA: Cắt nhỏ khoảng 50 mg mẫu lá tươi và cho vào ống effendorf 1,5 ml; thêm 450 μ l dung dịch đệm tách chiết CTAB có chứa 2-mercapthoethanol và nghiền nhuyễn mẫu; đặt ống effendorf chứa mẫu ở nhiệt độ 65°C trong 60 phút; ly tâm nhanh và bổ sung thêm 200 μ l Amonium acetate 7,5 M và đảo đều; đặt ống effendorf ở điều kiện nhiệt độ 4°C trong 60 phút; ly tâm nhanh và thêm vào mỗi ống 300 μ l Chloroform và đảo đều 10 lần; ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút; tách lấy phần dịch trong phía trên (khoảng 500 μ l) và chuyển sang ống effendorf mới; thêm lượng tương đương iso-propanol-2 để lạnh (khoảng 500 μ l), đảo nhẹ; ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút; loại bỏ phần dịch trong phía trên, giữ lại phần DNA kết tủa ở đáy ống; thêm 500 μ l Ethanol 70% và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút; loại bỏ dịch trong và lặp lại bước trên; loại bỏ dịch trong, để DNA khô tự nhiên trong khoảng 15 phút; thêm 50 μ l dịch đệm TE 0,1x hoặc nước cất; để DNA tan từ từ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

Sử dụng 9 chỉ thị phân tử SSR liên kết với các locus quy định tính chịu hạn trên lạc để xác định tính đa hình giữa các cặp bố mẹ dùng trong lai tạo. Giống lạc được dùng làm mẹ là giống Chum Nghệ An, trong khi các giống được dùng làm cây bố gồm có L14, L20, L23, TK10, Sen Thất. Kích thước sản phẩm PCR ước lượng (dựa trên thang chuẩn 100 bp). Mỗi chỉ thị phân tử SSR được thử nghiệm trên DNA của bố/mẹ (bảng 1). Trong mỗi phản ứng PCR dung tích 50 μ l có chứa các thành phần gồm: 15 μ l dung dịch ADN tách chiết từ lá lạc, 5 μ l dung dịch mỗi xuôi (nồng độ 2 μ M), 5 μ l dung dịch mỗi ngược (nồng độ 2 μ M) và 25 μ l dung dịch MyTaq Mix 2X (Bioline, Anh). Các thao tác thêm từng loại hóa chất vào phản ứng PCR được thực hiện trong điều kiện lạnh bằng cách đặt các ống effendorf trong nước đá.

Bảng 1. Các chỉ thị phân tử SSR liên kết với locus quy định tính chịu hạn.

Marker	Primer name	Sequence
Marker 1	TC1A02_F	5' GCAATTTGCACATTATCCGA 3'
	TC1A02_R	5' CAITGTCGGTTTCAAGTCTCAA 3'
Marker 2	TC3A12_F	5' GCCCATATCAAGCTCCAAAA 3'
	TC3A12_R	5' TAGCCAGCGAAGGACTCAAT 3'
Marker 3	TC3H07_F	5' CAATGGGAGGCAATCAAGT 3'
	TC3H07_R	5' GCCAAATGGTTCCTTCTCAA 3'
Marker 4	TC4D02_F	5' AAGTTGTTCCCGTTGCACTC 3'
	TC4D02_R	5' AAAACACCATAAGGTGAATCAA 3'
Marker 5	TC4E10_F	5' ACGTCATCTTCCTCTCTCT 3'
	TC4E10_R	5' CCATTTCTCTCGAACCAA 3'
Marker 6	TC9F10_F	5' ATCACAATCACAGCTCCAACA 3'
	TC9F10_R	5' GGCAAGTCTAATCTCTTTCCA 3'
Marker 7	TC11A04_F	5' ACTCTGCATGGATGGCTACAG 3'
	TC11A04_R	5' CATGTCGGTTTCAAGTCTCAA 3'
Marker 8	R12D06_F	5' AACACCTCAAATTCCTATCT 3'
	R12D06_R	5' AAAACGCGCTGGAGTTC 3'
Marker 9	RN0x614_F	5' CAGACAAGCCACAACAAGAAG 3'
	RN0x614_R	5' TTCAAGTCCAAGCACCTAACC 3'

Sau khi đã xác định được vật liệu khởi đầu tiến hành thí nghiệm lai hữu tính (lai đơn) để tạo ra các tổ hợp lai. Tiến hành phát triển quần thể lai và chọn dòng lạc ưu tú từ lai tạo bằng phương pháp phá hệ. Bắt đầu chọn lọc ở thế hệ F_2 . Cây F_2 được trồng thưa (mật độ 20-25 cây/m²) để có thể quan sát từng cây riêng biệt và tạo ra lượng hạt lớn. Chọn lọc ở F_2 chủ yếu dựa vào đánh giá trực quan, thường là những tính trạng có hệ số di truyền cao như: chiều cao cây, thời gian chín, kiểu cây, dạng hạt... [8, 9].

Gieo hạt thu được từ cây F_2 thành hàng ở vụ sau (mật độ 20-25 cây/m²). Đánh giá trực quan các dòng F_3 thông qua các tính trạng dễ quan sát. Chọn các cá thể tốt nhất trong các dòng tốt nhất. Đánh giá các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng theo Quy chuẩn QCVN 01-57:2011/BNNPTNT về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lạc [7].

Sử dụng các chỉ thị phân tử trội được dùng để xác định kiểu gen của các con lai thế hệ F_3 từ các cặp lai. Những con lai có khả năng tạo band trên gel điện di được xác định mang kiểu gen giống với kiểu gen của cây mẹ và kiểu gen giống với kiểu gen của giống dùng làm bố. Các sản phẩm từ phản ứng PCR được dùng để chạy điện di trên gel Agarose 2% ở hiệu điện thế 100 V trong 30 phút. Đệm TAE 1x được dùng để chuẩn bị bản gel và là dung dịch đệm trong máy điện di. Sản phẩm Redsafe được dùng để nhuộm bản gel thay thế cho Ethidium Bromide. Sản phẩm sau điện di được quan sát dưới máy chiếu tia UV ở bước sóng 350 nm.

Đánh giá khả năng chịu hạn bằng các thí nghiệm trong chậu nhựa (đường kính 40 cm và chiều cao 50 cm) bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 3 chậu, mỗi chậu trồng 7 cây. Thời điểm đánh giá: sau khi mọc mầm 10 ngày (giai đoạn cây con), khi cây ra hoa 20% (giai đoạn cây ra hoa) và cuối ra hoa - hình thành quả. Gây hạn nhân tạo 3, 5 và 7 ngày, đối chứng không gây hạn được tưới nước nhằm duy trì ẩm độ đất 70-80% (sử dụng máy đo ẩm độ cầm tay để xác định). Để đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng lạc tiến hành đánh giá khả năng phục hồi và mức suy giảm năng suất sau khi gây hạn 3, 5 và 7 ngày [9, 10].

- Đánh giá khả năng chịu hạn theo tỷ lệ cây phục hồi sau khi gây hạn [11]. Sau khi gây hạn với các thời gian gây hạn 3, 5 và 7 ngày, tiến hành tưới nước để xác định khả năng phục hồi của cây theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ cây phục hồi} = \frac{\text{Số cây phục hồi}}{\text{Tổng số cây}} \times 100\%$$

Mức độ phục hồi: cấp 1: 10-20%; cấp 2: 20-40%; cấp 3: 40-60%; cấp 4: 60-80%; cấp 5: 80-100%.

- Đánh giá khả năng chịu hạn dựa vào mức suy giảm năng suất (G) theo thang điểm sau: điểm 1: chịu hạn kém khi $G > 80\%$; điểm 2: chịu hạn yếu khi $G = 61-80\%$; điểm 3: chịu hạn trung bình khi $G = 41-60\%$; điểm 4: chịu hạn khá khi $G = 21-40\%$; điểm 5: chịu hạn tốt khi $G < 21\%$. Công thức tính mức suy giảm năng suất G như sau:

$$G = 100 - \left(\frac{M_2}{M_1} \right) \times 100$$

trong đó M_1 là năng suất hạt tính trên 1 chậu trong điều kiện không gây hạn nhân tạo; M_2 là năng suất hạt tính trên 1 chậu trong điều kiện gây hạn nhân tạo.

Số liệu giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD) được tính bằng phần mềm bằng Excel.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm nông sinh học và chọn lọc vật liệu khởi đầu

Vụ xuân năm 2020, đã tiến hành đánh giá, chọn lọc và duy trì các giống lạc làm bố mẹ để tri duy nguồn gen phục vụ công tác lai tạo và bổ sung nguồn vật liệu cho công tác chọn tạo giống lạc mới (bảng 2).

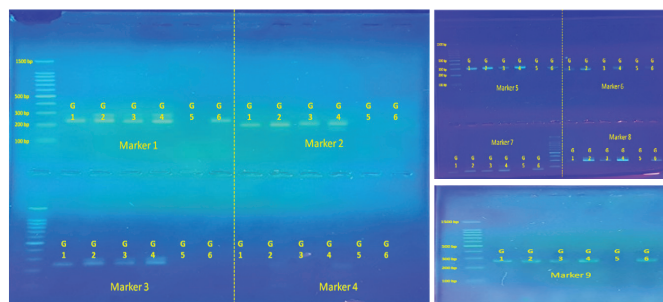
Bảng 2. Một số đặc điểm nông sinh học chính của các giống lạc làm nguồn vật liệu khởi đầu cho tạo dòng lạc theo hướng năng suất và chịu hạn.

TT	Tên giống	Hình thái	Màu sắc lá	Số quả chác/cây	Năng suất (tấn/ha)
1	TK10	Thân đứng, lá dài	Xanh	10,7	3,79
2	Chùm Nghệ An	Thấp cây, thân nửa đứng, cành nhiều	Xanh nhạt	11,8	3,21
3	Sen Nghệ An	Thân nửa đứng	Xanh nhạt	10,6	3,84
4	L20	Thân nửa đứng	Xanh nhạt	10,8	3,89
5	L23	Thân đứng, tán gọn	Xanh đậm	10,6	3,80
6	L14	Thân đứng	Xanh đậm	10,7	3,85

Sau khi đánh giá đặc điểm nông học, bước đầu đã chọn được các dòng/giống lạc có các tính trạng mong muốn. Sử dụng 9 chỉ thị phân tử SSR liên kết với các locus quy định tính chịu hạn trên các dòng có đặc điểm mong muốn để xác định tính đa hình giữa các cặp bố mẹ dùng trong lai tạo: TK10, Chùm Nghệ An, Sen Nghệ An, L20, L23 và L14. Mỗi chỉ thị phân tử SSR được thử nghiệm trên DNA của giống lạc Chùm Nghệ An (cây mẹ) và các giống lạc được dùng làm bố. Kích thước sản phẩm PCR ước lượng (dựa trên thang chuẩn 100 bp) của các chỉ thị phân tử được trình bày ở bảng 3 và hình 1.

Bảng 3. Kích thước sản phẩm PCR của các chỉ thị phân tử SSR.

TT	Tên chỉ thị	Số mẫu giống có xuất hiện băng vạch	Số lượng band	Kích thước (bp)
1	TC1A02	5	1	~240
2	TC3A12	4	1	~200
3	TC3H07	4	1	~250
4	TC4D02	0	0	-
5	TC4E10	5	1	~300
6	TC9F10	4	1	~275
7	TC11A04	5	1	~90
8	R12D06	4	1	~200
9	RN0x614	5	1	~275



Hình 1. Các chỉ thị phân tử SSR được thử nghiệm trên các giống bố mẹ.

Kết quả cho thấy, hầu hết các chi thị phân tử SSR đều có khả năng nhân band trên các giống lạc làm bố/mẹ dùng để lai tạo, trừ chi thị số 4 (TC4DO2), nghĩa là 8 chi thị phân tử 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 và 9 đều có thể được dùng làm chi thị trội để xác định kiểu gen của các con lai của dòng mẹ (Chùm Nghệ An) và dòng bố (L23). Tương tự, các chi thị số 2 (TC3A12) và 3 (TC3H07) không có khả năng nhân band từ giống L14 (dùng làm cây bố) và có thể dùng làm chi thị trội để xác định kiểu gen của con lai giữa Chùm Nghệ An $\times$ L14. Marker số 6 (TC9F10) nhân band từ giống mẹ nhưng không có khả năng nhân band từ giống lạc TK10 được dùng làm bố nên có thể được dùng để xác định kiểu gen của các con lai từ cặp lai Chùm Nghệ An $\times$ Sen Nghệ An.

3.2. Tạo vật liệu khởi đầu theo hướng năng suất và chịu hạn

Từ kết quả đánh giá nguồn giống bố mẹ trước đó bằng phương pháp lai hữu tính (lai đơn), nghiên cứu đã sử dụng giống Chùm Nghệ An làm cây mẹ và các giống TK10, Sen Nghệ An, L20, L23 và L14 làm cây bố (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả thực hiện lai tạo vật liệu khởi đầu.

TT	Tổ hợp lai (Bố/mẹ)	Thời gian lai (ngày)	Tổng số hoa lai (hoa)	Số quả lai thu hoạch (quả)	Tỷ lệ đậu quả lai (%)
1	Sen Nghệ An $\times$ Chùm Nghệ An	8	161	53	33,1
2	L23 $\times$ Chùm Nghệ An	10	164	44	27,1
3	TK10 $\times$ Chùm Nghệ An	9	151	49	32,6
4	L20 $\times$ Chùm Nghệ An	7	155	61	39,4
5	L14 $\times$ Chùm Nghệ An	7	156	59	38,1

Kết quả bảng 4 cho thấy, trong thời gian lai tạo 7-10 ngày liên tục (giai đoạn ra hoa rộ) các tổ hợp lai có số hoa lai 151-164 hoa, số quả lai thu hoạch 44-61, với tỷ lệ đậu quả dao động 27,1-39,4%. Đây là nguồn vật liệu phục vụ công tác chọn lọc dòng/giống lạc có năng suất cao, có khả năng chịu hạn. Như vậy, tỷ lệ lai thành công không những phụ thuộc vào thao tác lai mà có thể còn phụ thuộc vào khả năng kết hợp giữa các giống được chọn làm bố mẹ.

3.3. Phát triển quần thể lai và chọn lọc dòng ưu tú theo hướng năng suất, chịu hạn

Tiến hành phát triển quần thể lai ở 2 vụ tiếp theo từ 446 hạt lai của 5 quần thể lai được gieo riêng với mật độ 25 cây/m², sau đó loại bỏ cây không phải là cây lai, cây không mong muốn, cây nhiễm bệnh; thu được 158 cá thể F₁ để gieo và chọn lọc tiếp ở thế hệ F₂ ở vụ sau, từ 158 cá thể F₁ thu được, tiếp tục gieo và bắt đầu chọn lọc ở thế hệ F₂. Cây F₂ được trồng thưa (mật độ 25 cây/m²) để có thể quan sát từng cây riêng biệt và tạo ra lượng hạt lớn, dựa vào đánh giá trực quan, thường là những tính trạng có hệ số di truyền cao, như: chiều cao cây, thời gian chín, kiểu cây, dạng hạt, tính kháng bệnh... Kết quả đã chọn lọc được 83 cá thể F₂ và thu hạt riêng từng cây.

Vụ xuân 2022, tiến hành gieo 83 cá thể F₂ của 5 quần thể lai gieo thành hàng tuần tự không lặp lại (dòng F₃) mỗi hàng 25 cây. Qua theo dõi, chọn lọc, đánh giá về đặc điểm nông sinh học đã chọn được 15 dòng lạc triển vọng, tiến hành thu hoạch, phân tích các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của 15 dòng lạc kết quả thu được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của các con lai thế hệ F₃.

TT	Cặp lai		Tên dòng	Số quả chắc/ cây (quả)	Khối lượng 100 quả (g)	Khối lượng 100 hạt (g)	Tỷ lệ hạt/ quả (%)	Năng suất thực thu (tạ/ha)
	Mẹ	Bố						
1	Chùm Nghệ An	Sen Nghệ An	F ₃₋₅	9,5	130,5	53,6	61,1	29,4
			F ₃₋₈	8,5	139,3	54,5	64,1	28,3
			F ₃₋₉	9,3	133,3	52,6	63,5	28,1
			F ₃₋₁₀	9,2	131,8	51,4	63,7	30,2
2	Chùm Nghệ An	L23	F ₃₋₄	9,2	139,1	53,2	63,6	30,1
			F ₃₋₆	9,5	132,5	52,5	65,5	29,1
			F ₃₋₁₂	7,9	136,4	53,3	62,5	28,3
			F ₃₋₂	9,5	130,5	50,0	64,4	31,2
3	Chùm Nghệ An	L20	F ₃₋₁₅	7,9	138,3	52,6	61,9	29,6
			F ₃₋₁₄	9,8	139,9	55,2	59,9	30,0
			F ₃₋₁	8,9	133,9	55,7	64,2	29,6
4	Chùm Nghệ An	TK10	F ₃₋₁₁	7,9	133,2	53,2	65,8	28,6
			F ₃₋₃	7,9	133,4	52,5	62,9	28,2
5	Chùm Nghệ An	L14	F ₃₋₁₃	8,2	136,4	53,0	65,2	28,5
			F ₃₋₇	9,8	132,3	51,3	64,0	30,9
Trung bình				8,75	134,72	53,03	63,69	29,27
SD				0,81	3,24	1,54	1,67	1,12

Kết quả chọn lọc, đánh giá, phân tích xử lý về năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất 15 dòng lạc thế hệ F₃ (bảng 5) cho thấy, số quả chắc/cây của 15 dòng lạc dao động 7,9-9,8, dòng F₃₋₇ và F₃₋₁₄ có số quả chắc cao nhất là 9,8 quả/cây, trung bình số quả chắc/cây của 15 dòng là 8,75 quả; khối lượng 100 quả của 15 dòng được chọn dao động 130,5-139,9 g, cao nhất là dòng F₃₋₄ đạt 139,9 g, thấp nhất là dòng F₃₋₂ chỉ đạt 130,5 g. Khối lượng 100 hạt cao nhất là dòng F₃₋₁ đạt 55,7 g, thấp nhất là dòng F₃₋₂ chỉ đạt 50,0 g. Năng suất thực thu của các dòng đạt 28,1-31,2 tạ/ha, trung bình năng suất các dòng đạt trên 29 tạ/ha.

Các chi thị phân tử trội được dùng để xác định gen liên quan đến tính trạng chịu hạn của các con lai từ các cặp lai L14 $\times$ Chùm Nghệ An (F₃₋₃, F₃₋₇, F₃₋₁₃), L23 $\times$ Chùm Nghệ An (F₃₋₄, F₃₋₆, F₃₋₁₂) và Sen Nghệ An $\times$ Chùm Nghệ An (F₃₋₅, F₃₋₈, F₃₋₉, F₃₋₁₀). Những con lai có khả năng tạo band trên gel điện di được xác định mang kiểu gen giống với kiểu gen của giống Chùm Nghệ An (cây mẹ), trong khi các con lai không có khả năng tạo band được xác định mang kiểu gen giống với kiểu gen của giống dùng làm bố. Không có chi thị phân tử SSR nào cho kết quả đa hình giữa giống Chùm Nghệ An, TK10 và L20 nên chúng tôi không tiến hành phân tích kiểu gen trên các con lai từ các cặp lai TK10 $\times$ Chùm Nghệ An và L20 $\times$ Chùm Nghệ An.

Bảng 6. Kết quả xác định gen liên quan đến tính trạng chịu hạn của các con lai thế hệ F₃.

Chi thị	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker
Con lai	1	2	3	5	6	7	8	9
F ₃₋₂	-	-	-	-	M	-	-	-
F ₃₋₃	-	M	M	-	-	-	-	-
F ₃₋₄	M	M	M	M	M	M	M	M
F ₃₋₆	B	B	B	B	B	B	B	B
F ₃₋₇	-	M	M	-	-	-	-	-
F ₃₋₈	-	-	-	-	M	-	-	-
F ₃₋₉	-	-	-	-	B	-	-	-
F ₃₋₁₀	-	-	-	-	B	-	-	-
F ₃₋₁₂	B	M	M	M	M	M	M	B
F ₃₋₁₃	-	B	B	-	-	-	-	-

M: kiểu gen giống với cây làm mẹ (Chùm Nghệ An); B: kiểu gen giống với cây làm bố (L23, L14, Sen Nghệ An).

Kết quả bảng 6 cho thấy, dòng F_{3-2} , F_{3-3} , F_{3-4} , F_{3-7} và F_{3-8} mang kiểu gen tương đồng với kiểu gen của giống Chùm Nghệ An (cây mẹ) và nhiều khả năng không có các locus quy định tính chịu hạn. Trong khi đó, dòng F_{3-6} có kiểu gen giống với kiểu gen của các giống được dùng làm cây bố và có khả năng mang nhiều locus quy định tính chịu hạn. Các dòng F_{3-9} và F_{3-10} có khả năng mang locus liên kết với chỉ thị phân tử số 6 (TC9F10) quy định tính chịu hạn. Tương tự, dòng F_{3-13} có khả năng mang các locus quy định tính chịu hạn được thể hiện qua các chỉ thị phân tử số 2 (TC3A12) và 3 (TC3H07). Các con lai F_{3-6} , F_{3-9} , F_{3-10} , F_{3-12} và F_{3-13} có kiểu gen giống với kiểu gen tại các vị trí liên kết với các chỉ thị phân tử được thử nghiệm. Như vậy, các con lai này có khả năng mang locus quy định tính chịu hạn, trong đó con lai F_{3-6} có khả năng mang nhiều locus khác nhau liên quan đến tính chịu hạn.

3.4. Chọn lọc, đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng lạc mới tạo trong điều kiện nhân tạo

Năm 2022, tại nhà lưới Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ tiến hành đánh giá khả năng chịu hạn của 5 dòng lạc đã được đánh giá về năng suất và mang locus quy định tính chịu hạn trong điều kiện nhân tạo là thế hệ F_3 của cây mẹ (Chùm Nghệ An) và các cây bố (L23, Sen Nghệ An, L14). Các dòng được bố trí trong các chậu nhựa có đường kính 40 cm và cao 50 cm, để trong nhà lưới có mái che màng mỏng trong suốt (tránh mưa) và đã đổ giá thể (đất + phân bón + vôi trộn đều) gieo theo khối ngẫu nhiên hoàn toàn, 3 lần nhắc lại, 3 chậu/lần nhắc, mỗi chậu 7 cây, sau đó tỉa bỏ để lại 5 cây. Bố trí 3 chậu đối chứng/dòng. Các chậu đối chứng không gây hạn được tưới nước nhằm duy trì ẩm độ đất đạt 70-80%. Sau khi gây hạn nhân tạo tiến hành đánh giá và tính toán theo chỉ số khả năng phục hồi của các dòng ở các giai đoạn (bảng 7).

Bảng 7. Khả năng phục hồi của các dòng lạc trong điều kiện nhân tạo.

TT	Tên dòng	Tỷ lệ phục hồi			
		Sau 3 ngày (%)	Sau 5 ngày (%)	Sau 7 ngày (%)	Trung bình
1	F_{3-6}	93,7	85,4	82,4	87,2
2	F_{3-9}	93,7	86,5	80,0	86,7
3	F_{3-10}	94,5	88,4	83,4	88,8
4	F_{3-12}	94,6	85,4	81,2	87,0
5	F_{3-13}	92,8	84,4	82,4	86,5

Kết quả bảng 7 cho thấy, các dòng đều có khả năng phục hồi 92,8-94,6, 84,4-88,4 và 80,0-83,4%, tương ứng thời gian gây hạn 3, 5 và 7 ngày. Dòng lạc F_{3-10} có tỷ lệ phục hồi cao nhất trong thời gian gây hạn 3, 5 và 7 ngày ở các giai đoạn cây con, ra hoa, hình thành quả lần lượt là 94,5, 88,4 và 83,4%.

Sau khi gây hạn xong tiến hành chăm sóc, theo dõi đánh giá và thu hoạch để riêng từng chậu. Qua phân tích, xử lý mẫu sau thu hoạch và tính toán theo chỉ số suy giảm năng suất của các dòng khi gây hạn 3, 5 và 7 ngày thu được kết quả ở bảng 8.

Bảng 8. Mức suy giảm năng suất của các dòng lạc.

TT	Tên dòng	Mức suy giảm năng suất (%)			
		Gây hạn 3 ngày	Gây hạn 5 ngày	Gây hạn 7 ngày	Trung bình
1	F_{3-6}	19,79	32,15	50,36	34,10
2	F_{3-9}	18,72	32,40	51,14	34,09
3	F_{3-10}	18,69	29,52	49,84	32,68
4	F_{3-12}	16,96	28,59	46,58	30,56
5	F_{3-13}	18,37	31,26	50,11	33,25

Các dòng lạc tham gia thí nghiệm đều có mức suy giảm năng suất tăng dần theo thời gian gây hạn lần trước 16,96-19,79, 28,59-32,4 và 46,58%-51,14%, tương ứng với thời gian gây hạn 3, 5 và 7 ngày. Cả 5 dòng F_{3-6} , F_{3-12} (Chùm Nghệ An $\times$ L23), F_{3-9} , F_{3-10} (Chùm Nghệ An $\times$ Sen Nghệ An) và F_{3-13} (Chùm Nghệ An $\times$ L14) tham gia thí nghiệm đều có mức suy giảm năng suất trung bình 30,56-34,10%, đều có khả năng chịu hạn khá, điểm 3 ($G=21-40\%$), trong đó dòng F_{3-12} có mức suy giảm năng suất thấp nhất (30,56%) (bảng 8).

4. Kết luận

Kết quả đánh giá, lai tạo 6 vật liệu khởi đầu (giống chùm Nghệ An làm cây mẹ, các giống làm bố gồm: TK10, Sen Nghệ An, L20, L23, L14) đã thu được 5 tổ hợp lai, tổng số 446 hạt lai. Thông qua đánh giá đặc điểm nông sinh học của các quần thể lai đã thu được 158 cá thể F_1 và 83 cá thể F_2 . Từ 83 cá thể F_2 tiến hành đánh giá, chọn lọc được 15 dòng lạc mới thế hệ F_3 : F_{3-5} , F_{3-8} , F_{3-9} , F_{3-10} (Chùm Nghệ An $\times$ Sen Nghệ An); F_{3-4} , F_{3-6} , F_{3-12} (Chùm Nghệ An $\times$ L23); F_{3-1} , F_{3-11} (Chùm Nghệ An $\times$ TK10); F_{3-2} , F_{3-14} , F_{3-15} (Chùm Nghệ An $\times$ L20) và F_{3-3} , F_{3-7} , F_{3-13} (Chùm Nghệ An $\times$ L14) năng suất đạt trên 29 tạ/ha và sàng lọc thu được 5 dòng F_{3-6} , F_{3-9} , F_{3-10} , F_{3-12} và F_{3-13} mang locus quy định tính chịu hạn. Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn trong điều kiện nhân tạo của 5 dòng F_{3-6} , F_{3-9} , F_{3-10} , F_{3-12} và F_{3-13} cho thấy cả 5 dòng đều có khả năng phục hồi tốt: 92,8-94,6, 84,4-88,4 và 80,0-83,4%, đồng thời có mức suy giảm năng suất trung bình 30,56-34,10%, tương ứng với khả năng chịu hạn khá, điểm 3 ($G=21-40\%$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. Janila, M.T. Variath, M.K. Pandey, et al. (2016), "Genomic tools in groundnut breeding program: Status and perspectives", *Frontiers in Plant Science*, 7, DOI: 10.3389/fpls.2016.00289.
- [2] J. Smartt (2012), *The Groundnut Crop: A Scientific Basis for Improvement*, Springer Science & Business Media, 752pp.
- [3] K. Ravi, V. Vadez, S. Isobe, et al. (2011), "Identification of several small maineffect QTLs and a large number of epistatic QTLs for drought tolerance related traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.)", *Theoretical and Applied Genetics*, 122(6), pp.1119-1132, DOI: 10.1007/s00122-010-1517-0.
- [4] J. Zhang, H. Zheng, A. Aarti, et al. (2001), "Locating genomic regions associated with components of drought resistance in rice: Comparative mapping within and across species", *Theoretical and Applied Genetics*, 103(1), pp.19-29, DOI: 10.1007/s001220000534.
- [5] N.C. Collins, F. Tardieu, R. Tuberosa (2008), "Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: Where do we stand?", *Plant Physiology*, 147(2), pp.469-486, DOI: 10.1104/pp.108.118117.
- [6] J.M. Ribaut, C. Jiang, D.G.D. Leon, et al. (1997), "Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies", *Theoretical and Applied Genetics*, 94, pp.887-896, DOI: 10.1007/s001220050492.
- [7] Ministry of Agriculture and Rural Development (2011), *QCVN 01-57: 2011/BNNPTNT on Testing The Value of Cultivation and Use of Peanut Varieties* (in Vietnamese).
- [8] V.D. Hoa, N.V. Liet, N.V. Hoan (2005), *Selected Textbooks Plant Varieties*, Vietnam Academy of Agriculture, 172pp (in Vietnamese).
- [9] P.T. Mai, D.T.K. Cuc, N.V. Quang, et al. (2017), "Results evaluate the drought tolerance ability under artificial conditions of some peanut lines/varieties as animals materials for breeding selection", *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology*, 23(12), pp.21-25 (in Vietnamese).
- [10] H.H. Cuong (2017), *Summary Report on The Topic Research on Selection, Creation and Development Developing Drought-Resistant, Short-Term Soybean and Peanut Varieties for The South Central Coast and Central Highlands*, North Central Institute of Agricultural Science and Technology (in Vietnamese).
- [11] L.T. Binh, L.T. Muoi (1998), *Gene Isolation and Selection of Foreign Tolerant Linesunfavorable Conditions in Rice*, Hanoi National University Publishing House, 267pp (in Vietnamese).

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid đến sự phát sinh biến dị trên lan Cẩm Cù (*Hoya kerrii*)

Ngô Minh Trí¹, Trần Lê Nguyên¹, Trần Thị Mỹ Tiên¹, Lâm Ngọc Kim Trúc¹, Phùng Hoàng Yến¹,
Dương Nguyễn Mai Anh¹, Phùng Thị Hằng², Nguyễn Thị Pha^{1*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

²Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/7/2022; ngày chuyển phản biện 12/7/2022; ngày nhận phản biện 2/8/2022; ngày chấp nhận đăng 5/8/2022

Tóm tắt:

Lan Cẩm Cù (*Hoya kerrii*) được nhiều người ưa chuộng vì sự phong phú về hình dạng lá, màu sắc và hương thơm của hoa. Để gia tăng sự đa dạng, phong phú cho lan Cẩm Cù, mẫu lá được cấy vào môi trường MS bổ sung 2,4-D và α -naphthylacetic acid (NAA) (nồng độ 4-7 mg/l) nhằm khảo sát khả năng cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh biến dị. Tỷ lệ tạo sẹo (100%) sau 15 ngày nuôi cấy ở tất cả các nghiệm thức (NT) có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, trong khi NT đối chứng không cho thấy sự hình thành mô sẹo. Kết quả nhân nhanh mô sẹo cho thấy, mẫu lá ở NT 5 mg/l 2,4-D cho kích thước mô sẹo lớn nhất (2,98 cm). Các mô sẹo 45 ngày tuổi được chuyển sang môi trường tái sinh MS + 1 mg/l IBA + 3,5 mg/l BAP, thời điểm chồi xuất hiện đối với mẫu mô sẹo xử lý bằng NAA là 95 ngày sau khi cấy chuyển với tỷ lệ tái sinh cao nhất (66,67%) và sớm hơn so với mô sẹo xử lý 2,4-D (225 ngày, tỷ lệ tái sinh 50%). Kết quả phân tích sự khác biệt di truyền bằng chỉ thị RAPD ghi nhận tổng số băng DNA là 330, kích thước phân tử dao động 170-2700 bp. Chỉ số PIC trong phạm vi 0,23-0,40. Mẫu xử lý với 5 mg/l NAA có hệ số tương đồng thấp nhất 0,455; các chỉ tiêu sinh trưởng như đường kính cuống lá, chiều dày mô bì, diện tích bó mạch, số lượng bó gỗ ghi nhận được ở mẫu xử lý với 5 mg/l NAA vượt trội hơn so với đối chứng.

Từ khóa: α -naphthylacetic acid, biến dị, *Hoya kerrii*, Polymorphism information content, 2,4-D.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Lan Cẩm Cù là một trong những loại cây cảnh được nhiều người ưa chuộng vì có hình dạng lá, màu sắc hoa đa dạng và hương thơm đặc trưng. Lan Cẩm Cù nuôi cấy mô được xem là nguồn cây giống ổn định có thể đáp ứng số lượng lớn cho người trồng. Bên cạnh đó, việc tạo thêm nhiều dòng hoa lan Cẩm Cù mới sẽ góp phần làm gia tăng sự đa dạng của loài cây này, đáp ứng nhu cầu người trồng. Theo một số nghiên cứu cho thấy, auxin có mối liên hệ trực tiếp đến việc phát sinh biến dị khi sử dụng ở nồng độ cao, làm thay đổi sinh lý của thực vật và làm phát sinh biến dị. Auxin là thuật ngữ chung đại diện cho nhóm những chất điều hòa sinh trưởng thực vật tạo ra sự vươn dài của tế bào chồi trong vùng gần đỉnh sinh trưởng [1, 2]. Các chất đại diện cho nhóm này gồm Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA), NAA; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)... Trong số đó, 2 chất điều hòa sinh trưởng được tổng hợp nhân tạo là NAA và 2,4-D có tác dụng lên cây trồng tương tự các chất hormone sinh trưởng thực vật như kích thích sự kéo dài và tăng trưởng của rễ [1-3]. Hệ gen của tế bào thực vật bị tác động mạnh mẽ bởi NAA, 2,4-D như một tác nhân ảnh hưởng đến sự phát sinh đột biến hóa học. Tác động gây biến dị của NAA và 2,4-D là làm ảnh hưởng đến hoạt động phân bào, những thay đổi trong cấu trúc nhiễm sắc thể và chất nhiễm sắc cũng như làm thay đổi chu kỳ phân bào. Trong tế bào thực vật, NAA và 2,4-D gây ra các bất thường về nguyên phân và giảm phân, cả ở *in vivo* lẫn *in vitro* [2, 3]. Các chất này được ứng dụng vào môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm kích

thích sự tăng trưởng, khả năng kéo dài tế bào và khởi đầu sự phân chia tế bào [1].

Chỉ thị phân tử RAPD được xem là hữu hiệu để xác định các biến dị di truyền của các dòng đột biến khi so với các dòng hoang dại. Phương pháp này đã được sử dụng hiệu quả để phân tích các biến dị di truyền của hoa cúc sau xử lý tia gamma [4]. Vì thế, nghiên cứu sự ảnh hưởng của 2,4D và NAA đến sự phát sinh đột biến trên cây lan Cẩm Cù được đề xuất thực hiện.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Giống lan Cẩm Cù 1 năm tuổi được trồng tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ (hình 1).



Hình 1. Cây lan Cẩm Cù. (A) Lá và thân lan; (B) Hoa lan Cẩm Cù.

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

Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid on the variant formation of Valentine Hoya (*Hoya kerrii*)

Minh Tri Ngo¹, Le Nguyen Tran¹, Thi Mỹ Tien Tran¹,
Ngoc Kim Truc Lam¹, Hoang Yen Phung¹,
Nguyen Mai Anh Duong¹, Thi Hang Phung², Thi Pha Nguyen^{1*}

¹Institute of Biotechnology Research and Development, Can Tho University,
Campus 2, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

²School of Education, Can Tho University,
Campus 2, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 8 July 2022; revised 2 August 2022; accepted 5 August 2022

Abstract:

Valentine Hoya (*Hoya kerrii*) is favoured by many people for its richness in leaf shape, colour and flower fragrance. To increase the diversity and abundance of Hoya, leaf samples were transplanted into MS medium supplemented with 2,4-D and α -naphthylacetic acid (NAA) (concentration 4-7 mg/l) to create callus and induce mutations. Calli formation rate was observed at 100% after 15 days of culture in all treatments supplemented with growth regulators, while the control treatment showed no callus formation. The results of rapid callus multiplication showed that the callus-forming leaf sample obtained from the treatment of 5 mg/l 2,4-D gave the largest callus size (2.98 cm). The 45-day-old calli were transferred to MS + 1 mg/l IBA + 3.5 mg/l BAP regeneration medium, the time of shoot appearance for callus samples treated with NAA was 95 days after subculture with the highest regeneration rate of 66.67%, earlier than 2,4-D treated calli (225 days, 50% regeneration rate). The results of genetic divergence analysis using RAPD markers recorded a total of 330 DNA bands with molecular sizes ranging from 170 to 2700 bp. The polymorphism information content index was calculated in the 0.23-0.40 range. Samples treated with 5 mg/l NAA had the lowest similarity coefficient of 0.455, growth parameters such as petiole diameter, dermal tissue thickness, vascular bundle area, and a number of wood bundles recorded in samples treated with 5 mg/l NAA were superior to those of the control.

Keywords: α -naphthylacetic acid, *Hoya kerrii*, polymorphism information content, variation, 2,4-D.

Classification number: 4.6

2.2. Hóa chất

Môi trường nuôi cấy MS (Murashige và Skoog) + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar, pH 5,7-5,8). Một số hóa chất khác như: 2,4-D, NAA, BAP (6-Benzylaminopurine), *Taq* DNA Polymerase (Meridian BioScience), môi RAPD (Phusa Biochem) (bảng 1), các hóa chất thực hiện ly trích DNA và phản ứng PCR.

Bảng 1. Danh sách môi và trình tự môi sử dụng.

Số thứ tự	Tên môi	Trình tự môi
1	OPF - 01	5' - ACGGATCCTG - 3'
2	OPF - 04	5' - GGTGATCAGG - 3'
3	OPF - 03	5' - CCTGATCACC - 3'
4	OPF - 02	5' - GAGGATCCCT - 3'
5	OPF - 05	5' - CCGAATTCCT - 3'
6	OPD - 05	5' - TGAGCGGACA - 3'
7	OPA - 14	5' - TCTGTGCTGG - 3'
8	OPS - 11	5' - AGTCGGGTGG - 3'
9	OPG - 04	5' - AGCGTGTCTG - 3'
10	OPR - 07	5' - ACTGGCCTGA - 3'
11	OPB - 11	5' - GTAGACCCGT - 3'
12	OPK - 14	5' - CCCGCTACAC - 3'
13	OPJ - 13	5' - CCACACTACC - 3'
14	OPT - 05	5' - GGGTTTGGCA - 3'
15	OPC - 05	5' - GATGACCGCC - 3'

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D, NAA lên khả năng cảm ứng mô sẹo và phát sinh biến dị: Lá lan Cẩm Cù bánh tẻ có kích thước 4x7 cm được rửa dưới vòi nước chảy trong 5 phút, khử trùng bề mặt với cồn 70° trong 30 giây và rửa lại với nước cất vô trùng 3 lần. Mẫu sau đó được ngâm trong dung dịch NaClO 5% bổ sung 3 giọt nước rửa chén trong 15 phút, rửa với nước cất vô trùng 3-5 lần. Sau đó, các mẫu lá được cắt thành các mảnh hình vuông (kích thước 1x1 cm) và cấy vào bình 250 ml chứa 50 ml môi trường MS bổ sung 2,4-D, NAA với các nồng độ 0, 4, 5, 6 và 7 mg/l. Thí nghiệm 2 nhân tố gồm loại chất cảm ứng và nồng độ chất cảm ứng, lặp lại 3 lần mỗi lần 5 bình, mỗi bình cấy 3 mảnh lá. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ phần trăm mẫu hình thành mô sẹo.

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D, NAA khi cảm ứng tạo mô sẹo lên khả năng nhân nhanh mô sẹo: Mẫu mô sẹo sau 15 ngày nuôi cấy được chuyển vào môi trường nhân nhanh mô sẹo MS + 1 mg/l NAA + 1 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BAP [5] để đánh giá sự gia tăng kích thước của mô sẹo thu được từ các NT cảm ứng tạo mô sẹo. Thí nghiệm 2 nhân tố được lặp lại 3 lần, mỗi lần cấy 3 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi là kích thước mô sẹo.

Khảo sát khả năng tái sinh chồi của các mô sẹo xử lý với 2,4-D, NAA sau khi nhân nhanh: Các mô sẹo sau khi nhân nhanh được tái sinh chồi trên môi trường MS + 1 mg/l IBA + 3,5 mg/l BAP. Thí nghiệm 1 nhân tố được lặp lại 3 lần, mỗi lần cấy 10 mô sẹo. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ và thời điểm mô sẹo tái sinh chồi.

Khảo sát, đánh giá sự phát sinh biến dị bằng kỹ thuật RAPD-PCR: Các mô sẹo sau khi tái sinh chồi và mẫu lá cây đối chứng được ly trích DNA theo quy trình CTAB [6]. Đánh giá sự khác biệt di truyền bằng kỹ thuật RAPD-PCR với tổng 15 môi (bảng 1), phản ứng được lặp lại 2 lần/mẫu. Thành phần của một phản ứng gồm: 8,96 μ l BiH_2O , 3 μ l Buffer (5X), 1,2 μ l môi (10 pmol), 0,15 μ l *Taq* DNA Polymerase (5 unit/ μ l), 2 μ l DNA khuôn (30 μ g/ μ l) và chu kỳ nhiệt 94°C: 5 phút; lặp lại 45 chu kỳ: 94°C/20 giây, 35°C/15 giây, 72°C/80 giây và kết thúc bằng 72°C/10 phút. Điện di sản phẩm RAPD-PCR trên gel agarose 2% có bổ sung safeview ở hiệu điện thế 50 V trong 1 giờ với thang chuẩn 100 bp của Fermentas. Sử dụng phần mềm GelAnalyzer v2019 [7] để đọc và ghi nhận kích thước các băng DNA để so sánh với sự khác biệt về hình thái. Hình ảnh các băng DNA được mã hóa bằng hệ nhị phân và được phân tích bằng phần mềm NTSYS 2.1 theo phương pháp UPGMA. Chỉ số PIC được tính theo công thức sau:

$$\text{PICi} = 2f_i \times (1-f_i)$$

trong đó i là thứ tự locus được tính; f_i là tần số alen xuất hiện; $(1-f_i)$ là tần số alen không xuất hiện [8].

Đánh giá sự khác biệt về hình thái bằng phương pháp giải phẫu: Dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 có sự khác biệt di truyền lớn nhất so với mẫu đối chứng thông qua chỉ thị RAPD sẽ được thực hiện giải phẫu để so sánh sự khác biệt về hình thái mô. Vi phẫu lát cắt mỏng (bằng tay) được nhuộm kép bằng carmin aluné - vert d'iod theo thiết diện ngang của cuống lá có độ tuổi bằng nhau và cùng vị trí (lá thứ 2 từ phần đỉnh chồi). Vi mẫu được chụp dưới kính hiển vi quang học có camera (Olympus CX23). Đo mẫu bằng trắc vi vật kính (E4, E10) và trắc vi thị kính (E15). Thí nghiệm một nhân tố được lặp lại 3 lần, mỗi lần một cuống lá, mỗi cuống lấy 3 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi là đường kính cuống lá, số lượng oxalat canxi, chiều dày mô bì, diện tích bó mạch, số lượng bó gỗ.

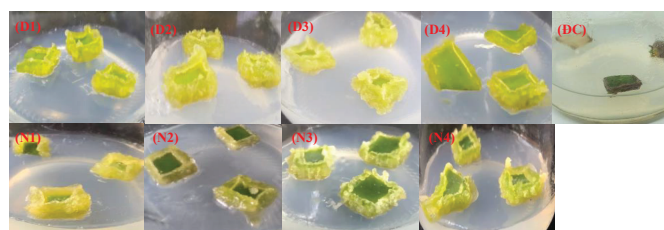
Điều kiện nuôi cấy: Các mẫu được nuôi ở nhiệt độ 24°C, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

Phương pháp xử lý số liệu và điều kiện: Các số liệu sau khi thu thập được xử lý bằng phần mềm Excel 2013 và phân tích bằng phần mềm Minitab 16, GelAnalyzer v2019 [7], NTSYS 2.1 và ToupView [8].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D, NAA lên khả năng cảm ứng mô sẹo và phát sinh biến dị

Sau 15 ngày nuôi cấy, các NT trên môi trường có bổ sung NAA và 2,4-D ở cả 4 nồng độ 4, 5, 6 và 7 mg/l đều có khả năng cảm ứng tạo mô sẹo tốt trong nuôi cấy *in vitro* lan Cẩm Cù, với tỷ lệ 100%, riêng NT đối chứng không ghi nhận sự hình thành mô sẹo tại vết cắt. Trên môi trường chứa 2,4-D, mô sẹo có màu sắc xanh hơn mô sẹo trên môi trường chứa NAA, riêng ở NT chứa 4 mg/l NAA, mô sẹo có màu sắc tương đồng với các NT xử lý 2,4-D (hình 2). Tuy nhiên, sự khác nhau về màu sắc của mô sẹo ở các NT không ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo mô sẹo. Biến dị phát sinh được theo dõi và đánh giá sau khi tái sinh thành cây hoàn chỉnh và phân tích kiểu gen.



Hình 2. Sự phát sinh mô sẹo lan Cẩm Cù sau 15 ngày nuôi cấy *in vitro*. (D1) 4 mg/l 2,4-D; (D2) 5 mg/l 2,4-D; (D3) 6 mg/l 2,4-D; (D4) 7 mg/l 2,4-D; (N1) 4 mg/l NAA; (N2) 5 mg/l NAA; (N3) 6 mg/l NAA; (N4) 7 mg/l NAA; (ĐC) Đối chứng.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D, NAA khi cảm ứng tạo mô sẹo lên khả năng nhân nhanh mô sẹo

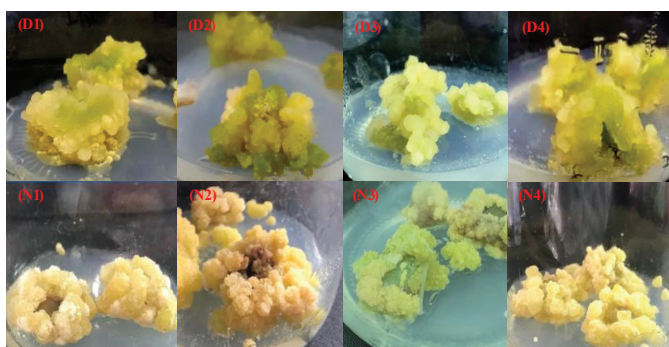
Mô sẹo sau 15 ngày nuôi cấy được chuyển sang môi trường MS + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA + 1,5 mg/l BAP. Kết quả ghi nhận kích thước của các mô sẹo ở thời điểm 45 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 2. Nhìn chung, ở thời điểm 45 ngày, tất cả các NT gây cảm ứng mô sẹo đều cho kích thước sẹo tăng so với thời điểm 15 ngày nuôi cấy. Xét về nhân tố nồng độ gây cảm ứng mô sẹo, kích thước mô sẹo tăng từ nồng độ 4 đến 5 mg/l và bắt đầu giảm dần từ nồng độ 5 đến 7 mg/l. Đối với nhân tố là chất cảm ứng đột biến, 2,4-D cho kích thước mô sẹo lớn hơn NAA. NT 5 và 6 mg/l 2,4-D có kích thước sẹo trung bình cao nhất lần lượt là 2,980 và 2,770 cm, NT bổ sung 4 mg/l NAA ghi nhận kích thước mô sẹo thấp nhất là 1,435 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các NT còn lại.

Bảng 2. Kích thước mô sẹo (cm) lan Cẩm Cù cảm ứng bởi NAA và 2,4-D sau 45 ngày nuôi cấy.

Nồng độ (mg/l)	Auxin		Trung bình
	NAA	2,4-D	
4	1,435 ^a	2,285 ^b	1,860 ^D
5	2,255 ^{bc}	2,980 ^a	2,618 ^A
6	1,880 ^d	2,770 ^a	2,325 ^B
7	1,925 ^{cd}	2,245 ^{bc}	2,085 ^C
Trung bình	1,874 ^B	2,570 ^A	
P (nồng độ)	0,00		
P (chất cảm ứng đột biến)	0,00		
P (tương tác)	0,00		
CV (%)	10,6		

Số liệu này đã được mã hoá $(x+y)/2$ khi phân tích thống kê, với x là chiều dài mô sẹo, y là chiều rộng mô sẹo. Trên cùng một cột hay một hàng, các số trung bình của từng nhân tố đi theo cùng ký tự viết hoa là khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. Các số trung bình của từng NT (kết hợp chất điều hòa sinh trưởng và nồng độ) có cùng ký tự viết thường theo hàng hoặc cột là khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Quan sát màu sắc mô sẹo 45 ngày tuổi cho thấy, mô sẹo ở các NT xử lý 2,4-D có màu vàng nhạt hơn so với các NT xử lý NAA có màu vàng đậm hơn và tất cả mô sẹo không có hiện tượng hóa nâu (hình 3).



Hình 3. Mô sẹo trên các mẫu thời điểm 45 ngày nuôi cấy. (D1) 4 mg/l 2,4-D; (D2) 5 mg/l 2,4-D; (D3) 6 mg/l 2,4-D; (D4) 7 mg/l 2,4-D; (N1) 4 mg/l NAA; (N2) 5 mg/l NAA; (N3) 6 mg/l NAA; (N4) 7 mg/l NAA.

3.3. Khả năng tái sinh chồi của các mô sẹo xử lý 2,4-D, NAA sau khi nhân nhanh

Mô sẹo 45 ngày được tái sinh chồi trên môi trường MS + 1 mg/l IBA + 3,5 mg/l BAP, tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi được thể hiện ở bảng 3. Nhìn chung, ở thời điểm 95 và 225 ngày tuổi các mô sẹo bị cảm ứng bởi chất xử lý lần lượt là NAA và 2,4-D, nồng độ xử lý tăng thì tỷ lệ tái sinh chồi càng tăng, nhưng nồng độ quá cao lại ức chế sự tái sinh chồi của mô sẹo. Cụ thể, ở thời điểm 95 ngày đối với mô sẹo xử lý bằng NAA, tỷ lệ tái sinh chồi khi tăng nồng độ xử lý từ 4 lên 5 mg/l. Kết quả này tương tự đối với mô sẹo xử lý 2,4-D ở thời điểm 225 ngày (bảng 3). Với chất cảm ứng là NAA, mô sẹo có thời gian tái sinh nhanh hơn so với mô sẹo xử lý 2,4-D khi ở cùng một nồng độ.

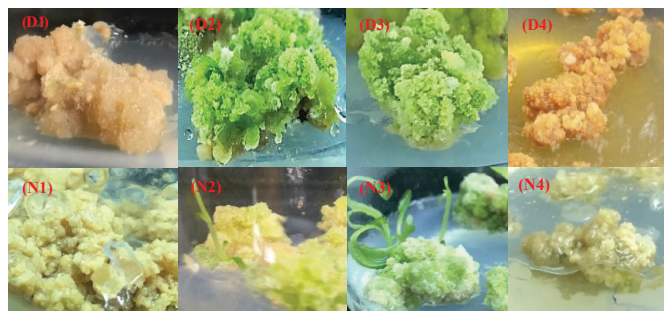
Bảng 3. Khả năng tái sinh chồi lan Cẩm Cù thời điểm 95 và 225 ngày nuôi cấy.

NT	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ mô tái sinh chồi (%)	
			95 ngày nuôi cấy	225 ngày nuôi cấy
1	2,4-D	4	0 ^c	0 ^c
2		5	0 ^c	50,00 ^a
3		6	0 ^c	33,33 ^b
4		7	0 ^c	0 ^c
5	NAA	4	0 ^c	0 ^c
6		5	66,67 ^a	-
7		6	30,00 ^b	-
8		7	0 ^c	0 ^c
p-value			0,00	0,00
CV (%)			16,90	16,97

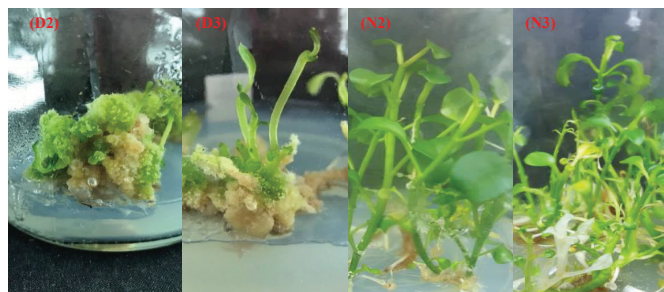
Trên cùng một cột, các số trung bình có cùng ký tự là không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Ở thời điểm 95 ngày, mô sẹo ở NT6 và NT7 (5 và 6 mg/l NAA) bắt đầu phát triển thành chồi, tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất đạt 66,67% ở NT6 và 30,0% ở NT7, kết quả này khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các NT còn lại (0%). Đến thời điểm 225 ngày tuổi, NT2 và NT3 xử lý 2,4-D ở nồng độ 5 và 6 mg/l ghi nhận sự hình thành chồi từ mô sẹo với tỷ lệ tái sinh cao nhất ghi nhận ở NT2 là 50,0%, tiếp theo là 33,33% ở NT3 và ghi nhận không có khả năng tái sinh của các mô sẹo ở các NT còn lại.

Về màu sắc mô sẹo và chồi ở thời điểm 95 ngày nuôi cấy, NT6 (5 mg/l NAA) và NT7 (6 mg/l NAA) mô sẹo có màu xanh và xuất hiện chồi. NT5 và NT8 (4 và 7 mg/l NAA) mô sẹo dần chuyển sang màu vàng, không xuất hiện chồi. Đối với mô sẹo xử lý 2,4-D, NT2 và NT3 (5 và 6 mg/l 2,4-D) mô sẹo có màu xanh, chưa xuất hiện chồi. Mô sẹo NT1 và NT4 (4 và 7 mg/l 2,4-D) dần chuyển sang màu vàng sậm tương tự NT5 và NT8 và chưa xuất hiện chồi (hình 4). Ở thời điểm 225 ngày nuôi cấy, mô sẹo ở NT2 và NT3 có màu xanh, nhưng một phần bị chuyển sang màu vàng sậm, các chồi nhỏ bắt đầu xuất hiện tại các phần sẹo có màu xanh (hình 5). Mô sẹo ở các NT còn lại có màu vàng sậm, không còn khả năng sống sót.



Hình 4. Các mẫu mô sẹo thời điểm 95 ngày nuôi cấy. (D1) 4 mg/l 2,4-D; (D2) 5 mg/l 2,4-D; (D3) 6 mg/l 2,4-D; (D4) 7 mg/l 2,4-D; (N1) 4 mg/l NAA; (N2) 5 mg/l NAA; (N3) 6 mg/l NAA; (N4) 7 mg/l NAA.



Hình 5. Các mẫu chồi thời điểm 225 ngày nuôi cấy. (D2) 5 mg/l 2,4-D; (D3) 6 mg/l 2,4-D; (N2) 5 mg/l NAA; (N3) 6 mg/l NAA.

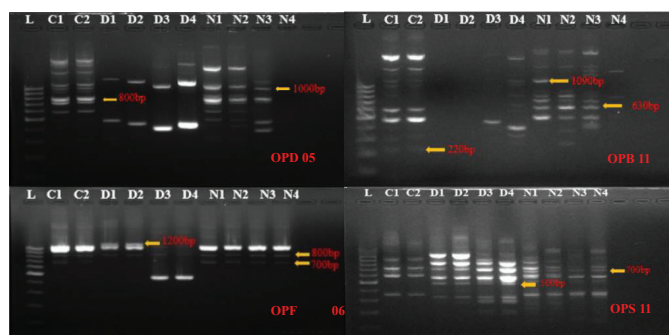
3.4. Đánh giá sự phát sinh biến dị dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 bằng chỉ thị RAPD

Từ kết quả xử lý 2,4-D và NAA ở các nồng độ khác nhau ghi nhận được 4 NT có chồi tái sinh [NT2 và NT3 (5 và 6 mg/l 2,4-D); NT6 và NT7 (5 và 6 mg/l NAA)]. DNA từ mẫu chồi tái sinh ở 4 NT và mẫu đối chứng được đánh giá sự phát sinh biến dị bằng kỹ thuật RAPD-PCR. Kết quả PCR trên mẫu đối chứng đều cho kiểu băng giống nhau và ổn định sau 2 lần lặp lại. Kết quả khảo sát với 15 môi có 13 môi khuếch đại cho băng DNA (mỗi OPR 07, OPJ 13 không khuếch đại băng DNA ở tất cả các mẫu) (bảng 4 và hình 6). Tổng số băng DNA (đa hình và đơn hình) ghi nhận ở 5 mẫu là 330, kích thước phân tử dao động từ 170 đến 2700 bp. Trong tổng số 330 băng, ghi nhận 326 băng đa hình và 4 băng đơn hình được khuếch đại ở mỗi OPF - 05 (2 băng), OPT - 05 (1 băng), OPC - 05 (1 băng). Từ các băng DNA đa hình cho thấy sự khác biệt về mặt di truyền giữa các mẫu chồi ở 4 NT xử lý đột biến và mẫu đối chứng.

Trong 13 môi có khả năng khuếch đại trên 5 mẫu, mỗi OPS - 11 ghi nhận số băng DNA cao nhất là 41 băng, mỗi OPF - 4 ghi nhận số băng thấp nhất là 8 băng, trung bình 25,4 băng/môi. Giá trị thông tin đa hình PIC trong phạm vi từ 0,23 đến 0,40, giá trị PIC cao nhất ở mỗi OPS - 11 và OPF - 02, đạt thấp nhất ở mỗi OPG - 04 và trung bình là 0,34. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu đã công bố khi tỷ lệ đa hình các sản phẩm DNA khuếch đại bởi 4 chỉ thị RAPD từ genomic DNA của các mô sẹo cây cọ (*Phoenix dactylifera* L.) cảm ứng bởi 2,4-D 50 mg/l, 2,4-D 100 mg/l, Dicamba 10 mg/l và NAA 30 mg/l là từ 0,476 đến 0,571 [9].

Bảng 4. Kết quả khuếch đại của 15 đoạn môi.

Số thứ tự	Môi	Số băng mỗi NT					Kích thước phân tử (bp)	Chỉ số PIC
		ĐC	NT1	NT2	NT3	NT4		
1	OPF - 01	6	7	8	4	4	300-1370	0,37
2	OPF - 04	8	0	0	0	0	400-1600	0,32
3	OPF - 03	7	7	0	0	0	250-1340	0,36
4	OPF - 02	3	6	0	0	0	250-1000	0,40
5	OPF - 05	7	9	7	8	6	170-1450	0,31
6	OPD - 05	10	3	3	10	6	300-1500	0,36
7	OPA - 14	8	0	1	0	0	260-1300	0,32
8	OPS - 11	7	9	12	7	6	200-1350	0,40
9	OPG - 04	0	1	0	5	3	430-1010	0,23
10	OPG - 07	-	-	-	-	-	-	-
11	OPB - 11	9	0	11	10	8	220-2700	0,35
12	OPK - 14	15	5	8	10	0	340-1990	0,34
13	OPJ - 13	-	-	-	-	-	-	-
14	OPT - 05	9	8	7	8	7	210-2100	0,36
15	OPC - 05	4	4	5	5	9	430-2000	0,32



Hình 6. Hình ảnh điện di môi OPD - 05, OPB - 11, OPF - 06, OPS - 11. L: thang chuẩn (DNA Ladder 1000 bp); C1 và C2: đối chứng; D1 và D2: 5 mg/l 2,4-D; D3 và D4: 6 mg/l 2,4-D; N1 và N2: 5 mg/l NAA; N3 và N4: 6 mg/l NAA.

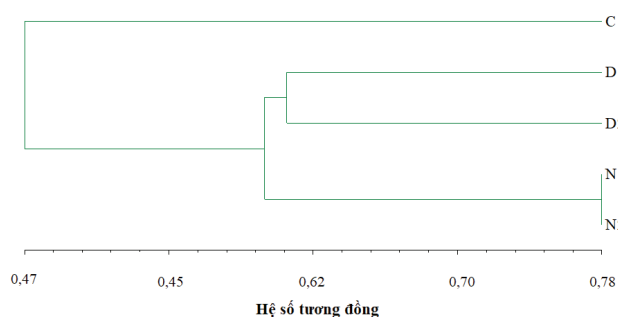
Kỹ thuật RAPD được sử dụng đánh giá sự sai khác ở mức độ phân tử của các thể đột biến được tạo ra từ giống cũ ban đầu, qua phân tích PCR chứng tỏ hiệu quả của phương pháp này có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử DNA để phân biệt giống gốc và các thể biến dị [4]. Kết quả phân tích 10 mẫu hoa hồng triển vọng bằng chỉ thị RAPD của N.M. Thom (2009) [10] cho thấy mức độ

đa hình hay hệ số tương đồng dao động từ 0,52 đến 0,81, chỉ thị RAPD cũng được sử dụng trong xác định độ đa hình và tần số đột biến trên cây ngô [11]. Qua đó cho thấy, kỹ thuật này rất hiệu quả trong phân tích các biến dị di truyền có thể xảy ra trên thực vật sau xử lý đột biến *in vitro* bằng các tác nhân đột biến [4, 9-11]. Với kết quả trong nghiên cứu này, một lần nữa khẳng định chỉ thị RAPD có thể được sử dụng trong việc phát hiện các biến đổi trên thực vật nói chung và trên loài lan Cẩm Cù nói riêng về kiểu hình và kiểu gen.

Từ kết quả bảng 5 và hình 7 cho thấy, các chồi tái sinh từ các NT xử lý 2,4-D 5 mg/l, 2,4-D 6 mg/l, NAA 5 mg/l và NAA 6 mg/l có hệ số tương đồng di truyền khi phân tích bằng 13 chỉ thị RAPD giao động từ 0,455 đến 0,775. Ở mức tương đồng là 0,60, sơ đồ phả hệ có thể chia thành 3 nhóm: nhóm 1 (mẫu đối chứng), nhóm 2 (mẫu xử lý 2,4-D ở nồng độ 5 và 6 mg/l), nhóm 3 (mẫu xử lý NAA ở nồng độ 5 và 6 mg/l). Nhìn chung, các mẫu xử lý cùng tác nhân auxin có hệ số tương đồng cao hơn so với các mẫu còn lại. Đối với NT 5 mg/l NAA, ghi nhận tỷ lệ hệ số tương đồng thấp nhất khi so với mẫu đối chứng là 0,455 (bảng 5). Sự khác biệt này có thể do nhiều điểm đột biến ở vùng không mang gen, gần tâm động hay các đầu mút nhiễm sắc thể. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu về hệ số tương đồng của các mô sẹo cây cọ (*Phoenix dactylifera* L.) cảm ứng bởi 2,4-D 50 và 100 mg/l, Dicamba 10 mg/l, NAA 30 mg/l là từ 0,290 đến 0,900 khi phân tích bằng 4 chỉ thị RAPD [9].

Bảng 5. Hệ số tương quan di truyền của 5 dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 .

	C	D1	D2	N1	N2
C	1,000				
D1	0,474	1,000			
D2	0,469	0,610	1,000		
N1	0,455	0,568	0,582	1,000	
N2	0,493	0,643	0,600	0,775	1,000



Hình 7. Sơ đồ hình cây phả hệ của lan Cẩm Cù xử lý 2,4-D và NAA so với mẫu đối chứng. (C) Đối chứng; (D1) 5 mg/l 2,4-D; (D2) 6 mg/l 2,4-D; (N1) 5 mg/l NAA; (N2) 6 mg/l NAA.

3.5. Đánh giá sự khác biệt của dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 về hình thái bằng phương pháp giải phẫu

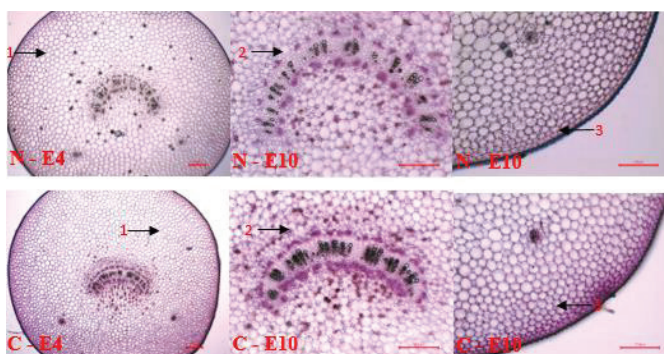
Khảo sát hình thái giải phẫu cuống lá cho thấy có sự khác biệt đường kính cuống lá, số lượng oxalat canxi, chiều dày mô bì, diện tích bó mạch, số lượng bó gỗ có sự khác biệt giữa mẫu xử lý đột biến NAA nồng độ 5 mg/l so với mẫu đối chứng (bảng 6). Mẫu xử

lý đột biến NAA nồng độ 5 mg/l cho các chỉ tiêu lớn hơn so với mẫu đối chứng, khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê. Riêng số lượng tinh thể oxalat canxi ghi nhận ở mẫu đối chứng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Sự khác biệt về mặt di truyền thông qua chỉ thị phân tử RAPD và hình thái mô thông qua phương pháp giải phẫu của mẫu NAA nồng độ 5 mg/l so với mẫu đối chứng, chứng tỏ NAA ở nồng độ này hữu hiệu trong chọn và tạo giống lan Cẩm Cù.

Bảng 6. Các chỉ tiêu hình thái giải phẫu cuống lá của các dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 .

NT	Trung bình				
	Đường kính (μm)	Oxalat canxi	Mô bì (μm)	Diện tích bó mạch (μm^2)	Số bó gỗ
C	2299 ^a	57,3 ^a	38,4 ^b	100225 ^a	19,9 ^b
N1	3118 ^a	42,6 ^b	48,2 ^a	261492 ^b	23 ^a
p-value	0,00				
CV (%)	16,6	16,25	12,5	4,95	1,26

C: đối chứng; N1: 5 mg/l NAA. Trên cùng một cột, các số trung bình có cùng ký tự là không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.



Hình 8. Hình thái giải phẫu cuống lá của các dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 . (C-E4) Đối chứng vật kính X:4; (C-E10) Đối chứng vật kính X:10; (N-E4) Mẫu xử lý 5 mg/l NAA vật kính X:4; (N-E10) Mẫu xử lý 5 mg/l NAA vật kính X:10; 1: hạt oxalat canxi; 2: bó mạch; 3: mô che chở.

Kết luận

Khảo sát ảnh hưởng của auxin đến khả năng tái sinh chồi trên lan Cẩm Cù ghi nhận tỷ lệ cảm ứng tạo sẹo đạt 100% và kích thước mô sẹo lớn nhất sau khi nhân nhanh là 2,98 cm ở NT bổ sung 5 mg/l 2,4-D. Tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất ở NT 5 mg/l NAA ở thời điểm 95 ngày nuôi cấy và NT 5 mg/l 2,4-D ở thời điểm 225 ngày nuôi cấy. Đồng thời, ở NT 5 mg/l NAA cho kết quả khác biệt lớn nhất với tỷ lệ hệ số tương đồng thấp nhất so với mẫu đối chứng là

0,455. Đường kính cuống lá, chiều dày mô bì, diện tích bó mạch, số lượng bó gỗ ở NT 5 mg/l NAA vượt trội so với NT đối chứng. Riêng số lượng tinh thể oxalat canxi thấp hơn.

Kiến nghị tiếp tục theo dõi các kiểu hình và kiểu gen về hoa và lá trên các mẫu xử lý auxin ở các thể hệ T1, T2, T3... trong điều kiện vườn ươm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G.L.B. Gomes, K.C. Scortecci (2021), "Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms", *Plant Biology*, **23**(6), pp.894-904, DOI: 10.1111/plb.13303.
- [2] A.C. de Castro Marcato, C.P. de Souza, C.S. Fontanetti (2017), "Herbicide 2,4-D: A review of toxicity on non-target organisms", *Water Air Soil Pollut.*, **228**, DOI 10.1007/s11270-017-3301-0.
- [3] N.M. Chon (2004), *Textbook of Plant Growth Regulators*, Can Tho University Publishing House, 21-22pp (in Vietnamese).
- [4] S. Kumar, K.V. Prasad, M.L. Choudhary (2006), "Detection of genetic variability among *Chrysanthemum radimutants* using RAPD markers", *Curr. Sci.*, **90**(8), pp.1108-1113, DOI: 10.13128/ahs-12775.
- [5] S.R. Lakshmi, J.H.F. Benjamin, T.S. Kumar, et al. (2013), "Organogenesis from *in vitro* - derived leaf and internode explants of *Hoya wightii* ssp. *palniensis* - A vulnerable species of Western Ghats", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56**(3), pp.421-430, DOI: 10.1590/S1516-89132013000300010.
- [6] S.O. Rogers, A.J. Bendich (1988), "Extraction of DNA from plant tissues", *Plant Molecular Biology Manual*, **6**(1), pp.1-10, DOI: 10.12345/67890.
- [7] N.E. Ahmed (2021), "EgyGene GelAnalyzer4: A powerful image analysis software for one-dimensional gel electrophoresis", *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **19**(18), DOI: 10.1186/s43141-020-00114-x.
- [8] E.J. Rohlf (2000), *NTSYSpc - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (version 2.1)*, Exeter Software.
- [9] A. Modi, B. Gajera, N. Subhash, et al. (2017), "Evaluation of clonal fidelity of micropropagated date palm by Random amplified polymorphic DNA (RAPD)", *Methods in Molecular Biology*, **1638**(2), pp.81-89, DOI: 10.1007/978-1-4939-7159-6_8.
- [10] N.M. Thom (2009), *Research on Selecting and Breeding Rose Plants (*Rosa* spp. L.) with High Productivity and Quality for Some Northern Provinces of Vietnam*, Doctoral Thesis in Agriculture, Study Vietnam Institute of Agriculture (in Vietnamese).
- [11] T.T.Thuy, D.T.N. Nga, N.T. Loan, et al. (2020), "Building molecular markers RAPD and ISJ to determine polymorphism and mutation frequency in maize", *Journal Vietnam Agricultural Science and Technology*, **1**(110), pp.46-50 (in Vietnamese).

Ảnh hưởng của xử lý enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả thanh long ruột đỏ trồng ở Vĩnh Phúc

Nguyễn Thị Hạnh*, Vũ Thu Trang, Nguyễn Văn Hưng

Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bách Khoa, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 24/5/2022; ngày chuyển phản biện 27/5/2022; ngày nhận phản biện 15/6/2022; ngày chấp nhận đăng 20/6/2022

Tóm tắt:

Thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) là cây trồng phổ biến và mang lại lợi ích to lớn của tỉnh Vĩnh Phúc trong những năm gần đây. Ngoài phục vụ nhu cầu ăn tươi, quả thanh long còn được chế biến để tạo ra các sản phẩm đa dạng trên thị trường. Mục đích của nghiên cứu là xác định một số thông số công nghệ cơ bản nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi dịch quả thanh long để chế biến các sản phẩm tiếp theo. Trong quả thanh long, pectin (một chất keo tự nhiên để giữ thành tế bào cũng như các tế bào lại với nhau) có hàm lượng khá lớn, làm thịt quả có độ nhớt cao, ảnh hưởng đến quá trình trích ly dịch quả. Nghiên cứu đã sử dụng enzyme pectinase để thủy phân pectin nhằm giảm độ nhớt, nâng cao hiệu suất thu hồi dịch quả. Kết quả cho thấy, khi xử lý dịch quả thanh long bằng chế phẩm enzyme Pectinex Ultra SP-L với nồng độ 0,6 g/kg dịch quả, thời gian 80 phút cho hiệu suất thu hồi dịch đạt 77,56%.

Từ khóa: enzyme pectinase, hiệu suất thu hồi, Lập Thạch, pectin, thanh long ruột đỏ.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Thanh long là cây trồng bản địa có nguồn gốc từ Mexico và Nam Mỹ. Thanh long ruột đỏ tiềm năng đã trở thành cây trồng mũi nhọn ở nhiều vùng lãnh thổ vì giá trị dinh dưỡng cũng như giá trị kinh tế to lớn mà nó mang lại [1]. Thanh long ruột đỏ còn được chú ý bởi các hợp chất chống oxy hóa, hợp chất kháng sinh và những hợp chất tiềm năng chống lại các bệnh trên cơ thể người. Một số nghiên cứu còn cho thấy khả năng hạn chế phân tán tế bào u ác tính và chống ung thư của nhiều hợp chất tồn tại trong thanh long ruột đỏ [2].

Pectin là thành phần có nhiều trong thanh long ruột đỏ, gây khó khăn cho quá trình chế biến nước quả, cụ thể là trong quá trình ép và lọc, dẫn đến hiệu suất trích ly dịch quả thấp, dịch quả nhớt và đục nhiều. Lý do là pectin có tính chất tạo gel, khi quả có nhiều pectin thì khối thịt quả nghiền sẽ có trạng thái keo, dẫn đến hiệu suất thu hồi dịch quả không cao. Vì vậy, trong quá trình chế biến nước quả người ta thường tìm cách thủy phân pectin trước, sau đó lọc rồi cô đặc [3].

Nghiên cứu này nhằm xác định thành phần dinh dưỡng của thanh long ruột đỏ trồng tại Lập Thạch, tỉnh Vĩnh Phúc và các điều kiện công nghệ xử lý enzyme pectinase bổ sung trong quá trình thu nhận dịch quả đến hiệu suất thu hồi dịch quả, từ đó nâng cao giá trị kinh tế và cảm quan cho các sản phẩm chế biến từ thanh long ruột đỏ trồng tại địa phương này nói riêng, ở Việt Nam nói chung.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Thanh long ruột đỏ được thu hái từ huyện Lập Thạch, tỉnh Vĩnh Phúc vào tháng 3-4 (vụ hè) và tháng 9-10 (vụ đông) năm 2018.

*Tác giả liên hệ: Email: hanh.nguyenthi@hust.edu.vn

Quả được vận chuyển về phòng thí nghiệm ngay sau khi thu hái, bảo quản ở 4°C không quá 3 ngày cho các thí nghiệm tiếp theo [4]; dịch quả được chuẩn bị dựa trên quy trình của K.M. Herbach và cs (2007) [5] như sau: Chọn những quả thanh long chín đều, không hư hỏng, dập nát, rửa sạch, để ráo. Tiến hành bóc vỏ, lấy phần thịt quả. Chà thịt quả bằng máy chà để loại hạt và thu dịch quả.

Enzyme pectinase: Sử dụng enzyme thương mại Pectinex Ultra SP-L có nguồn gốc từ nấm mốc *Aspergillus niger* do Hãng Novo (Thụy Sĩ) cung cấp. Chế phẩm dạng bột được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Thành phần chính của chế phẩm enzyme là polygalacturonase, pectinesterase và pectin transeliminase với độ hoạt động là 26.000 PG/ml (hoạt động của polygalacturonase trên ml). Hiệu quả chế phẩm enzyme đạt được là do hoạt động của polygalacturonase trong việc tách chuỗi pectin và hoạt động của pectinesterase trong quá trình thủy phân các nhóm methyl este của phân tử pectin. Điều kiện phản ứng tối ưu của enzyme là pH 3,5-6,0 và nhiệt độ dưới 50°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát một số chỉ tiêu lý hóa của nguyên liệu: Quả thanh long sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm được xác định một số chỉ tiêu vật lý như: khối lượng, kích thước, màu sắc vỏ quả đồng thời xác định tỷ lệ vỏ quả, thịt quả, dịch quả so với tổng khối lượng quả. Dịch quả sau khi ép được xác định một số chỉ tiêu vật lý như: độ ẩm, chất khô hòa tan tổng số, đường tổng số, đường khử, protein, vitamin C, betacyanin, độ pH và độ nhớt.

Khảo sát ảnh hưởng của xử lý enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả:

Ảnh hưởng của nồng độ enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả: Dịch quả được điều chỉnh về 13°Bx bằng dung dịch siro đường saccharose 65°Bx và điều chỉnh pH về 4,5 bằng axit

Effects of enzyme pectinase treatment on obtaining optimum red dragon juice production yield from Vinh Phuc province

Thi Hanh Nguyen*, Thu Trang Vu, Van Hung Nguyen

School of Biotechnology and Food Technology,
Hanoi University of Science and Technology,
Dai Co Viet, Bach Khoa Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Received 24 May 2022; revised 15 June 2022; accepted 20 June 2022

Abstract:

Red dragon (*Hylocereus polyrhizus*) has been one of the main cash crops of Vinh Phuc province in recent years. In addition to its consumption as a fresh fruit, dragon can be processed into a variety of commercial products. This research aims to determine basic parameters to obtain the optimum dragon juice production yield for further processing procedures. Pectin ("natural glue" acts as a binding agent for the structure of cell walls as well as most plant cells) in dragon, has a great effect on juice extraction due to its capacity to increase flesh viscosity. The method applied in this study is using enzyme pectinase to reduce viscosity and increase the juice production yield. The results showed that the treatment of red dragon with enzyme Pectinex Ultra SP-L with a concentration of 0.6 g/kg in 80 minutes and a production yield of 77.56%.

Keywords: enzyme pectinase, Lap Thach, pectin, production yield, red dragon.

Classification number: 4.6

malic thực phẩm, tiến hành bổ sung enzyme pectinase với các nồng độ: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 và 1,0 g/kg dịch quả trong thời gian 60 phút ở nhiệt độ môi trường (28-32°C). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Theo dõi các chỉ tiêu: độ nhớt, hàm lượng chất khô hòa tan tổng số, pH và hiệu suất thu hồi của dịch quả.

Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả: Dịch quả được điều chỉnh về 13°Bx và lượng enzyme bổ sung theo kết quả của thí nghiệm trên. Khảo sát ở 2 giá trị pH là 4,5 và 5. Theo dõi các chỉ tiêu tiêu độ nhớt, hàm lượng chất khô hòa tan, pH và hiệu suất thu hồi dịch quả trong thời gian: 0, 20, 40, 60, 80, 100 phút. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp phân tích: Hiệu suất thu hồi dịch quả được tính theo công thức sau:

$$\text{Hiệu suất thu hồi (\%)} = \frac{m}{m_0} \times 100$$

trong đó m: khối lượng dịch quả thu được (g); m_0 : khối lượng dịch quả ban đầu (g).

Độ nhớt của dịch quả được đo bằng máy đo độ nhớt Brookfield DV2T.

pH của dịch được đo bằng máy đo pH FP20 - Standard kit (Mettler Toledo).

Xác định hàm lượng chất khô hòa tan tổng số (°Bx) bằng khúc xạ kế Atago Model PAL-α (Code 3840).

Hàm lượng chất khô tổng số được xác định theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi, protein xác định theo phương pháp Kjeldahl, đường tổng số xác định bằng phương pháp thủy phân bằng axit, đường khử xác định bằng phương pháp Graxianop; hàm lượng vitamin C xác định bằng chất chỉ thị 2,6-diclophenolindophenol [6].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát một số chỉ tiêu của nguyên liệu

Tiến hành đánh giá một số chỉ tiêu hoá lý và hoá học của nguyên liệu. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 1 và 2.

Bảng 1. Một số chỉ tiêu hoá lý của quả thanh long ruột đỏ.

Chỉ tiêu		Giá trị
Khối lượng trung bình quả (g)		382,22±0,18
Kích thước (cm)	L (length)	12,88±0,1
	D (diameter)	9,05±0,13
Độ nhớt (cP)	152,6±4,24	151,3±1,09
pH	4,80±0,12	4,72±0,02
Màu sắc vỏ quả	L (lightness)	16,65±0,83
	a (green-red)	23,89±0,23
	b (blue-yellow)	4,61±0,17
Thành phần quả (tính trên đơn vị 1 kg nguyên liệu):		
Vỏ quả (%)		34,48±0,01
Thịt quả (chứa hạt) (%)		65,52±0,01
Dịch quả (% tính theo thịt quả)		96,88±0,01

Bảng 2. Thành phần hóa học của quả thanh long ruột đỏ tính theo 100 g thịt quả tươi.

Chỉ tiêu	Hàm lượng mùa hè	Hàm lượng mùa đông
Độ ẩm (%)	87,33±0,04	85,05±1,14
Đường tổng số (g)	9,95±0,05	9,60±0,01
Đường khử (g)	8,42±0,56	8,12±0,01
Protein (g)	1,64±0,01	1,12±0,01
Vitamin C (mg)	8,40±0,20	8,10±0,10
Chất khô hòa tan (Bx)	13,20±0,20	12,60±0,40
Betacyanin (mg)	36,81±1,86	32,70±0,19

Nhìn chung theo mùa, độ ẩm của thanh long ruột đỏ Vĩnh Phúc thay đổi không đáng kể. Hàm lượng đường tổng, đường khử cũng không có sự khác biệt rõ rệt, điều này cho thấy chất lượng của quả thanh long ruột đỏ Vĩnh Phúc tương đối ổn định theo các mùa trong năm.

Thanh long ruột đỏ Vĩnh Phúc có hàm lượng vitamin C khá cao (8,4 mg/100 g thịt quả nhưng nhìn chung vẫn thấp hơn thanh long ruột trắng (9,85 mg/100 g) và thấp hơn so với những loại quả khác: táo (25,75-77,00 mg/100g), cam (8,87-67,36 mg/100 g) [7].

Hàm lượng betacyanin trong quả thanh long ruột đỏ Vĩnh Phúc cao nhất vào mùa hè (36,81 mg/100 g thịt quả tươi). Betacyanin

đang ngày càng được chú ý bởi hoạt tính sinh học và có thể sử dụng như một phụ gia tạo màu đỏ đến đỏ tím trong thực phẩm. Trong y học nó được sử dụng như một chất có khả năng chống oxy hóa nên được sử dụng để chống lão hóa, hạn chế sự suy giảm sức đề kháng, có tác dụng làm bền thành mạch, chống viêm, hạn chế sự phát triển của các tế bào ung thư, tác dụng chống các tia phóng xạ [8]. Kết quả về hàm lượng betacyanin trong thanh long ruột đỏ cũng tương đồng với nghiên cứu của V.T. Trang và cs (2020) [9]. Nhóm tác giả này cũng đã nghiên cứu đến sự ổn định chất màu betacyanin trong nước ép thịt quả, hướng tới ứng dụng chế biến các sản phẩm từ thanh long ruột đỏ Vĩnh Phúc.

Các chỉ tiêu khác cũng tương tự với nghiên cứu của D.V. Tan và cs (2014) [10] trên thanh long ruột đỏ Vĩnh Phúc: quả thông thường trung bình nặng $333,3 \pm 20,7$ g, đường kính $7,2 \pm 0,5$ cm, chiều cao $10,3 \pm 0,7$ cm; hàm lượng nước chiếm $84,5 \pm 0,3\%$; hàm lượng đường khử là $86,2 \pm 7,6$ mg/g; pH trung bình là $4,28 \pm 0,6$; hàm lượng betacyanin trong ruột quả chiếm $35,95 \pm 3,49$ mg/100 g khối lượng tịnh. Ngoài ra, thanh long ruột đỏ còn chứa lượng lớn các nguyên tố khoáng Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} và đặc biệt là K^+ . Trong khi đó, thanh long ruột trắng có cân nặng trung bình $466,0 \pm 59,9$ g, dài $12,2 \pm 0,7$ cm, đường kính $7,4 \pm 0,6$ cm, lớn hơn nhiều so với thanh long ruột đỏ. Hàm lượng vitamin C là $10,3 \pm 2,6$ mg/l [10].

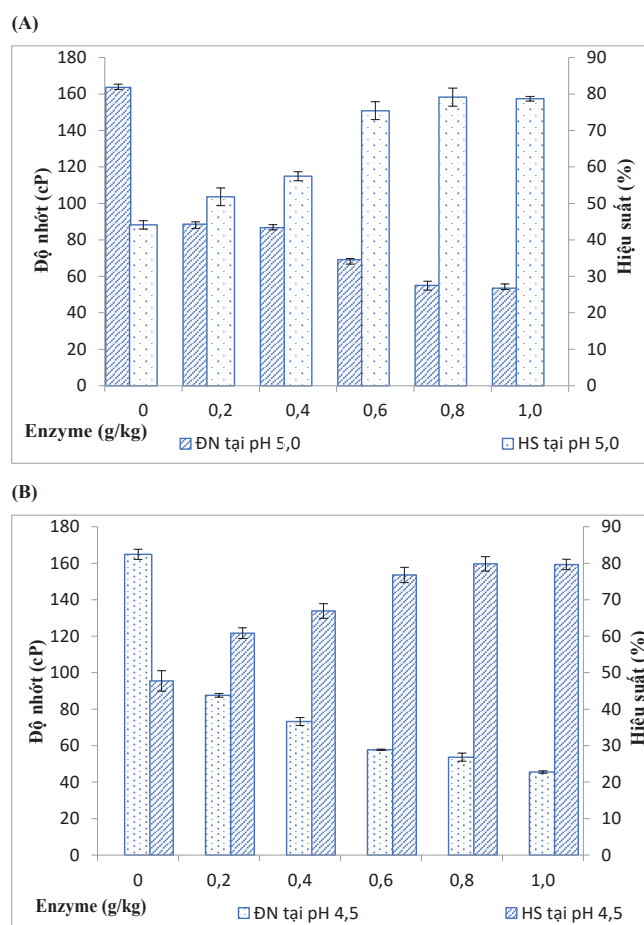
3.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả

Kết quả hình 1 cho thấy, khi tăng nồng độ enzyme, hiệu suất thu hồi dịch tăng dần, độ nhớt dịch giảm dần, sự khác nhau có ý nghĩa ($p < 0,05$) đối với bổ sung nồng độ 0,2, 0,4 và 0,6 g enzyme/kg dịch quả so với nhau và so với mẫu kiểm chứng. Khi tăng nồng độ enzyme lên 0,8 và 1,0 g/kg dịch quả, độ nhớt tiếp tục giảm, hiệu suất thu hồi dịch tăng nhưng không có sự khác biệt ý nghĩa với nhau và với khi sử dụng enzyme nồng độ 0,6 g/kg. Do đó, chọn nồng độ enzyme thích hợp để xử lý dịch quả là 0,6 g/kg cho các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, sự sai khác về hiệu suất thu hồi dịch cũng như sự giảm độ nhớt của dịch quả khi bổ sung enzyme ở pH 4,5 và 5,0 là không có ý nghĩa. Do đó, có thể rút ra kết luận trong khoảng pH của dịch quả thanh long 4,5-5,0 enzyme pectinase hoạt động tốt và không có sự khác biệt thống kê.

Sự giảm độ nhớt và tăng hiệu suất thu hồi dịch được giải thích do enzyme pectinase đã làm suy thoái thành của tế bào thực vật dẫn đến việc giải phóng dễ dàng hơn các thành phần có trong tế bào. Độ đục trong dịch lọc chủ yếu là do sự hiện diện của các polysaccharit như pectin, hemicelluloses và tinh bột. Hơn nữa, pectin có thể liên kết với các polyme thực vật và các mảnh vụn của tế bào tạo thành mạng (có cấu trúc phân tử giống như sợi), gây khó khăn cho quá trình xử lý lọc [11]. Do đó, sử dụng enzyme pectinase là một cách hiệu quả để làm keo tụ phức hợp protein-pectin và tăng hiệu suất thu hồi dịch quả sau khi lọc.

Giá trị pH của dịch lọc giảm nhẹ nghĩa là hàm lượng axit chuẩn độ cũng tăng trong dịch lọc được xử lý enzyme. Sự gia tăng này có thể do hình thành axit galacturonic và axit polygalacturonic hòa



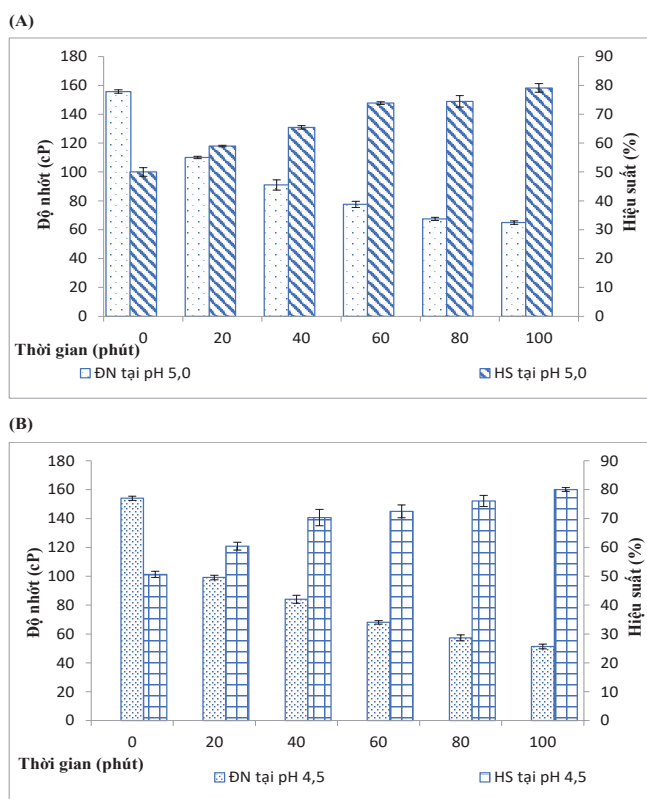
Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả thanh long ruột đỏ Vĩnh Phúc tại pH 5,0 (A) và pH 4,5 (B).

tan trong quá trình thủy phân pectin bởi pectinase. Hàm lượng axit chuẩn độ trong thanh long ruột đỏ nằm trong khoảng 0,58-0,77%. Hàm lượng axit chuẩn độ cho các loại dịch quả khác như quả lòng đèn là 1,0%, lê 0,3%, cam 0,8%, dứa 1,1% và mận 2,2% [12].

Đối với nước thanh long ruột đỏ, không có sự gia tăng đáng kể về chất khô tổng số hòa tan sau khi xử lý enzyme.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả

Thời gian xử lý enzyme ảnh hưởng rõ rệt đến sự giảm độ nhớt của dịch quả thanh long ruột đỏ trên cả 2 giá trị pH khảo sát là 4,5 và 5,0. Cụ thể, khi tăng thời gian xử lý enzyme hiệu suất thu hồi dịch quả tăng dần, độ nhớt giảm dần. Sự khác biệt về độ nhớt, hiệu suất thu hồi dịch quả theo các giá trị thời gian khác nhau là hoàn toàn có ý nghĩa ($p < 0,05$). Tuy nhiên, thời gian xử lý enzyme càng tăng cũng ghi nhận sự suy giảm của betacyanin - một hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học quý giá. Do vậy, chọn thời gian cho quá trình enzyme hoạt động là 80 phút cho hiệu suất thu hồi dịch đạt 75,77%, độ nhớt giảm 58,62% tại pH 5,0; tại pH 4,5, hiệu suất thu hồi đạt 77,56%, độ nhớt giảm 62,81%.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả thanh long ruột đỏ Vĩnh Phúc tại pH 5,0 (A) và pH 4,5 (B).

Chế phẩm thương mại enzyme Pectinex Ultra SP-L được sử dụng nhằm mục đích giảm độ nhớt dịch quả, qua đó nâng cao hiệu suất thu hồi dịch. Khảo sát chế độ xử lý enzyme cho kết quả: nồng độ enzyme sử dụng là 0,6 g/kg dịch quả, thời gian xử lý 80 phút, nhiệt độ 28-32°C cho hiệu suất thu hồi cao nhất đạt 77,56%. Một số chỉ tiêu chính của dịch quả sau khi xử lý enzyme được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Một số chỉ tiêu chính của dịch quả sau khi xử lý enzyme pectinase.

Chỉ tiêu	Giá trị
Chất khô hòa tan (Bx)	13,0±0,2
pH	4,5±0,10
Betacyanin (mg)	35,83±0,55
Vitamin C (mg)	6,33±0,18

Kết quả sau xử lý dịch quả bằng enzyme pectinase, những thành phần cơ bản không thay đổi nhiều so với nguyên liệu ban đầu như hàm lượng chất khô hoà tan, hàm lượng betacyanin. Hàm lượng vitamin C và giá trị pH có giảm không đáng kể.

Nghiên cứu của N.A.A. Rahman và cs (2010) [12] cũng đã đưa ra điều kiện tối ưu cho quá trình xử lý enzyme trên thanh long ruột đỏ là: nồng độ enzyme 0,1%, nhiệt độ 40°C, thời gian 45 phút đối với chế phẩm enzyme Pectinex Ultra SP-L; nồng độ enzyme 0,09%, nhiệt độ 46°C, thời gian 82 phút đối với chế phẩm

enzyme Pectinex CLEAR. Hiệu suất thu hồi dịch đối với chế phẩm Pectinex Ultra SP-L là 83,2 và 92,38% khi sử dụng Pectinex CLEAR.

4. Kết luận

Thanh long ruột đỏ trồng ở Lập Thạch, tỉnh Vĩnh Phúc có hàm lượng dinh dưỡng cao và cân đối, chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao như vitamin C và betacyanin. Kết quả nghiên cứu cho thấy, để nâng cao hiệu suất thu hồi dịch quả thanh long cần sử dụng enzyme pectinase với nồng độ và thời gian phù hợp. Khi xử lý dịch quả thanh long bằng chế phẩm enzyme Pectinex Ultra SP-L với nồng độ 0,6 g/kg dịch quả, thời gian 80 phút cho hiệu suất thu hồi dịch đạt 77,56%. Kết quả này sẽ là tiền đề cho việc đa dạng hoá các sản phẩm có giá trị kinh tế từ quả thanh long ruột đỏ Lập Thạch, Vĩnh Phúc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] O.P.S. Rebecca, A.N. Boyce, S. Chandran (2010), "Pigment identification and antioxidant properties of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*)", *African Journal of Biotechnology*, **9**(10), pp.1450-1454, DOI: 10.5897/AJB09.1603.
- [2] N.S. Ramli, R. Asmah (2014), "Variability in nutritional composition and phytochemical properties of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) from Malaysia and Australia", *International Food Research Journal*, **21**(4), pp.1689-1697.
- [3] N.D. Luong (2010), *Enzyme Technology*, Ho Chi Minh City National University Publishing House, 532pp (in Vietnamese).
- [4] Y.M. Wong, L.F. Siow (2015), "Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models", *J. Food Sci. Technol.*, **52**(5), pp.3086-3092, DOI: 10.1007/s13197-014-1362-2.
- [5] K.M. Herbach, C. Maier, F. Stintzing, et al. (2007), "Effect of processing and storage on juice colour and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice", *European Food Research Technology*, **224**(5), pp.649-658, DOI: 10.1007/s00217-006-0354-5.
- [6] L.T. Mai (2009), *Methods of Analysis of Fermentation Technology Industry*, Science and Technology Publishing House, 336pp (in Vietnamese).
- [7] F. Shahidi, C. Alasalvar (2016), *Handbook of Functional Beverages and Human Health*, Natraceutical Science And Technology, 866pp.
- [8] Hernawati, N.A. Setiawan, R. Shintawati, et al. (2018), "The role of red dragon fruit peel (*Hylocereus polyrhizus*) to improvement blood lipid levels of hyperlipidaemia male mice", *Journal of Physics Conference Series*, **1013**, 5pp, DOI: 10.1088/1742-6596/1013/1/012167.
- [9] V.T. Trang, N.T.T. Nguyen, N.V. Hung, et al. (2020), "Research on the effects of some technological factors on the stability of betacyanin in red-fleshed dragon fruit juice (*Hylocereus polyrhizus*) Lap Thach, Vinh Phuc", *Journal of Science and Technology*, **140**, pp.71-76 (in Vietnamese).
- [10] D.V. Tan, P.T.T. Hang (2014), "Quantification of some nutritional and mineral components in white-fleshed dragon fruit (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose) and red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) Britton & Rose) grown in Van Truc commune, Lap Thach district, Vinh Phuc province", *VNU Journal of Science, Vietnam National University Hanoi*, **30**(1S), pp.181-188 (in Vietnamese).
- [11] G. Garg, A. Singh, A. Kaur, et al. (2016), "Microbial pectinases: An ecofriendly tool of nature for industries", *National library of medicine*, **6**(1), DOI:10.1007/s13205-016-0371-4.
- [12] N.A.A. Rahman, S.M.M. Kamal, F.S. Taip (2010), "Impact of two commercial enzymes application on some physicochemical properties of red pitaya juices", *Journal - The Institution of Engineers, Malaysia*, **71**(4), pp.25-31.

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: khoahocvacongnghevietnam@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

Phát hiện đột biến gen *G6PD* ở bệnh nhân thuộc dân tộc Nùng thiểu hụt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Trần Thị Mai Anh, Ngô Thị Thảo, Đinh Thùy Linh, Trần Văn Khánh

Đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người khỏe mạnh, phân động vật nuôi, thức ăn và nước tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam.

Nguyễn Thị Tuyết Mai, Vũ Thị Ngọc Bích, Vũ Thị Tường Vân, Trần Huy Hoàng

Đặc điểm lâm sàng và hình ảnh nội soi phế quản u máu hạ thanh môn ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương.

Nguyễn Thị Thu Nga, Lê Thị Hồng Hạnh, Phạm Thu Nga, Phùng Đăng Việt, Lê Thanh Chương, Đặng Thị Kim Thanh, Phạm Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Minh Phương

Nghiên cứu thành phần hóa học theo hướng tác dụng kháng viêm và chống oxy hóa của cây Bồ công anh (*Lactuca indica* L.).

Kiều Thị Thủy, Cao Lý Tấn Thông, Nguyễn Thị Ái Nhung, Nguyễn Thành Triết

Tổng hợp và thử hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất 1,3-benzodioxole.

Nguyễn Ngọc Phương Kiều, Vũ Thanh Thảo, Trần Ngọc Châu

Xây dựng quy trình định lượng đồng thời 2 hợp chất phenol orcinol glucosid và curculigosid trong Sâm cau (*Curculigo orchoides*) bằng UPLC-PDA.

Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Nguyễn Huỳnh Thanh Tuyền, Lê Văn Huân, Trần Thị Văn Anh

Giá trị chẩn đoán sớm nhồi máu cơ tim cấp của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica.

Nguyễn Thị Ngọc Lan, Phan Thị Thu Hương

Phân lập, tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng kích thích sinh trưởng và đối kháng chống lại nấm bệnh *Fusarium oxysporum* và tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. ở Việt Nam.

Lê Thị Thanh Tâm, Phạm Thị Lương, Lê Thị Phương Thảo, Jennifer Jähne, Peter Lasch, Rainer Borriss

Kích thích cá hồng mi Ấn Độ (*Sahyadria denisonii*) sinh sản bằng kích dục tố khác nhau.

Nguyễn Thị Kim Liên, Trương Thị Thúy Hằng, Lâm Hoàng Lai, Nguyễn Hồng Yến, Ngô Khánh Duy

So sánh hiệu quả phát sinh phôi vô tính từ các nguồn mẫu *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.).

Lê Thị Diễm, Trương Hoài Phong, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Vũ Quốc Luận, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Thị Như Mai, Trịnh Thị Hương, Bùi Văn Thế Vinh, Trần Quế, Dương Tấn Nhựt

Nghiên cứu tạo dòng lạc năng suất và mang gen/QTL chịu hạn triển vọng.

Trần Duy Việt, Phan Thị Thanh, Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Thị Ngừ

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid đến sự phát sinh biến dị trên lan Cẩm Cù (*Hoya kerrii*).

Ngô Minh Trí, Trần Lê Nguyên, Trần Thị Mỹ Tiên, Lâm Ngọc Kim Trúc, Phùng Hoàng Yến, Dương Nguyễn Mai Anh, Phùng Thị Hằng, Nguyễn Thị Pha

Ảnh hưởng của xử lý enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả thanh long ruột đỏ trồng ở Vĩnh Phúc.

Nguyễn Thị Hạnh, Vũ Thu Trang, Nguyễn Văn Hưng

1 Identification of mutation in *G6PD* gene in Nung ethnic patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.

Thi Mai Anh Tran, Thi Thao Ngo, Thuy Linh Dinh, Van Khanh Tran

5 Molecular epidemiological characteristics of *E. coli* strains carrying the *mcr-1* gene isolated from healthy human feces, domestic animal feces, food and water in Thanh Ha commune, Thanh Liem district, Ha Nam province.

Thi Tuyen Mai Nguyen, Thi Ngoc Bich Vu, Thi Tuong Van Vu, Huy Hoang Tran

12 Clinical features and endoscopic images of hemoptysis and subglottic mass in children at Vietnam National Children's Hospital.

Thi Thu Nga Nguyen, Thi Hong Hanh Le, Thu Nga Pham, Dang Viet Phung, Thanh Chuong Le, Thi Kim Thanh Dang, Thi Thanh Tam Pham, Thi Minh Phuong Nguyen

16 Anti-inflammatory and anti-oxidant activity-guided investigation of phytoconstituents from *Lactuca indica* L.

Thi Thuy Kieu, Ly Tan Thong Cao, Thi Ai Nhung Nguyen, Thanh Triet Nguyen

22 Synthesis and test antibacterial activities of 1,3-benzodioxole derivatives.

Ngoc Phuong Kieu Nguyen, Thanh Thao Vu, Ngoc Chau Tran

28 Method development for the simultaneous quantification of orcinol glucoside and curculigoside in *Curculigo orchoides* by UPLC-PDA.

Thi Anh Nguyet Nguyen, Huynh Thanh Tuyen Nguyen, Van Huan Le, Thi Van Anh Tran

34 The value of early diagnosis of acute myocardial infarction of the high-sensitivity Troponin I assay on the Atellica analyzer.

Thi Ngoc Lan Nguyen, Thi Thu Huong Phan

39 Isolation, selection and identification of indigenous bacterial strains having the ability to promote plant growth and antagonise the fungal disease *Fusarium oxysporum* and root-knot nematode *Meloidogyne* sp. in Vietnam.

Thi Thanh Tam Le, Thi Luong Pham, Thi Phuong Thao Le, Jennifer Jähne, Peter Lasch, Rainer Borriss

46 Induced breeding of *Sahyadria denisonii* using different hormonal substances.

Thi Kim Lien Nguyen, Thi Thuy Hang Truong, Hoang Lai Lam, Hong Yen Nguyen, Khanh Duy Ngo

51 Comparison of somatic embryogenesis efficiency from *in vitro* explant sources of Ngọc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.).

Thi Diem Le, Hoai Phong Truong, Thanh Tung Hoang, Dac Khai Hoang, Quoc Luan Vu, Manh Cuong Do, Thi Nhu Mai Nguyen, Thi Huong Trinh, Van The Vinh Bui, Que Tran, Tan Nhut Duong

58 A study on creating highly yielded and drought-tolerant QTL gene-possessed lines of peanut.

Duy Viet Tran, Thi Thanh Phan, Thi Nhan Nguyen, Thi Ngu Nguyen

63 Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid on the variant formation of Valentine Hoya (*Hoya kerrii*).

Minh Tri Ngo, Le Nguyen Tran, Thi My Tien Tran, Ngoc Kim Truc Lam, Hoang Yen Phung, Nguyen Mai Anh Duong, Thi Hang Phung, Thi Pha Nguyen

69 Effects of enzyme pectinase treatment on obtaining optimum red dragon juice production yield from Vinh Phuc province.

Thi Hanh Nguyen, Thu Trang Vu, Van Hung Nguyen