



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 61 - Số 2 - Tháng 2 năm 2019

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

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

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

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

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN

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

EDITORIAL OFFICE

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

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

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

PUBLICATION LICENCE

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

Đánh giá kết quả bước đầu phẫu thuật nội soi trong điều trị ung thư đại trực tràng

Nguyễn Văn Hiếu¹, Lê Văn Quảng^{1*}, Phạm Văn Bình²,
Trần Anh Cường³, Hoàng Mạnh Thắng¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện K

³Trường Đại học Y dược Hải Phòng

Ngày nhận bài 13/4/2018, ngày chuyển phản biện 18/4/2018, ngày nhận phản biện 21/5/2018, ngày chấp nhận đăng 4/6/2018

Tóm tắt:

Đề tài nhằm mục tiêu đánh giá kết quả phẫu thuật nội soi (PTNS) trong điều trị ung thư đại trực tràng (UTĐTT). Đối tượng của nghiên cứu gồm 30 bệnh nhân (BN) ung thư trực tràng (UTTT) thấp và 30 BN ung thư đại tràng (UTĐT) được PTNS. Kết quả nghiên cứu cho thấy, thời gian mổ trung bình 131 ± 24 phút, lượng máu mất trung bình $33 \pm 15,4$ ml, thời gian nằm viện trung bình $8,15 \pm 2,05$ ngày, tỷ lệ biến chứng sau mổ ít. Số lượng hạch trung bình vét được 14,45, tỷ lệ tái phát tại thời điểm 3 năm là 3,33%. Sống thêm tại thời điểm kết thúc nghiên cứu là 100%. Qua nghiên cứu có thể kết luận: PTNS trong điều trị UTĐTT là một phương pháp an toàn, đảm bảo về mặt ung thư học, rút ngắn thời gian nằm viện, góp phần làm hài lòng người bệnh.

Từ khóa: bệnh nhân, phẫu thuật nội soi, ung thư đại trực tràng.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Theo Tổ chức Ung thư toàn cầu GLOBOCAN, UTĐTT đứng thứ 3 về tỷ lệ mắc mới và là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 4 trong các bệnh ung thư thường gặp [1]. Ở Việt Nam, UTĐTT cũng nằm trong nhóm 5 bệnh ung thư thường gặp và có xu hướng ngày càng gia tăng [2].

Điều trị UTĐTT là điều trị đa mô thức, gồm phẫu thuật, hóa chất, xạ trị, điều trị đích..., trong đó phẫu thuật đóng vai trò quan trọng. Phẫu thuật UTĐTT cũng có 2 phương pháp là mổ mở kinh điển và PTNS [3]. PTNS là một trong những tiến bộ của ngành ngoại khoa đem lại nhiều lợi ích cho BN như hồi phục sau mổ nhanh hơn, tính thẩm mỹ cao và giúp cho BN có chất lượng cuộc sống sau mổ tốt hơn. Tuy nhiên, đối với UTĐTT, còn nhiều câu hỏi được đặt ra như: kỹ thuật ngoại khoa PTNS có thực thi không? tỷ lệ tai biến trong mổ, biến chứng, khả năng hồi phục sau mổ so với mổ mở truyền thống thế nào? về ung thư học, có cắt bỏ triệt căn khối u không? nạo vét hạch có đầy đủ không? PTNS có reo rắc và làm lan tràn tế bào ung thư không? tỷ lệ tái phát, thời gian sống thêm sau mổ nội soi so với mổ mở truyền thống thế nào? Hiện nay, một số nghiên cứu của các tác giả nước ngoài cho thấy PTNS an toàn cả về khía cạnh kỹ thuật ngoại khoa và ung thư học. Tuy nhiên, trong nước có rất ít công

trình nghiên cứu về PTNS điều trị UTĐTT. Do vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài này với mục tiêu đánh giá kết quả PTNS trong điều trị UTĐTT.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: gồm 30 BN UTTT thấp được PTNS cắt cụt trực tràng và 30 BN UTĐT tại Bệnh viện K và Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu can thiệp lâm sàng không đối chứng.

Các bước tiến hành:

- BN được khám lâm sàng, các xét nghiệm cận lâm sàng trước mổ.
- Được khẳng định ung thư bằng mô bệnh học trước mổ.
- Các BN được tiến hành PTNS cắt cụt trực tràng, cắt nửa đại tràng.
- Đánh giá kết quả PTNS, tai biến, biến chứng của phẫu thuật.
- Đánh giá sống thêm 1 năm, 2 năm, 3 năm theo thuật toán Kaplan-Meier.

*Tác giả liên hệ: Email: quanglevan72@yahoo.com

Evaluating the initial results of laparoscopic surgery in the treatment of colorectal cancer

Van Hieu Nguyen¹, Van Quang Le^{1*}, Van Binh Pham², Anh Cuong Tran³, Manh Thang Hoang¹

¹Hanoi Medical University

²K Hospital

³Hai Phong University Medicine and Pharmacy

Received 13 April 2018; accepted 4 June 2018

Abstract:

The study aims to evaluate the result of laparoscopic surgery in the treatment of colorectal cancer. Patients and methods: 60 colorectal cancer patients, including 30 lower third rectal cancer and 30 colon cancer patients who were operated laparoscopically. Results: mean of operation time was 131±24 minutes; mean of blood loss was 33±15.4 ml; mean of hospitalization stay was 8.15±2.05 days. Post-op complications were rare. Mean of harvested lymph node number was 14.45. Three year relapse rate was 3.33%. Conclusions: laparoscopic surgery is safe and ensures the oncologic domain as well as shortens the hospitalization stay and makes the patients feel more comfortable.

Keywords: colorectal cancer, laparoscopic surgery, patient.

Classification number: 3.2

- Số liệu được thu thập theo protocol bệnh án mẫu. Toàn bộ số liệu được lưu trữ và xử lý trên phần mềm SPSS 15.0. Đánh giá tỷ lệ sống thêm sau mổ bằng phương pháp Kaplan-Meier. So sánh sự khác biệt giữa các biến định lượng bằng kiểm định T, các biến định tính bằng kiểm định khi bình phương với độ chính xác 95% (p<0,05).

Kết quả nghiên cứu

Các thông số kết quả bao gồm: tuổi, số Trocar sử dụng và phương pháp phẫu thuật, thời gian mổ, lượng máu mất trong quá trình phẫu thuật, phẫu tích hạch và mô bệnh học hạch, giai đoạn hạch, biến chứng và thời gian trung tiện sau mổ, thời gian nằm viện và tình hình hiện tại của BN được thể hiện ở các bảng 1-9 sau đây:

Tuổi

Bảng 1. Tuổi.

Tuổi	<40	40-49	50-59	60-69	≥70	Min	Max	±SD
UTTT	0	3	15	6	6	44	82	60,9±10,6
UTĐT	2	3	11	11	3	32	83	58,3±11,6
Chung	2	6	26	17	9	32	83	59,6±11,1

Số Trocar sử dụng

Bảng 2. Số Trocar sử dụng trong phẫu thuật.

Số Trocar	4	5
UTTT	24	6
UTĐT	18	12
Tổng	42	18

Phương pháp phẫu thuật

Bảng 3. Phương pháp phẫu thuật.

Phương pháp phẫu thuật	Số BN	%
Phẫu thuật Miles	21	35,0
Phẫu thuật bảo tồn cơ thắt	9	15,0
Cắt đại tràng phải	17	28,3
Cắt đại tràng trái	13	21,7
Tổng	60	100
Chuyển mổ mở		
UTTT	3	5,0
UTĐT	2	3,3
Không chuyển	55	91,7
Tổng	60	100

Thời gian mổ, lượng máu mất trong quá trình phẫu thuật

Bảng 4. Thời gian mổ, lượng máu mất.

Phẫu thuật	Thời gian mổ (phút)	Lượng máu mất (ml)
UTTT	130±24	28,7±16,8
UTĐT	132±20	37±14
Chung	131±22	33±15,4

Di căn hạch

Bảng 5. Phẫu tích hạch và mô bệnh học hạch.

	Tổng số hạch vét được	Số hạch TB vét được	Số hạch di căn	Số BN di căn hạch
UTĐT	430	14,3	47	19
UTTT	438	14,6	41	12
Chung	868	14,45	88	31
Hạch nhóm UTTT				
Có xạ trị (n=9)	113	12,6	11	4
Không xạ trị trước mổ (n=21)	325	15,5	30	8
Chung	438	14,6	41	12

Xếp giai đoạn hạch

Bảng 6. Giai đoạn hạch.

	N0 (0 hạch)	N1 (1-3 hạch)	N2a (4-6 hạch)	N2b (>6 hạch)
UTĐT	11	13	4	2
UTTT	18	8	1	3
Chung	29	21	5	5

Biến chứng và thời gian trung tiện sau mổ

Bảng 7. Biến chứng và thời gian trung tiện sau mổ.

Biến chứng	UTĐT	UTTT	Chung
Đờ báng quang	0	1	1
Không có biến chứng	30	29	59
Thời gian trung tiện sau mổ			
1 ngày	1	1	2
2 ngày	21	18	39
3 ngày	5	9	14
>3 ngày	3	2	5
±SD	2,3±0,7	2,4±0,7	2,35±0,7

Thời gian nằm viện

Bảng 8. Thời gian nằm viện.

	N	$\bar{X}$	SD	Min	Max
UTĐT	30	8,9	2,3	7	15
UTTT	30	7,4	1,8	6	19
Chung	60	8,15	2,05	6	19

Tình hình hiện tại của BN

Bảng 9. Tình hình hiện tại của BN.

Hiện tại	UTĐT	UTTT	Chung
Còn sống	30	30	60
Đã chết	0	0	0
Tái phát	1	1	2

Bàn luận

Thời gian mổ của nghiên cứu trung bình là 131±22 phút, trong đó nhóm UTĐT là 132±20 phút, nhóm UTTT là 130±24 phút, tương đương với các nghiên cứu của tác giả nước ngoài [1, 2].

30 BN UTĐT trong nghiên cứu này có số lượng hạch vét ra trung bình là 14,3 với tỷ lệ di căn hạch chung là 63,33%. Con số này đạt được cột mốc đưa ra bởi nhiều tổ chức phòng chống ung thư trên thế giới (tối thiểu 12 hạch) [1].

30 BN UTTT trong nghiên cứu có số lượng hạch vét ra trung bình là 14,6 với tỷ lệ di căn hạch chung là 40%.

Lượng máu mất trung bình là 33±15,4 ml/BN, trong đó nhóm UTĐT là 37±14 ml và nhóm UTTT là 28,7±16,8

ml. Không có BN nào phải truyền máu trong, sau mổ. Kết quả cho thấy, mổ mở kinh điển mất nhiều máu hơn mổ nội soi. Theo chúng tôi, mổ nội soi ít mất máu do sử dụng các dụng cụ tiên tiến như dao siêu âm, LigaSure. Về biến chứng trong mổ UTĐT tương đương với các nghiên cứu đã công bố trước đây [3].

Chúng tôi ghi nhận qua 60 BN sau mổ không có BN nào phải dùng thuốc giảm đau quá 2 ngày, thời gian có nhu động ruột sau mổ ngắn (trung bình 2,35±0,7 giờ), thời gian nằm viện trung bình sau mổ 8,15 ngày. Kết quả này cũng phù hợp với báo cáo của các tác giả nước ngoài [4-7].

Trong 60 BN UTĐT được PTNS trong nghiên cứu của chúng tôi chưa có BN nào tử vong, 2 BN tái phát, không có trường hợp nào di căn lỗ Trocar. Số liệu về thời gian sống thêm của các BN trong nghiên cứu của chúng tôi sẽ được cập nhật trong một bài báo khác.

Kết luận

PTNS là một phương pháp an toàn, thời gian phẫu thuật ngắn, lượng máu mất trung bình 33 ml. Số lượng hạch vét trung bình 14,45 và tỷ lệ tái phát tại thời điểm 3 năm là 3,33%. Phương pháp PTNS đảm bảo về mặt ung thư học, rút ngắn thời gian nằm viện, góp phần làm hài lòng cho người bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E. Kuhry, R. Veldkamp, W.C. Hop, J. Jeekel, G. Kazemier, H.J. Bonjer, E. Haglund, L. Pahlman, M.A. Cuesta, S. Msika, M. Morino, A.M. Lacy, Colon cancer Laparoscopic or Open Resection Study Group (2005), "Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: short-term outcomes of a randomised trial", *Lancet Oncol.*, **6**(7), pp.477-484.
- [2] T. Akiyoshi, et al. (2010), "Short-term outcomes of laparoscopic colectomy for transverse colon cancer", *J. Gastrointest. Surg.*, **14**(5), pp.818-823.
- [3] N. Soper, L.L. Swannstrom, W.S. Eubanks (2009), *Mastery of endoscopic and laparoscopic surgery*, 3rd edition, pp.489-499.
- [4] H.I. Açar, M.A. Kuzu (2012), "Important points for protection of the autonomic nerves during total mesorectal excision", *Dis. Colon Rectum*, **55**, pp.907-912.
- [5] H. Kellokumpu, M.I. Kairaluoma, K.P. Nuorva, et al. (2012), "Short-and long-term outcome following laparoscopic versus open resection for carcinoma of the rectum in the multimodal setting", *Dis. Colon Rectum*, **55**, pp.854-863.
- [6] J.M. Luk, P.H. Tung, K.F. Wong, et al. (2009), "Laparoscopic surgery induced interleukin-6 levels in serum and gut mucosa: implications of peritoneum integrity and gas factors", *Surg. Endosc.*, **23**, pp.370-376.
- [7] J.H. Marks, U.B. Kawun, W. Hamdan, et al. (2008), "Redefining contraindications to laparoscopic colorectal resection for high-risk patients", *Surg. Endosc.*, **22**, pp.1899-1904.

Nhìn lại chỉ định phẫu thuật cắt chỉnh xương hàm mặt không chỉnh nha trước mổ nhân 2 trường hợp lâm sàng

Nguyễn Việt Anh, Vũ Trung Trực, Nguyễn Hồng Hà*

Bệnh viện Việt Đức

Ngày nhận bài 15/8/2018; ngày gửi phản biện 17/8/2018; ngày nhận phản biện 20/9/2018; ngày chấp nhận đăng 2/10/2018

Tóm tắt:

Điều trị sai lệch xương hàm mặt thường quy cần có giai đoạn điều trị chỉnh nha kéo dài trước phẫu thuật. Giai đoạn này được coi là rất quan trọng để chuẩn bị cho phẫu thuật và đảm bảo kết quả ổn định. Nó thường gây phiền toái cho bệnh nhân vì thời gian điều trị kéo dài, ảnh hưởng đến thẩm mỹ và chức năng ăn nhai của bệnh nhân kém. Gần đây, trên thế giới một số tác giả đã tiến hành phẫu thuật trước chỉnh nha (không chỉnh nha trước mổ) trong xử lý sai lệch xương hàm mặt, rút ngắn thời gian điều trị mà vẫn thu được kết quả tốt. Trong bài báo, các tác giả trình bày 2 trường hợp bệnh nhân được điều trị theo hướng này tại Bệnh viện Việt Đức. Về thẩm mỹ, cả 2 bệnh nhân được cải thiện ngay sau mổ, kết quả tốt, bệnh nhân rất hài lòng. Nhân 2 trường hợp này, các tác giả muốn nhìn lại y văn để xem xét về chỉ định và hiệu quả của phương pháp điều trị sai lệch xương hàm mặt thường quy.

Từ khóa: nhô xương hàm dưới, phẫu thuật không chỉnh nha trước mổ, vẩu xương hai hàm.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Trước những năm 1960, điều trị chỉnh nha trước phẫu thuật còn chưa phổ biến. Tuy nhiên, khi các kỹ thuật phẫu thuật phát triển và số lượng bệnh nhân có chỉ định phẫu thuật chỉnh xương hàm tăng lên, mong muốn của bệnh nhân cũng như của bác sĩ là đạt được kết quả thẩm mỹ và khớp cắn tối ưu khiến phương pháp điều trị chỉnh nha trước mổ trở nên phổ biến. Phương pháp này yêu cầu chỉnh nha trước mổ để xóa bỏ trừu tượng quan khớp cắn và các răng được dàn đều. Với hầu hết trường hợp phải cắt chỉnh xương hàm, có 2 giai đoạn di chuyển răng chỉnh nha, đó là: chỉnh nha trước và sau phẫu thuật. Nhược điểm của việc can thiệp chỉnh nha cả trước và sau mổ là khiến thời gian điều trị kéo dài, thẩm mỹ khuôn mặt xấu trong thời gian chỉnh nha trước mổ dẫn đến nhiều bệnh nhân chán nản.

Trong những năm gần đây, xu hướng điều trị để có được sự thay đổi khuôn mặt sớm ngày càng tăng. Trong kế hoạch điều trị phẫu thuật trước (Surgery First), giai đoạn chỉnh nha trước phẫu thuật được loại bỏ hoặc rút ngắn tối đa, xương hàm được phẫu thuật để có vị trí mong muốn và tiếp theo là chỉnh nha. Bệnh nhân có được sự thay đổi thẩm mỹ khuôn mặt ngay sau phẫu thuật, đồng thời bác sĩ chỉnh nha có thể tận dụng quá trình lành thương của xương để giúp việc di

chuyển răng nhanh hơn [1-3]...

Ca lâm sàng

Trường hợp 1

Bệnh nhân nữ 33 tuổi đến khám vì vẩu hai hàm. Bệnh nhân mong muốn cải thiện thẩm mỹ khuôn mặt một cách nhanh nhất và không muốn đeo mắc cài chỉnh răng.

Khám lâm sàng, bệnh nhân có dạng mặt lồi, không cân xứng, môi trên ngắn, hai môi không kín ở tư thế nghỉ. Khám trong miệng, bệnh nhân có khớp cắn loại I răng hàm lớn thứ nhất 2 bên, độ cắn chìa 4 mm, cắn chù 3 mm. Đường giữa răng cửa trên và dưới thẳng và trùng với đường giữa mặt. Các răng sắp xếp tương đối đều trên cung hàm, không có khe thừa giữa các răng. X-quang mặt thẳng, mặt nghiêng và chụp cắt lớp đa lát cắt (MSCT) hàm mặt cho thấy, xương hàm trên và xương hàm dưới nhô ra trước so với nền sọ (góc SNA và SNB); trục răng cửa trên và dưới trong giới hạn bình thường.

Dựa trên các triệu chứng lâm sàng, X-quang và mong muốn điều trị của bệnh nhân, chúng tôi quyết định kế hoạch điều trị như sau:

- Phẫu thuật cắt xương hàm trước chỉnh nha.

*Tác giả liên hệ: Email: nhadr4@gmail.com

Orthognathic surgery without presurgical orthodontics: two clinical cases and literature review

Viet Anh Nguyen, Trung Truc Vu, Hong Ha Nguyen*

Viet Duc Hospital

Received 15 August 2018; accepted 2 October 2018

Abstract:

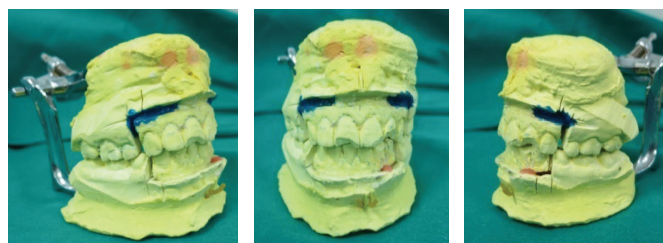
The conventional approach in orthodontic surgery treatment of dentofacial anomalies requires a varied period of pre-surgical orthodontic treatment. This presurgical period is considered to be important for adequate surgical treatment and stable results. This period is usually long bothersome for patients because dental decompensation is required and there is consequent deterioration of aesthetics and function. Recently, some authors suggest a surgery-first approach (SFA), one of the treatment choices for Class III and bimaxillary protrusion patients. In this report, we present two first cases of Viet Duc Hospital. The patient benefitted from immediate improvement of the facial profile after surgery, and the results were not compromised. We would like to review the literature on indication and effect of this alternative treatment.

Keywords: bimaxillary protrusion, mandibular prognathism, surgery-first approach.

Classification number: 3.2

- Nhổ răng 14, 24, 34, 44 trong phẫu thuật.
- Cắt hàm trên và hàm dưới segmental qua vị trí răng 14, 24, 34, 44, đẩy lùi xương hàm trên và xương hàm dưới ra sau.
- Cố định 2 hàm bằng cung tigerstedt trong 2 tuần sau phẫu thuật để đảm bảo ổn định khớp cắn.
- Chỉnh nha sau phẫu thuật để có kết quả tối ưu về thẩm mỹ và chức năng.

Trước phẫu thuật, chúng tôi có lấy dấu 2 hàm, đưa vào cang cấn, cắt hàm trên mẫu thạch cao, giữ tương quan răng hàm lớn ở loại I và các răng ở tư thế lỏng mũi tối đa và đúc máng phẫu thuật (surgical splint) cho bệnh nhân (hình 1).



Hình 1. Mẫu thạch cao.



Hình 2. Hình ảnh trong mổ, kết xương nẹp vít, cố định cung tigerstedt.

Phẫu thuật được tiến hành đúng theo kế hoạch, chúng tôi đã nhổ răng 14, 24, 34, 44, cắt segment hàm trên và hàm dưới tại vị trí nhổ răng, đẩy lùi xương hàm trên và xương hàm dưới ra sau, cố định 2 hàm bằng cung tigerstedt, kết hợp xương nẹp vít (hình 2).

Khám lại 1 tháng sau mổ cho thấy: mặt cân đối, tương quan mô mềm của khuôn mặt hài hòa, mặt nghiêng được cải thiện nhiều, không bị vẩu. Hai môi khép kín ở tư thế nghỉ. Khám trong miệng, ở tư thế cắn lỏng mũi tối đa, các răng hàm trên và dưới ăn khớp tốt, tương quan răng 6 loại I cả 2 bên, độ cắn chùm và cắn chìa trong giới hạn bình thường. Ở trên cung răng, có khe thừa khoảng 1,5 mm giữa răng nanh và răng hàm nhỏ thứ 2. Chúng tôi đã tư vấn cho bệnh nhân điều trị chỉnh nha sau mổ để đóng kín khe thừa nhưng bệnh nhân chưa sẵn sàng đeo mắc cài, chúng tôi đã trám composite để tạm thời đóng kín khe thừa, cải thiện thẩm mỹ cho bệnh nhân trong thời gian chưa chỉnh răng sau mổ. Bệnh nhân rất hài lòng với kết quả đạt được.

Trường hợp 2

Bệnh nhân nam 22 tuổi đến khám vì mặc cảm thẩm mỹ “mặt lưỡi cày”. Bệnh nhân than phiền vì thấy mặt bị lệch,

hàm dưới nhô ra trước nhiều, ăn nhai khó khăn (hình 3).

Khám lâm sàng ngoài mặt: mặt không cân đối, hàm dưới nhô ra trước và lệch phải, tầng mặt dưới dài, nhìn nghiêng bệnh nhân có dạng mặt lõm. Trong miệng: chen chúc nhẹ cung răng hàm trên, chen chúc mức độ trung bình cung răng hàm dưới, khớp cắn loại III răng hàm lớn bên trái, loại II răng hàm lớn bên phải, cắn ngược và hở từ vùng răng sau bên phải cho tới vùng răng cửa, đường giữa hàm dưới lệch phải 5 mm, răng 32, 42 xoay và lệch phía lưỡi.

Bệnh nhân được chụp ảnh ngoài mặt, trong miệng, lấy dấu hàm, chụp X-quang mặt thẳng, mặt nghiêng (hình 4) và chụp MSCT hàm mặt có dựng hình 3D.



Hình 3. Bệnh nhân thứ 2 trước mổ.



Hình 4. Bệnh nhân thứ 2, X quang mặt thẳng và nghiêng trước và sau mổ.

Bệnh nhân không muốn điều trị chỉnh nha, do đó chúng tôi đã lên kế hoạch điều trị phẫu thuật không chỉnh nha cho bệnh nhân:

- Cắt dọc giữa xương hàm dưới ở vị trí góc hàm - cạnh lên 2 bên (BSSO).
- Xoay xương hàm dưới sang trái, kết hợp xương ở góc hàm 2 bên.
- Cố định 2 hàm bằng cung tiggerstedt 3 tuần sau phẫu thuật.

Sau mổ, bệnh nhân được theo dõi và điều trị kháng sinh, giảm đau chống phù nề trong 1 tuần và không có biến chứng gì. Khám lại sau mổ 1 tháng, chúng tôi thấy thẩm mỹ được cải thiện rõ rệt: mặt cân đối, hài hòa, há miệng tốt, khớp cắn

được cải thiện nhiều, bệnh nhân đã hết cắn ngược, cắn chạm được vùng răng hàm cả 2 bên, khả năng ăn nhai của bệnh nhân được cải thiện tốt. Bệnh nhân rất hài lòng với kết quả điều trị (hình 5).



Hình 5. Bệnh nhân thứ 2 sau mổ.

Bàn luận

Trong điều trị các bất thường xương hàm mặt thường quy, chỉnh nha trước mổ nhằm loại bỏ chen chúc răng và bù trừ răng, mục đích để tạo khớp cắn ổn định, răng và tương quan hàm ở vị trí đúng sau phẫu thuật [4, 5]. Thời gian chỉnh răng trước mổ thường kéo dài 6 tháng đến 2 năm, tùy theo bệnh nhân và bác sĩ. Trong suốt quá trình này, chức năng và thẩm mỹ khuôn mặt của bệnh nhân sẽ kém hơn lúc trước điều trị [6-8].

Các nguyên tắc của chỉnh nha chuẩn bị cho phẫu thuật đối nghịch với điều trị chỉnh nha đơn thuần. Phẫu thuật xương hàm không chỉnh nha trước mổ làm thay đổi thẩm mỹ khuôn mặt và tương quan xương hàm trước. Do đó, việc chỉnh nha sau mổ theo các nguyên tắc chỉnh nha thường quy sẽ giải quyết các vấn đề còn lại như sai khớp cắn loại I.

Phẫu thuật cắt chỉnh xương hàm không chỉnh nha trước mổ thực sự rút ngắn thời gian điều trị so với phương pháp thường quy. Phương pháp này giúp cải thiện ngay tương quan giữa xương và mô mềm, giải quyết được những mặc cảm về thẩm mỹ cho bệnh nhân. Điều quan trọng là chúng ta phải khám, đánh giá và chỉ định đúng những trường hợp có thể điều trị phẫu thuật không chỉnh nha trước mổ gồm [1]:

- Các răng đều hoặc chen chúc nhẹ.
- Đường cong Spee phẳng hoặc cong nhẹ.
- Trục răng cửa bình thường hoặc ngả môi/lưỡi mức độ nhẹ.

Phương pháp không chỉnh nha trước mổ có thể áp dụng cho cả trường hợp sai khớp cắn loại II và loại III nhưng các ca sai khớp cắn loại III chiếm tỷ lệ cao hơn.

Quy trình chung của 1 ca phẫu thuật không chỉnh nha

trước mổ bao gồm [2]:

- Các răng hàm trên và hàm dưới được gắn mắc cài và khâu nhưng chưa đặt dây cung. Dây cung chỉnh nha được đặt sau phẫu thuật từ 1 tuần tới 1 tháng để dần đều, trong thời gian đó xương hàm đã cắt được giữ vững bởi nẹp cố định cứng chắc.

- Khi phẫu thuật trên mẫu, xương hàm trên và dưới được sắp xếp sao cho tương quan răng hàm lớn đứng và độ cắn chòm dương. Tương quan răng hàm lớn có thể ở loại I trong trường hợp không nhổ răng hoặc nhổ 4 răng hàm nhỏ thứ nhất, ở loại III trong trường hợp nhổ răng hàm nhỏ thứ nhất hàm dưới và ở loại II trong trường hợp nhổ răng hàm nhỏ thứ nhất hàm trên. Chỉ khi xác định được tương quan răng hàm lớn, độ cắn chia mới được xác định.

- Điều trị chỉnh nha sau phẫu thuật nên bắt đầu sớm, khoảng sau phẫu thuật từ 1 tuần đến 1 tháng để tận dụng lợi thế của hiện tượng “di chuyển răng tăng tốc sau phẫu thuật”. Các khí cụ chỉnh hình như facemask hoặc chin cup cho các bệnh nhân loại III có thể được sử dụng để duy trì tương quan xương trong suốt thời gian chỉnh răng.

Những điểm cần chú ý khi lên kế hoạch điều trị:

- Tương quan răng hàm lớn được sử dụng làm mốc ban đầu để xác định khớp cắn tạm thời.

- Trục của các răng cửa trên có vai trò quan trọng xác định có cần thiết nhổ răng không. Nếu góc răng cửa trên - mp cắn $<53-55^\circ \rightarrow$ xét nhổ răng [3]. Một giải pháp khác là thay đổi vị trí của xương hàm trên, để mặt phẳng cắn dốc hơn $\rightarrow$ trục răng cửa trên dựng thẳng hơn. Ngoài ra cũng có thể di xa khỏi răng sau hàm trên bằng nẹp gò má tạo khoảng để kéo lùi răng cửa dưới [9-11].

- Đường giữa phải trùng nhau sau phẫu thuật, độ cắn chia phía sau phải đứng cả 2 bên.

Trong hai trường hợp báo cáo lâm sàng của chúng tôi, phẫu thuật xương hàm không chỉnh nha trước mổ đã mang lại sự cải thiện rõ rệt về thẩm mỹ trong cả trường hợp vẩu 2 hàm và đặc biệt ở trường hợp nhô xương hàm dưới.

Bệnh nhân nam ban đầu có hàm dưới lệch phải, khớp cắn hở nhiều. Sau mổ, mặt bệnh nhân đã cân đối, khớp cắn được cải thiện, các răng cắn khít tốt, bệnh nhân ăn nhai được tốt hơn.

Ở trường hợp bệnh nhân nữ, mặc dù sau mổ vẫn còn khe thừa giữa răng nanh và răng hàm nhỏ nhưng chức năng ăn nhai của bệnh nhân vẫn tốt, khớp cắn vùng răng sau và vùng răng cửa chạm khít, có hướng dẫn răng nanh và răng cửa. Khe thừa giữa răng nanh và răng hàm nhỏ sẽ được đóng kín nhờ chỉnh nha sau mổ. Bệnh nhân hài lòng với kết quả thẩm mỹ khuôn mặt ngay sau phẫu thuật.

Kết luận

Mặc dù điều trị sai lệch xương hàm mặt theo phương pháp thường quy là phương pháp điều trị tốt, độ tin cậy cao, tuy nhiên thời gian điều trị thường kéo dài, đặc biệt là giai đoạn chỉnh nha trước phẫu thuật thường khiến bệnh nhân mệt mỏi, chán nản. Trong những trường hợp cụ thể, nếu đáp ứng được các tiêu chuẩn, chỉ định của phẫu thuật không chỉnh nha trước mổ thì đây cũng là một phương pháp điều trị tốt, rút ngắn thời gian điều trị cho bệnh nhân, cải thiện ngay thẩm mỹ và có thể cả chức năng ăn nhai cho bệnh nhân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E.J. Liou, P.H. Chen, Y.C. Wang, C.C. Yu, C.S. Huang, Y.R. Chen (2011), “Surgery-first accelerated orthognathic surgery: orthodontic guidelines and setup for model surgery”, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **69**, pp.771-780.
- [2] Vipul Kumar Sharma, Kirti Yadav, and Pradeep Tandon (2015), “An overview of surgery-first approach: recent advances in orthognathic surgery”, *J. Orthod. Sci.*, **4**(1), pp.9-12.
- [3] Y.F. Liao, Y.T. Chiu, C.S. Huang, E.W. Ko, Y.R. Chen (2010), “Presurgical orthodontics versus no presurgical orthodontics: treatment outcome of surgical-orthodontic correction for skeletal class III open bite”, *Plast. Reconstr. Surg.*, **126**, pp.2074-2083.
- [4] W.R. Proffit, R.P. White, D.M. Sarver (2003), “Combining surgery and orthognathics: who does what, when?”, *Contemporary Treatment of Dentofacial Deformity*, pp.245-267.
- [5] J.D. Jacobs, P.M. Sinclair (1983), “Principles of orthodontic mechanics in orthognathic surgery cases”, *Am. J. Orthod.*, **84**, pp.399-407.
- [6] P.A. Dowling, L. Espeland, O. Krogstad, A. Stenvik, A. Kelly (1999), “Duration of orthodontic treatment involving orthognathic surgery”, *Int. J. Adult Orthodon. Orthognath. Surg.*, **14**, pp.146-152.
- [7] F. Luther, D.O. Morris, C. Hart (2003), “Orthodontic preparation for orthognathic surgery: how long does it take and why? a retrospective study”, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **41**, pp.401-406.
- [8] F. Luther (2007), “Orthodontic treatment following orthodonticsurgery: how long does it take and why? a retrospective study”, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **65**, pp.1969-1976.
- [9] C. Villegas, F. Uribe, J. Sugawara, R. Nanda (2010), “Expedited correction of significant dentofacial asymmetry using a ‘surgery first’ approach”, *J. Clin. Orthod.*, **44**, pp.97-103.
- [10] H. Nagasaka, J. Sugawara, H. Kawamura, R. Nanda (2009), “Surgery first skeletal class III correction using the Skeletal Anchorage System”, *J. Clin. Orthod.*, **43**, pp.97-105.
- [11] K.R. Park, S.Y. Kim, H.S. Park, Y.S. Jung (2013), “Surgery-first approach on patients with temporomandibular joint disease by intraoral vertical ramus osteotomy”, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, **116**, pp.e429-436.

Ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR phát hiện mất đoạn AZF ở bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng

Lương Thị Lan Anh*, Hoàng Thu Lan

Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 9/10/2018; ngày chuyển phản biện 12/10/2018; ngày nhận phản biện 15/11/2018; ngày chấp nhận đăng 19/11/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu này ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR phát hiện mất đoạn AZF ở 30 bệnh nhân nam vô sinh không có tinh trùng. 30 mẫu máu ngoại vi được chiết tách ADN, kỹ thuật Real-time PCR sử dụng 21 trình tự đích để phát hiện mất đoạn nhỏ thuộc vùng AZFabcd, bao gồm 6 cặp mỗi vùng AZFa (sY84, sY86, sY82, sY1064, sY1065, sY88), 6 cặp mỗi vùng AZFb/d (sY127, sY134, sY105, sY121, sY143, sY153), 7 cặp mỗi vùng AZFc (sY254, sY255, sY1191, sY1192, sY1196, sY1291, sY160) và 2 nội kiểm ZFY/X, SRY. Kết quả phân tích có đối chứng với kỹ thuật multiplex PCR phát hiện 8 vị trí cơ bản (sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, sY153, PB2) và điện di mao quản (xác định AZF mở rộng - 10 trình tự mở rộng): 4 cặp mỗi vùng AZFa (sY82, sY83, sY88, sY1065), 3 cặp mỗi vùng AZFb (sY105, sY121, sY1192), 3 cặp mỗi vùng AZFc (sY1191, sY1291, sY160) và 2 nội kiểm ZFY/X, SRY. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 40% (12/30) các trường hợp mất đoạn nhỏ trên nhiễm sắc thể (NST) Y ở các bệnh nhân nam không có tinh trùng. Mất đoạn vùng AZF cơ bản có 2/12 bệnh nhân (16,7%), mất đoạn vùng AZF mở rộng có 10/12 bệnh nhân (83,3%). Mất đoạn vùng cơ bản có kèm theo các vị trí mở rộng (sY1192, sY1191, sY1291, sY160). Tại các vị trí mở rộng, chủ yếu gặp các mất đoạn sY1291, sY1191 (AZFc) và sY1192 (AZFb).

Từ khóa: AZF, Real-time PCR.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Năm 1976, Tiepolo và Zuffardi nghiên cứu 1.170 nam giới vô sinh bằng việc phân tích băng NST đã phát hiện 6 người có mất đoạn ở vị trí Yq11 và tác giả đã đưa ra khái niệm về đoạn AZF trên NST Y có liên quan tới sản sinh tinh trùng [1]. Tuy nhiên, tại thời điểm đó chưa xác định được các locus của đoạn AZF và các nghiên cứu còn khá hạn chế. Năm 1992, Vollrath và cs lần đầu tiên dùng kỹ thuật PCR xác định được 132 vị trí trình tự đích (STSs) trên NST Y [2]. Năm 1996, Voght và cs đã sử dụng 76 trình tự mỗi (STSs) trên một số lượng lớn bệnh nhân nam vô sinh, kết quả nghiên cứu này cho thấy vùng AZF gồm 3 đoạn: AZFa, b, c [3]. Mất đoạn nhỏ xảy ra ở 3 vùng AZFabc thường dẫn đến những rối loạn trong quá trình sinh tinh nhưng ở các mức độ khác nhau [4]. Có gần 100 trình tự STS (Short Tandem Sequence) thuộc các vùng AZFabc. Theo các tác giả, ở những nam giới không có tinh trùng, tỷ lệ mất đoạn nhỏ trên NST Y cao hơn so với những người ít tinh trùng và tỷ lệ này khác nhau ở từng nghiên cứu, từng vùng. Tại các vùng AZFabc, các trình tự đang được nghiên cứu và thống kê nhiều nhất là sY84 và sY86 thuộc vùng AZFa; sY127 và sY134 thuộc vùng AZFb; sY254 và sY255 thuộc

vùng AZFc. Các trình tự này đại diện chính cho các vùng AZFabc, khi mất đoạn tại các trình tự trên sẽ được coi là mất đoạn hoàn toàn các vùng AZFabc, ảnh hưởng đến chức năng sản xuất tinh trùng [4]. Tuy nhiên, ngoài các trình tự chính thuộc các vùng AZFabc, các trình tự mở rộng chưa được thống kê nhiều. Năm 2013, Viện Nghiên cứu chất lượng di truyền học phân tử châu Âu (EMQN) đã khuyến cáo phân tích thêm các trình tự mở rộng ngoài các trình tự cơ bản thuộc vùng AZFabc, như mở rộng AZFa: sY82, sY83, sY85, sY87, sY88, sY1065; mở rộng AZFb: sY105, sY121, sY143, sY1192, sY1224, sY153; mở rộng AZFc: sY149, sY157, sY158, sY160, sY1035, sY1191, sY1291... Trong đó, các trình tự mở rộng được lưu ý nhiều tại các vùng AZFa là sY83, sY88, sY1065; vùng AZFb là sY105, sY121, sY1192; AZFc là sY1191, sY1291. Hiện nay đã có một số bộ kit thương mại được ứng dụng để phát hiện các mất đoạn AZF mở rộng, tuy nhiên phần lớn các bộ kit chưa được phổ biến rộng rãi tại Việt Nam như “Y Chromosome AZF Analysis System” (17 trình tự) của hãng Promega, “Y Microdeletion Real-time PCR kit” (15 trình tự) của hãng SNP Biotechnology, “Devyser AZF v2” phát hiện mất đoạn vùng AZFabc cơ bản và “Devyser AZF Extension” của hãng Devyser phát hiện mất đoạn vùng AZFabc mở rộng. Bộ kit

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

Application of Real-time PCR technique to detect AZF microdeletions in infertile men without sperm

Thi Lan Anh Luong*, Thu Lan Hoang

Hanoi Medical University

Received 9 October 2018; accepted 19 November 2018

Abstract:

Application of Real-time PCR technique to detect AZF microdeletions in 30 infertile men without sperm. Method: 30 peripheral blood samples were extracted with DNA, Real-time PCR technique using 21 target sequences to detect microdeletions of AZFabcd, including 6 primer pairs of AZFa (sY84, sY86, sY82, sY1064, sY1065, sY88), 6 primer pairs of AZFb/d (sY127, sY134, sY105, sY121, sY143, sY153), 7 primer pairs of AZFc (sY254, sY255, sY1191, sY1192, sY1196, sY1291, sY160), and two internal STSs ZFY/X, SRY. The results of the control analysis by the multiplex PCR technique revealed 8 basic STSs (sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, sY153, PB2), and the capillary electrophoresis with AZF expansion (10 extended STSs) exhibited 4 primer pairs of AZFa (sY82, sY83, sY88, sY1065), 3 primer pairs of AZFb (sY105, sY121, sY1192), 3 primer pairs of AZFc (sY1191, sY1291, sY160), and two internal STSs ZFY/X and SRY. These techniques were used for diagnosis. Results and conclusions: there were 40% (12/30) of patients with microdeletions in the AZF, basic microdeletions and extension microdeletions were 16.7% and 83.3%, respectively. In extension locations, the major microdeletions were sY1291, sY1191 (AZFc) and sY1192 (AZ Fb).

Keywords: AZF, Real-time PCR.

Classification number: 3.2

“Devysier AZF v2” và “Devysier AZF Extension” đang được sử dụng tại Việt Nam. Tại Phòng Di truyền phân tử, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội đã xây dựng và hoàn thiện quy trình Real-time PCR phát hiện mất đoạn vùng AZF cơ bản và mở rộng. Quy trình kỹ thuật này đã được so sánh với kỹ thuật multiplex PCR đang được sử dụng và kit “Devysier AZF v2” cũng như kit “Devysier AZF Extension” của hãng Devyser. Kết quả cho thấy có độ tương hợp hoàn toàn với các phương pháp đang được sử dụng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xác định tỷ lệ mất đoạn nhỏ trên NST Y bằng kỹ thuật Real-time PCR ở nam giới không có tinh trùng.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu

30 bệnh nhân nam giới bị vô sinh I (trong vòng 12 tháng không dùng các biện pháp tránh thai nhưng không có con), xét nghiệm tinh dịch đồ không có tinh trùng (xét nghiệm 2 lần, cách nhau ít nhất 1 tuần và xa nhất dưới 3 tháng, kiêng giao hợp trước khi làm xét nghiệm 3-5 ngày). Mỗi bệnh nhân được lấy 2 ml máu lympho ngoại vi, chống đông EDTA.

Quy trình nghiên cứu

i) Xét nghiệm tinh dịch đồ, phát hiện vô sinh không có tinh trùng, chọn đối tượng nghiên cứu.

ii) Chiết tách ADN từ máu ngoại vi.

iii) Ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR phát hiện mất đoạn nhỏ trên NST Y tại vùng AZF cơ bản và mở rộng:

- Kỹ thuật sử dụng: Real-time PCR với bộ mồi thiết kế cho xét nghiệm phát hiện 21 trình tự, chia thành 6 bộ phản ứng multiplex PCR. Bộ mồi bao gồm 6 cặp mồi vùng AZFa (sY84, sY86, sY82, sY1064, sY1065, sY88), 6 cặp mồi vùng AZFb/d (sY127, sY134, sY105, sY121, sY143, sY153), 7 cặp mồi vùng AZFc (sY254, sY255, sY1191, sY1192, sY1196, sY1291, sY160) và 2 nội kiểm ZFY/X, SRY.

- Thực hiện phản ứng Real-time PCR trên máy ABI 7500 Real-time PCR System, với cùng 1 chu trình luân nhiệt cho 2 phản ứng multiplex PCR: 95°C/2 phút; [95°C/15 giây; 60°C/60 giây; 72°C/60 giây] x 40; 4°C.

- Trong mỗi phản ứng PCR, có sử dụng ADN của người nam giới bình thường làm chứng dương, ADN của người nữ giới bình thường là chứng âm và một chứng âm là nước cất để kiểm tra nhiễm chéo.

- Phiên giải kết quả Real-time PCR.

Kết quả được phân tích thông qua đường biểu diễn huỳnh quang (sản phẩm PCR) và chu kỳ ngưỡng (Ct). Nếu đường biểu diễn cắt chu kỳ ngưỡng dưới 38 (Ct<38): không

mất đoạn gen vùng AZF; lớn hơn hoặc bằng ($C_t \geq 38$) hoặc dưới ngưỡng phát hiện: mất đoạn gen vùng AZF.

iv) Đối chiếu kết quả xét nghiệm bằng kỹ thuật Real-time PCR với kỹ thuật điện di agarose (xác định mất đoạn AZF cơ bản - 8 trình tự của vùng AZFabc: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, sY153, PB2) và điện di mao quản (xác định AZF mở rộng - 10 trình tự mở rộng): 4 cặp mỗi vùng AZFa (sY82, sY83, sY88, sY1065), 3 cặp mỗi vùng AZFb (sY105, sY121, sY1192), 3 cặp mỗi vùng AZFc (sY1191, sY1291, sY160) và 2 nội kiểm ZFY/X, SRY.

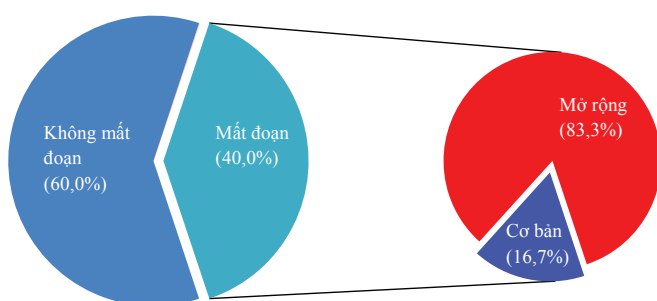
Đạo đức của nghiên cứu

Có cam kết, thỏa thuận với bệnh nhân; đối tượng nghiên cứu được thông báo rõ về mục đích nghiên cứu; giữ kín bí mật khi cung cấp thông tin và được phản hồi kết quả nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu

Tỷ lệ nam giới vô sinh không có tinh trùng bị mất đoạn AZF

Thống kê 30 bệnh nhân nam không có tinh trùng thuộc nhóm đối tượng nghiên cứu, có 12/30 (40,0%) trường hợp bị mất đoạn AZF bao gồm cả vùng cơ bản và mở rộng, 18/30 (60,0%) không phát hiện mất đoạn AZF. Trong số 12 bệnh nhân mất đoạn AZF trên tổng số 30 đối tượng nghiên cứu, chỉ có 2/12 (16,7%) trường hợp mất đoạn AZFb và c hoàn toàn, có 10/12 (83,3%) trường hợp chỉ mất đoạn vùng mở rộng của hoặc AZFb hoặc AZFc (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1. Tỷ lệ nam giới vô sinh bị mất đoạn AZF.

So sánh kết quả Real-time PCR với kết quả multiplex PCR và điện di mao quản sản phẩm PCR trên máy giải trình tự sequencing

Kết quả so sánh phát hiện đột biến mất đoạn gen vùng AZF ở 30 bệnh nhân bằng kỹ thuật Real-time PCR với kết quả multiplex PCR và kỹ thuật QF-PCR sử dụng bộ kit Devyser được thể hiện ở bảng 1.

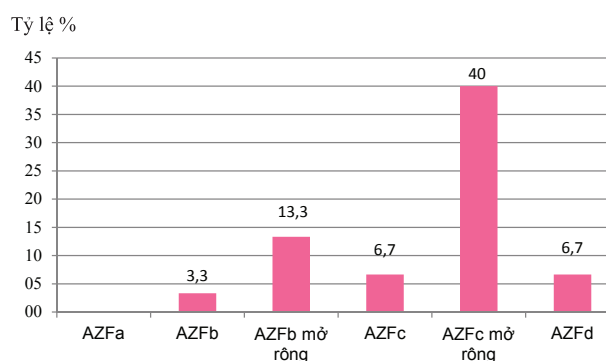
Bảng 1. Sự phù hợp giữa kết quả Real-time PCR với kết quả multiplex PCR và kết quả kỹ thuật QF-PCR sử dụng bộ kit Devyser.

Mẫu	Kết quả mất đoạn AZF	Kết quả multiplex PCR	Kết quả QF-PCR	Kết quả Real-time PCR
18 mẫu	Không đột biến mất đoạn	✓	✓	✓
1844	sY254, sY255, sY153, sY1291	✓	✓	✓
1850	sY127, sY134, sY1192, sY1191, sY1291, sY160, sY153	✓	✓	✓
6 mẫu	sY1291	-	✓	✓
3 mẫu	sY1192, sY1191	-	✓	✓
1886	sY1291, sY1191	-	✓	✓

Ghi chú: ✓: sự phù hợp giữa các phương pháp; -: mất đoạn vùng AZF mở rộng (sY1191 và sY1291) chỉ thực hiện so sánh với kỹ thuật QF-PCR, không thực hiện trên kỹ thuật multiplex PCR nên không so sánh sự phù hợp.

Kết quả phân tích mất đoạn AZF bằng kỹ thuật Real-time PCR được đối chiếu với kỹ thuật điện di agarose (xác định mất đoạn AZF cơ bản - 8 trình tự của vùng AZFabc: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, sY153, PB2) và điện di mao quản (xác định AZF mở rộng - 10 trình tự mở rộng) cho thấy, 4 cặp mỗi vùng AZFa (sY82, sY83, sY88, sY1065), 3 cặp mỗi vùng AZFb (sY105, sY121, sY1192), 3 cặp mỗi vùng AZFc (sY1191, sY1291, sY160) và 2 nội kiểm ZFY/X, SRY có tỷ lệ phù hợp là 100%.

Tỷ lệ mất đoạn theo vùng AZFabc



Biểu đồ 2. Phân bố mất đoạn vùng AZF.

Không phát hiện các trường hợp mất đoạn AZFa, có 1/30 (3,3%) bệnh nhân mất đoạn vùng AZFb cơ bản (sY127, sY134), 2/30 (6,7%) bệnh nhân mất đoạn vùng AZFc cơ bản (sY254, sY255), 4/30 (13,3%) bệnh nhân mất đoạn vùng AZFb mở rộng (sY1192), 12/30 (40,0%) bệnh nhân mất đoạn vùng AZFc mở rộng (sY160, sY1191, sY1291), 2/30 (6,7%) bệnh nhân mất đoạn vùng AZFd (sY153 và PB2) (biểu đồ 2).

Phân bố mất đoạn AZF cơ bản và mở rộng

Tần suất vị trí mất đoạn AZFabcd: kết quả bảng 2 cho thấy, có 1 vị trí mở rộng của vùng AZFb (sY1192) và 3 vị trí mở rộng của AZFc (sY1191, sY1291, sY160) được khảo sát có mất đoạn. Trong đó, vị trí bị mất đoạn nhiều nhất là vùng mở rộng của AZFc: sY1291 (37,5%) và sY1191 (20,7%), tiếp theo là vị trí sY1192 của vùng mở rộng AZFb (16,6%), mất đoạn sY160 của AZFc chỉ xuất hiện ở 1 bệnh nhân (4,2%).

Bảng 2. Tần suất vị trí mất đoạn AZFabcd.

Vùng	Vị trí sY	Số lượng	Tỷ lệ (%)
AZFfa	0	0	0
AZFb	127, 134	1	4,2
	1192	4	16,6
AZFc	254, 255	2	8,4
	1191	5	20,7
	1291	9	37,5
	160	1	4,2
AZFd	153, BPY2	2	8,4
Tổng số	9	24	100

Phân bố kiểu phối hợp các vị trí mất đoạn của vùng AZF: trong số 12 bệnh nhân nam giới vô sinh bị mất đoạn vùng AZF, có tới 6 bệnh nhân (50%) chỉ có mất đoạn tại vị trí sY1291 thuộc vùng mở rộng AZFc; 3 bệnh nhân mất đoạn đồng thời 2 vị trí sY1192 (AZFb) và sY1191 (AZFc); 1 trường hợp mất đoạn AZFbc hoàn toàn, kèm theo các vị trí mở rộng của AZFb - sY1192 và 3 vị trí mở rộng của AZFc - 1191, 1291 và sY160; 1 trường hợp mất đoạn AZFcd kèm theo vị trí mở rộng của AZFc (sY1291); 1 trường hợp mất đoạn đồng thời 2 vị trí mở rộng của AZFc (sY 1191, sY1291) (bảng 3).

Bảng 3. Phân bố kiểu phối hợp vị trí mất đoạn AZF.

Vùng	Vị trí sY phối hợp	Số lượng bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
AZFb	127, 134, 1192	1	8,3
AZFc	1191, 1291, 160		
AZFd	153, BPY2		
AZFc	254, 255, 1291	1	8,3
AZFd	153, BPY2		
AZFb, AZFc	1192, 1191	3	25
AZFc	1191, 1291	1	8,3
AZFc	1291	6	50
Tổng số		12	100

Bàn luận

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR để phát hiện các đột biến mất đoạn nhỏ tại vùng AZFabcd của nam giới bị vô sinh do không có tinh trùng. Kỹ thuật Real-time PCR được hoàn chỉnh và đưa vào ứng dụng với độ nhạy và đặc hiệu là 100%, đạt độ tin cậy khi so sánh có sự tương đồng kết quả với kỹ thuật xét nghiệm thường quy multiplex PCR, điện di agarose phát hiện mất đoạn nhỏ AZF cơ bản và QF-PCR, điện di mao quản sử dụng bộ kit Devyser phát hiện AZF mở rộng. Lần đầu tiên, chúng tôi thống kê tỷ lệ mất đoạn nhỏ trên NST Y có sự khác biệt với các nghiên cứu trước đây của Lương Thị Lan Anh và cs, tỷ lệ mất đoạn nhỏ trên NST Y của nam giới vô tinh và thiểu tinh xấp xỉ 10% [5]. Trong thống kê này, tỷ lệ mất đoạn nhỏ trên NST Y cao và lên tới 40% trong số những bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng. Sở dĩ có hiện tượng này là vị trí trình tự tại các vùng AZF đã được mở rộng so với các nghiên cứu trước đây của tác giả [5, 6]. Các bệnh nhân trước đây chỉ được phát hiện mất đoạn nhỏ tại vùng AZF cơ bản (8 trình tự của vùng AZFabcd: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, sY153, PB2), nghiên cứu này đã mở rộng thêm 13 vị trí của vùng AZFabcd (4 vị trí thuộc vùng AZFa - sY82, sY1064, sY1065, sY88; 3 vị trí thuộc vùng AZFb - sY105, sY121, sY143; 6 vị trí thuộc vùng AZFc - sY1191, sY1192, sY1196, sY1291, sY160, sY116). Nếu tính riêng mất đoạn AZF vùng cơ bản thì chỉ có 2/30 bệnh nhân (chiếm 6,7%), khi mở rộng các vị trí trình tự của các đoạn trên vùng AZF của NST Y, con số này lên tới 40%. Trong số 40% các trường hợp mất đoạn nhỏ trên NST Y, mất đoạn nhỏ vùng cơ bản AZF chỉ chiếm 16,7%, còn lại chỉ mất đoạn vùng AZF mở rộng chiếm phần lớn (83,3%). Trong báo cáo của hội đồng lâm sàng thuộc Hiệp hội sinh sản và bệnh viện sinh sản di truyền (Mỹ), khi phân tích mở rộng vị trí mất đoạn ở nam giới vô sinh, tỷ lệ mất đoạn nhỏ trên NST Y tăng 22-24%. Các vị trí mở rộng được phát hiện thấy là sY1191, sY1291, sY1189 [7, 8].

Theo khuyến cáo của Hội nam học châu Âu (2013) [4], đối với 1 bệnh nhân nam vô sinh không có tinh trùng, việc phân tích mất đoạn nhỏ trên NST Y cần được tiến hành tuần tự, trước hết phân tích vùng AZF cơ bản cho bệnh nhân, nếu không phát hiện mất đoạn AZFabc có thể dừng lại. Nếu như phát hiện 1 trong các vị trí của AZFa/b/c cần được tiến hành phân tích đơn mỗi (trong trường hợp phân tích bằng kỹ thuật multiplex PCR) hoặc thực hiện tiếp với các vị trí mở rộng (nếu sử dụng kỹ thuật QF-PCR, điện di mao quản). Theo lý thuyết các vị trí tại vùng cơ bản AZFabcd đã đại diện cho vùng, nếu mất đoạn tại các vị trí đó có thể khẳng định mất đoạn vùng. Trong trường hợp này, chúng tôi chỉ phát hiện được 2/30 bệnh nhân có mất đoạn AZFbcd cơ bản, có tới 10/30 bệnh nhân chỉ mất đoạn tại các vùng mở rộng của AZFb hoặc AZFc.

Vùng AZFc mở rộng được phát hiện nhiều nhất (chiếm tỷ lệ 40% các trường hợp), trong đó vị trí mở rộng được phát hiện mất đoạn nhiều nhất là sY1291 thuộc vùng AZFc, chỉ mất riêng đoạn sY1291 đã chiếm tới 50% số bệnh nhân bị mất đoạn (6/12) và tần suất chung (bao gồm đơn độc và phối hợp với các mất đoạn khác) là 37,5% (9/24) trong tổng số các đoạn bị mất. Tiếp đến là tần suất mất đoạn sY1191 (AZFc) 20,7% và 1192 (AZFb) 16,6%.

Hai trường hợp mất đoạn AZF cơ bản (AZFbcd, AZFcd), các đoạn bị mất cho thấy phù hợp là các vị trí đại diện cho vùng như sY127, sY134 (AZFb), sY254, sY255 (AZFc), sY153, PB2 (AZFd), đồng thời kèm theo mất đoạn tại các vị trí mở rộng. Trường hợp mất đoạn AZFbcd, vị trí mở rộng bị mất thêm là sY1192 (AZFb), sY1191, sY1291, sY160 (AZFc). Trường hợp mất đoạn vùng AZFcd, vị trí mở rộng bị mất thêm là sY1291 (AZFc).

Với số lượng 30 bệnh nhân, nghiên cứu bước đầu phát hiện những đặc điểm đáng ghi nhận khi phân tích mất đoạn nhỏ trên vùng AZF của NST Y. Chúng tôi sẽ tiếp tục ứng dụng kỹ thuật phân tích mở rộng này trên số lượng lớn bệnh nhân để đưa ra được bức tranh tổng quan về tình trạng mất đoạn AZF ở các bệnh nhân nam vô sinh nói chung và các bệnh nhân nam vô sinh không có tinh trùng, đặc biệt mối liên quan giữa các vị trí AZF mở rộng với vô sinh nam.

Kỹ thuật Real-time PCR cùng với những tiện ích của kỹ thuật này có thể đưa vào ứng dụng để phát hiện các trường hợp mất đoạn nhỏ trên NST Y cho các đối tượng bệnh nhân được chỉ định.

Kết luận

Ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR đã phát hiện được 40% (12/30) các trường hợp mất đoạn nhỏ trên NST Y ở các bệnh nhân nam không có tinh trùng. Nếu chỉ mất đoạn tại vùng AZF cơ bản có 2/12 bệnh nhân (16,7%), mất đoạn vùng AZF mở rộng có 10/12 bệnh nhân (83,3%).

Mất đoạn vùng cơ bản có kèm theo các vị trí mở rộng

(sY1192, sY1191, sY1291, sY160). Tại các vị trí mở rộng, chủ yếu gặp các mất đoạn sY1291, sY1191 (AZFc) và sY1192 (AZFb).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hoàn thành với sự giúp đỡ của các đồng nghiệp của Bộ môn Y sinh học - di truyền, Trung tâm Tư vấn di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, Trường Đại học Y Hà Nội. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Tiepolo, O. Zuffardi (1976), "Localization of factor controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm", *Hum. Genet.*, **34**(2), pp.119-124.
- [2] D. Vollrath, et al. (1992), "The human Y chromosome: A 43- interval map based on naturally occurring deletions", *Science*, **258**(5079), pp.52-59.
- [3] P.H. Voght (1996), "Human Y chromosome function in male germ cell development", *Advances in Developmental Biology*, **1**(4), pp.141-157.
- [4] C. Krausz, et al. (2013), "EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013", *Andrology*, **2**(1), pp.5-14.
- [5] Lương Thị Lan Anh và cs (2013), "Phát hiện mất đoạn AZFbcd trên NST Y ở những bệnh nhân vô tinh và thiếu tinh bằng kỹ thuật Multiplex PCR", *Tạp chí Y học Việt Nam*, **411**(1), tr.29-33.
- [6] Li hua LU, et al. (2013), "Investigation on Azoospermia Factor (AZF) Microdeletion and Sex-determining Region Y (SRY) of the Y Chromosome in Male Infertility", *Journal of Reproduction and Contraception*, **24**(2), pp.88-94.
- [7] Practice Committee, American Society for Reproductive Medicine (2018), "Evaluation of the azoospermic male: a committee opinion Azoospermia factor microdeletion in infertile men with idiopathic severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia", *Fertility and Sterility*, **109**(5), pp.777-782.
- [8] Reproductive & Genetic Hospital (2018), *Detection of Microdeletions in the Azoospermia Factor (AZF) Regions in Infertile Male Patients*, US National Library of Medicine.

Xây dựng công thức nhũ tương xịt họng chứa eucalyptol

Lê Thị Ngọc Lan¹, Đỗ Thị Hồng Tươi², Phạm Đình Duy^{1*}

¹Bộ môn Bào chế, Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

²Bộ môn Dược lý, Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 30/10/2018; ngày chuyển phản biện 14/11/2018; ngày nhận phản biện 4/1/2019; ngày chấp nhận đăng 14/1/2019

Tóm tắt:

Bào chế nhũ tương xịt họng chứa eucalyptol nhằm phòng ngừa, hỗ trợ điều trị bệnh viêm họng và các bệnh liên quan đường hô hấp trên. Phương pháp nghiên cứu: thiết kế mô hình thực nghiệm I-Optimal bằng phần mềm Design-Expert 8.0.6 gồm 21 công thức với các biến số độc lập là tỷ lệ eucalyptol (%), cremophor RH40 (%), ethanol (%), poloxamer 407 (%) và các biến số phụ thuộc là mức độ tách lớp của nhũ tương và đường kính trung bình chùm phun. Dựa vào phân tích phương sai các biến phụ thuộc và sự ảnh hưởng của các biến độc lập lên biến phụ thuộc mà phần mềm đưa ra các công thức tối ưu với các mức độ mong muốn khác nhau. Các công thức tối ưu được đánh giá hoạt tính kháng viêm và các tiêu chí chất lượng như cảm quan, pH, tỷ trọng, hình dạng phun, độ đồng đều khối lượng phun, định tính hợp chất eucalyptol. Kết quả cho thấy, Design-Expert đã đề xuất 2 công thức tối ưu có chỉ số mong muốn cao nhất với nồng độ 5 và 8% eucalyptol. Quá trình khảo sát đã cho thấy 2 công thức đều cho khả năng kháng viêm tốt khi so sánh với thuốc đối chiếu. Sản phẩm hoàn tất là vi nhũ tương trong mờ, có mùi thơm, vị ngọt nhẹ và hơi đắng; pH 4,5-6,5; tỷ trọng 0,98-1,01, hình dạng phun tròn hay gần tròn đường kính 6,63-9,2 cm; đạt độ đồng đều khối lượng phun; trên sắc ký lớp mỏng (SKLM) có xuất hiện màu từ xanh đến đỏ tím của eucalyptol. Kết luận: hai công thức tối ưu của nhũ tương xịt họng chứa eucalyptol cho tác dụng kháng viêm tốt và được khảo sát các tiêu chí chất lượng làm cơ sở cho việc xây dựng tiêu chuẩn chất lượng của sản phẩm sau này.

Từ khóa: eucalyptol, kháng viêm, thuốc xịt họng.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Viêm họng là một bệnh lý mang tính phổ biến, thường gặp ở mọi lứa tuổi. Nguyên nhân gây bệnh chủ yếu là virus, vi khuẩn và nấm [1]. Trong hầu hết các trường hợp, viêm họng có thể tự khỏi mà không cần điều trị, nhưng triệu chứng thường khó chịu nên việc sử dụng các liệu pháp điều trị để giảm nhẹ là điều tất yếu. Trong đó, liệu pháp điều trị tại chỗ không những cho hiệu quả cao do tác động trực tiếp lên vùng viêm, mà còn hạn chế các tác động có hại khi sử dụng các loại thuốc toàn thân, do đó liệu pháp này ngày càng phổ biến rộng rãi [2].

Với đặc tính kháng khuẩn, kháng virus và kháng viêm mạnh, tinh dầu khuynh diệp mà thành phần chính là eucalyptol từ lâu đã được sử dụng trong điều trị các bệnh đường hô hấp trên và được sử dụng phổ biến ở các dạng thuốc như viên nang mềm, kẹo ngậm, ống hít... Hiện nay, việc nghiên cứu dạng xịt khí dung trực tiếp vào cổ họng đang được quan tâm phát triển do có nhiều ưu điểm nổi trội, như đưa thuốc trực tiếp đến vị trí tác động, tác dụng tại chỗ,

dễ sử dụng và không bị chuyển hóa qua gan [3]. Vì vậy, việc nghiên cứu chế phẩm xịt họng chứa eucalyptol được thực hiện nhằm làm phong phú và đáp ứng nhu cầu về các sản phẩm nguồn gốc từ dược liệu trong phòng ngừa và điều trị các bệnh đường hô hấp trên.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Eucalyptol 99% (Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất. Các tá dược khác: cremophor RH40 (Đức), poloxamer 407 (Đức), ethanol (Việt Nam), aspartam (Trung Quốc), sorbitol (Trung Quốc), natri benzoat (Trung Quốc). Thuốc đối chiếu: khí dung xịt họng Anginovag. Phần mềm Design-Expert phiên bản 8.0.6 (Mỹ).

Phương pháp

Khảo sát tỷ lệ hỗn hợp chất nhũ hóa: thăm dò tỷ lệ hỗn hợp chất nhũ hóa cremophor RH40 và ethanol (S_{mix}): cố định lượng hỗn hợp chất nhũ hóa là 20%, tiến hành khảo sát

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

Formulation of throat spray emulsion containing eucalyptol

Thi Ngọc Lan Lê¹, Thi Hồng Tuoi Do², Dinh Duy Pham^{1*}

¹Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy,
University of Medicine and Pharmacy in Ho Chi Minh City

²Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy,
University of Medicine and Pharmacy in Ho Chi Minh City

Received 30 October 2018; accepted 14 January 2019

Abstract:

The aim is formulation of throat spray emulsion containing eucalyptol which prevents and supports the treatment of pharyngitis and diseases related to upper respiratory tract infection. Methodology: an I-Optimal Experimental Model was designed by Design-Expert software v.8.0.6 including 21 formulas. Independent variables were percentage of eucalyptol (%), cremophor RH40 (%), ethanol (%), and poloxamer 407 (%). Dependent variables were levels of separating emulsion and average diameter of spray pattern. Based on ANOVA results and the influence of independent variables on dependent variables, Design-Expert software offered optimal formulas with different desirabilities. Final formulas were evaluated in vivo anti-inflammatory activity and such criteria as: perception, pH, density, spray pattern, delivered-dose uniformity, and determination of eucalyptol compound. The results were as follows: an experimental model with 21 formulas was established. Through the analysis of experimental data, Design-Expert software proposed optimal formulas with different desirabilities. The highest desirability formulas with 5 and 8% eucalyptol were selected; the anti-inflammatory activity was good when compared with other products on the market. The finished product was translucent, fragrant, lightly sweet and bitter; pH ranged between 4.5 and 6.5; density ranged from 0.98 to 1.01; spray pattern was round or almost round with the diameter of 6.8-9.2 cm; delivered-dose uniformity target was satisfied; and there was the appearance of blue to purplish red of eucalyptol on the chromatogram. In Conclusion, the two optimal formulas of eucalyptol throat spray emulsion met the quality requirements of preparation and also exhibited the anti-inflammatory activities.

Keywords: anti-inflammatory activity, eucalyptol, throat spray.

Classification number: 3.4

tỷ lệ cremophor RH40:ethanol ở các tỷ lệ 1:2, 3:4, 5:6, 1:1, 6:5, 4:3, 2:1. Với hàm lượng eucalyptol được cố định ở tỷ lệ 5% (kl/kl), lượng nước cất còn lại cố định vừa đủ 10 g. Đánh giá hỗn hợp thu được dựa trên độ đục, sự tạo bọt trong quá trình lắc phân tán để đồng nhất mẫu.

Khảo sát tỷ lệ chất ổn định nhũ tương: sau khi chọn được tỷ lệ hỗn hợp chất nhũ hóa phù hợp, cố định S_{mix} ở nồng độ 15% (kl/kl), eucalyptol 5% (kl/kl), tiến hành khảo sát tỷ lệ poloxamer từ 1-10% (kl/kl). Đánh giá hỗn hợp thu được dựa trên quan sát thể chất bằng cảm quan sao cho sản phẩm có độ nhớt thấp, dễ dàng phun thành hạt nhỏ qua vòi phun của bao bì và độ bền sau khi ly tâm 3.000 vòng/phút trong 30 phút.

Quy trình điều chế nhũ tương:

- Điều chế pha nước: chia lượng nước trong công thức làm hai phần. Phần thứ nhất, dùng phân tán poloxamer 407 ở nhiệt độ 0-4°C, ngâm qua đêm ở nhiệt độ 0-4°C để thu dung dịch đồng nhất (A). Phần thứ hai, hòa tan tá dược tạo vị (aspartam, sorbitol) và natri benzoat (B). Sau đó, trộn dung dịch A và B thành pha nước.

- Điều chế pha dầu: hòa tan eucalyptol vào toàn bộ lượng ethanol trong công thức. Thêm cremophor RH40, khuấy đều.

- Phối hợp: phối hợp từ từ pha dầu vào pha nước đang khuấy ở tốc độ 3.200 vòng/phút bằng máy Ultra Turax, khuấy đều đến khi sản phẩm đồng nhất.

Thiết kế và tối ưu hóa công thức nhũ tương xịt họng: mô hình I-Optimal được thiết kế bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 8.0.6, gồm 21 công thức. Bốn biến số độc lập quan trọng ảnh hưởng đến tính chất sản phẩm được thiết lập bao gồm: tỷ lệ eucalyptol (%), tỷ lệ cremophor RH40 (%), tỷ lệ ethanol (%), tỷ lệ poloxamer 407 (%) và lượng nước cất được thay đổi để các công thức vừa đủ 50 g. Những biến số này được khảo sát ở các mức khác nhau và các biến số phụ thuộc gồm mức độ tách lớp sau khi ly tâm (R1), đường kính trung bình chùm phun (R2). Việc lựa chọn công thức tối ưu dựa vào chỉ số mong muốn được gợi ý từ phần mềm Design-Expert, chỉ số này càng cao thì các giá trị dự đoán càng có khả năng sát với giá trị thực tế nhất.

Đánh giá các chỉ tiêu của sản phẩm hoàn tất: vi nhũ tương sau khi điều chế được đóng vào chai xịt họng và đánh giá dựa trên các chỉ tiêu:

- Cảm quan: quan sát bằng mắt thường vi nhũ tương đục mờ, có mùi thơm, hơi đắng.

- pH: được xác định theo Dược điển Việt Nam (ĐDVN)

IV [4]. Các phép đo phải được tiến hành trong cùng điều kiện nhiệt độ khoảng từ 20-25°C. Máy được hiệu chuẩn với các mẫu pH 4, 7 và 9 trước khi sử dụng. Mẫu đo được nhúng ngập điện cực và ghi nhận kết quả. Lặp lại thử nghiệm trên 6 mẫu khác nhau.

- Tỷ trọng tương đối: được xác định bằng picnomet theo ĐVN IV [4]. Cân xác định khối lượng chính xác của picnomet rỗng, khô và sạch. Đổ vào picnomet mẫu thử đã điều chỉnh nhiệt độ thấp hơn 20°C, chú ý không để có bọt khí. Giữ picnomet ở nhiệt độ 20°C trong khoảng 30 phút. Dùng một băng giấy lọc để thấm hết chất lỏng thừa trên vạch mức, làm khô mặt ngoài của picnomet, cân rồi tính khối lượng chất lỏng chứa trong picnomet. Đổ mẫu thử đi, rửa sạch picnomet, làm khô bằng cách tráng ethanol rồi tráng acetone, thổi không khí nén hoặc không khí nóng đuổi hết hơi acetone. Xác định khối lượng nước cất chứa trong picnomet ở nhiệt độ 20°C như làm với mẫu thử. Tỷ số giữa khối lượng mẫu thử và khối lượng nước cất thu được là tỷ trọng cần xác định. Lặp lại thử nghiệm trên 6 mẫu khác nhau.

- Hình dạng phun: được đánh giá dựa trên hướng dẫn của FDA [5]. Phủ bột talc kín và đều mặt có keo dính của tờ giấy vellum khổ A4. Cột định tờ giấy vào một mặt phẳng vuông góc với phương ngang của mặt đất. Xịt bỏ 2-3 lần cho bình xịt ổn định. Đặt bình đựng chế phẩm sao cho miệng vòi phun vuông góc và cách mặt phẳng tờ giấy 7 cm. Dùng tay nhấn vòi xịt mạnh và dứt khoát. Ghi nhận bằng mắt thường hình dạng chùm phun thu nhận được trên bề mặt giấy. Lặp lại thử nghiệm 3 lần trên 3 mẫu thử khác nhau. Việc đánh giá dựa trên hình dạng chùm phun và kích thước chùm phun.

- Độ đồng đều khối lượng phun: thực hiện theo USP 36 [6]. Lặp lại thử nghiệm trên 10 mẫu khác nhau. Mỗi mẫu thử trên 10 đơn vị, mỗi đơn vị 2 liều: 1 liều ngay sau liều đầu tiên và 1 liều tương ứng với liều cuối cùng. Xịt bỏ 2-3 lần đầu cho bình xịt ổn định. Lau sạch thân bình và miệng vòi. Cân khối lượng bình ban đầu (m_0). Xịt một liều mạnh và dứt khoát. Lau sạch thân bình và miệng vòi. Cân khối lượng bình (m_1). Tính $m_1 - m_0$ để được khối lượng của liều ngay sau liều đầu tiên. Tiếp tục xịt bỏ các liều tiếp theo đến khi chỉ còn lại một liều duy nhất so với tổng số liều. Lặp lại các bước trên để tính khối lượng liều tương ứng với liều cuối cùng.

- Định tính hợp chất eucalyptol: định tính eucalyptol trong thành phần bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng theo hướng dẫn ĐVN IV [4].

+ Bản sắc ký: dùng bản silicagel gel G tự tráng hay bản mỏng silicagel F254 tráng sẵn.

+ Dung môi khai triển: (S1) = benzen hay (S2) = benzen - ethyl acetat (9:1).

+ Mẫu thử: lắc 10 ml mẫu thử với 10 ml cloroform trong bình lắc gạn. Gạn lấy dịch cloroform, pha loãng dịch chiết 2 lần bằng cloroform.

+ Mẫu chuẩn: pha loãng 10 lần eucalyptol chuẩn bằng cloroform.

Châm riêng biệt lên bản mỏng 2 μ l mỗi dung dịch trên.

Mẫu có chứa eucalyptol khi trên sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn có vết chính thu được tương đương nhau về màu sắc và R_f .

Đánh giá tính kháng viêm: thử nghiệm được tiến hành theo mô hình gây viêm bằng carrageenan do Winter và cộng sự đề nghị năm 1962 [7].

- Động vật thử nghiệm: chuột nhắt trắng trưởng thành, giống đực, chủng *Swiss albino*, trọng lượng trung bình 20-30 g, được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế Nha Trang. Chuột được giữ trong 2 ngày để quen với môi trường thử nghiệm. Trong suốt quá trình thử nghiệm, chúng được cung cấp đầy đủ thức ăn và nước uống.

- Hóa chất và nguyên liệu thử nghiệm: dung dịch carrageenan 1% được ngâm cho trương nở hoàn toàn trong nước muối sinh lý natri clorid 0,9%, tiến hành trước khi gây viêm khoảng 2 giờ. Chuột đã chọn được phân ngẫu nhiên vào các lô, mỗi lô 10 con. Lô thử: bôi chế phẩm cần khảo sát nồng độ eucalyptol 5% và 8%; lô tá dược: bôi dung dịch tá dược của công thức 5% và 8%; lô đối chiếu: bôi dung dịch xịt họng Anginovag; lô chứng bệnh: không bôi thuốc.

- Tiến hành: xác định thể tích chân chuột trước khi gây viêm (V_0) bằng máy đo thể tích chân chuột Plethymometer. Bôi thuốc lên vùng chân của chuột 3 lần mỗi ngày. Mỗi lần bôi 20 μ l chất thử trong 5 ngày liên tiếp để khảo sát tác dụng phòng ngừa phản ứng viêm của sản phẩm lên độ phù chân chuột. Sau 5 ngày bôi thuốc, tiến hành gây viêm và khảo sát hoạt tính kháng viêm: gây viêm chân chuột bằng cách tiêm vào gan bàn chân trái ở phía sau 0,025 ml dung dịch carrageenan 1%. Chuột sau khi gây viêm được nuôi trong các hộp nhựa có lót mặt cửa để tránh chân chuột bị nhiễm trùng. Tiến hành đo thể tích chân chuột tại các thời điểm 3 giờ, 5 giờ, 7 giờ, 10 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ sau khi tiêm.

Độ sưng phù chân chuột được tính theo công thức:

$$X = \frac{V_n - V_0}{V_0}$$
 Trong đó: X là độ sưng phù chân chuột (%), V_0 là thể tích chân chuột trước khi gây viêm (1/100 ml), V_n là thể

tích chân chuột sau khi gây viêm (1/100 ml).

Hoạt tính kháng viêm được đánh giá dựa vào hiệu quả giảm phù giữa lô thử so với lô tá dược hoặc lô đối chứng so với lô chứng bệnh theo công thức: $Y = \frac{X_1 - X_2}{X_1}$. Trong đó: Y là hiệu quả giảm phù (%), X_1 là độ phù bàn chân chuột của lô chứng bệnh ở thời điểm khảo sát, X_2 là độ phù bàn chân chuột của lô thử hoặc lô đối chiếu ở thời điểm khảo sát.

Dữ liệu được thu thập và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS v20.0. Phân tích kiểm chuẩn Kolomogorow - Smirnow. Các số liệu thuộc phân phối chuẩn, kết quả được biểu diễn dưới dạng $M \pm SEM$, so sánh giá trị trung bình giữa các lô bằng One-way ANOVA. Sự khác biệt giữa các lô có ý nghĩa khi $P < 0,05$.

Kết quả và bàn luận

Kết quả khảo sát chất nhũ hóa và hỗn hợp chất nhũ hóa

Thành phần công thức khảo sát trong thí nghiệm thăm dò tỷ lệ cremophor RH40 và ethanol được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần công thức khảo sát tỷ lệ hỗn hợp chất nhũ hóa.

Thành phần	Tỷ lệ
Eucalyptol	5%
Cremophor RH40:ethanol (tỷ lệ khảo sát)	20%
Nước cất	Vừa đủ

Kết quả thăm dò tỷ lệ cremophor RH40 và ethanol được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thăm dò tỷ lệ cremophor RH40 và ethanol trong công thức.

Mẫu	1	2	3	4	5	6	7
Cremophor RH40:ethanol	1:2	3:4	5:6	1:1	6:5	4:3	2:1
Độ đục	+++	++	++	++	+	+	+
Sự tạo bọt	-	+	+	+	+	++	+++

Số lượng dấu "+" biểu thị độ đục, sự tạo bọt sau quá trình lắc đồng nhất.

Độ đục của mẫu khảo sát giảm dần từ mẫu 1 đến 7, các mẫu càng trong đi kèm với độ nhớt tăng, gây khó khăn trong việc bóp đầu phun tạo chùm tia mịn; tỷ lệ cremophor càng lớn so với ethanol thì sự tạo bọt càng tăng, sẽ ảnh hưởng đến quá trình khuấy khi điều chế. Do đó, tỷ lệ hỗn hợp S_{mix} được chọn dùng trong các khảo sát sau là 1:2.

Kết quả khảo sát nồng độ chất ổn định nhũ tương

Thành phần công thức khảo sát trong thí nghiệm khảo sát chất ổn định được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Thành phần công thức khảo sát tỷ lệ poloxamer 407.

Thành phần	Tỷ lệ
Eucalyptol	5%
Cremophor RH40:ethanol (1:2)	15%
Poloxamer 407	Khảo sát
Nước cất	Vừa đủ

Kết quả đánh giá thể chất được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá thể chất của các dung dịch khảo sát.

Công thức	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% poloxamer 407	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Độ nhớt	+	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++
Độ bền	T	T	B	B	B	B	B	B	B	B

+: nhớt thấp, có thể dễ dàng bóp ra khỏi đầu phun tạo thành hạt mịn; ++: khá nhớt, tạo thành chùm phun hẹp; +++: nhớt, không tạo được chùm phun; T: tách lớp; B: bền.

Nhìn chung khi nồng độ poloxamer 407 tăng lên thì độ bền nhũ tương sau khi ly tâm cũng tăng, tuy nhiên các công thức 6, 7, 8, 9, 10 có độ nhớt tương đối cao, khó xịt tạo chùm phun mịn, gây khó khăn trong quá trình sử dụng. Vì vậy, loại các công thức trên. Do đó, khoảng nồng độ poloxamer 407 được chọn để đưa vào thiết kế thực nghiệm là 1-5%.

Từ đó các thành phần công thức được đề xuất trong bảng 5.

Bảng 5. Các thành phần sử dụng trong công thức.

STT	Thành phần	Tỷ lệ (%)
1	Eucalyptol	1-10
2	Cremophor RH40	2,5-7,5
3	Ethanol	5-15
4	Poloxamer 407	1-10
5	Nước cất	Vừa đủ

Kết quả tối ưu hóa

Dữ liệu khảo sát thực nghiệm mức độ tách lớp sau ly tâm (R1) và đường kính trung bình chùm phun (R2) của các công thức được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Dữ liệu bào chế và kiểm nghiệm các công thức.

Công thức	A	B	C	D	R1	R2
1	1,00	2,50	10,20	2,46	0	8,40
2	6,54	4,44	8,85	5,00	1	6,95
3	1,00	7,50	15,00	1,00	0	8,75
4	4,88	6,75	12,00	2,90	0	7,30
5	6,54	4,44	8,85	5,00	0	7,00
6	10,00	2,50	15,00	5,00	3	7,20
7	10,00	7,50	9,85	1,00	1	8,33
8	1,00	7,50	6,80	5,00	0	5,25
9	9,71	5,00	5,20	3,00	1	9,00
10	2,35	4,97	6,50	3,47	0	7,00
11	10,00	2,50	5,00	1,00	4	11,15
12	4,88	6,75	12,00	2,90	0	7,50
13	10,00	7,50	5,00	5,00	0	6,17
14	1,00	2,50	5,00	5,00	0	6,13
15	5,37	7,50	5,00	2,44	0	8,50
16	1,00	2,50	10,20	2,46	0	8,25
17	10,00	5,10	15,00	2,46	2	7,80
18	5,64	2,50	15,00	1,00	1	9,60
19	1,00	4,88	5,00	1,00	0	9,50
20	8,20	7,50	15,00	5,00	0	6,65
21	1,00	3,50	15,00	5,00	0	5,96

A: nồng độ eucalyptol (%); B: nồng độ cremophor (%); C: nồng độ ethanol (%); D: nồng độ poloxamer 407 (%); R1: mức độ tách lớp sau khi ly tâm; R2: đường kính trung bình chùm phun (cm).

Các điều kiện ràng buộc của các biến số độc lập và phụ thuộc trong quá trình tối ưu hóa được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Điều kiện ràng buộc cho các biến số.

Biến số	Mục tiêu	Khoảng giới hạn
A	Trong khoảng giới hạn	1-10 (%)
B	Trong khoảng giới hạn	2,5-7,5 (%)
C	Trong khoảng giới hạn	5-15 (%)
D	Trong khoảng giới hạn	1-5 (%)
R1	Lý tưởng nhất là 0	0
R2	Trong khoảng giới hạn	8-10 (cm)

Dựa vào dữ liệu thực nghiệm từ bảng 6, phần mềm Design-Expert đã đưa ra các công thức tối ưu với các chỉ số mong muốn D (Desirability) khác nhau. Công thức với chỉ số mong muốn cao được lựa chọn và trình bày trong bảng 8.

Bảng 8. Công thức tối ưu cho công thức 5% và 8% với chỉ số mong muốn cao nhất.

Thành phần	Tỷ lệ % tối ưu	
Eucalyptol	5	8
Cremophor RH40	7,50	7,48
Ethanol	5,07	5,7
Poloxamer 407	3,07	4,05
Nước cất	Vừa đủ	Vừa đủ
	D=0,995	D=0,999

Kết quả kiểm chứng công thức tối ưu

Bào chế lặp lại 3 lần các công thức tối ưu đã tìm được, với cùng các điều kiện và quy trình như trong giai đoạn thiết kế, mỗi công thức có khối lượng 50 g. Sau đó, tiến hành xác định chỉ tiêu mức độ tách lớp sau khi ly tâm (R1), đường kính trung bình chùm phun (R2). Kết quả được trình bày trong bảng 9.

Bảng 9. Kết quả kiểm chứng 3 lô công thức 5% và 8% eucalyptol.

Lô	CT 5%		CT 8%	
	R1	R2	R1	R2
1	0	8,1	0	7,75
2	0	8	0	7,88
3	0	7,93	0	7,83
Trung bình	0	8,01	0	7,82
Hệ số biến thiên CV (%)	0	1,10	0	0,80
Dự đoán	0	8	0	8,12
Sai số tương đối giữa giá trị trung bình và dự đoán (%)	0	0,13	0	3,69

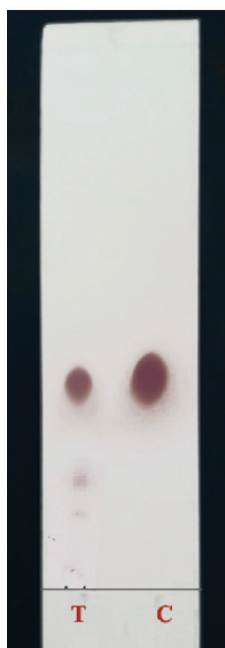
Kết quả mức độ tách lớp sau khi ly tâm (R1) và đường kính trung bình chùm phun (R2) của công thức tối ưu 5% và 8% eucalyptol có sự lặp lại tốt, đồng thời sự sai lệch giữa giá trị dự đoán và giá trị trung bình thấp.

Đánh giá các chỉ tiêu của sản phẩm hoàn tất

Kết quả đánh giá một số chỉ tiêu thuốc khí dung thành phẩm được trình bày trong bảng 10.

Bảng 10. Kết quả đánh giá chỉ tiêu của thuốc khí dung xịt họng thành phẩm.

Chỉ tiêu	CT 5%	CT 8%
Cảm quan	Vi nhũ tương đục mờ, có mùi thơm, vị ngọt nhẹ, hơi đắng	Vi nhũ tương hơi đục, có mùi thơm, vị ngọt nhẹ, hơi đắng
pH	4,5-6,5	
Tỷ trọng	0,99-1,01	0,98-1,01
Hình dạng phun	Hình dạng chùm phun: tròn hoặc gần tròn	
	Kích thước chùm phun: đường kính trung bình nằm trong khoảng 6,8-9,2 (cm)	Kích thước chùm phun: đường kính trung bình nằm trong khoảng 6,63-8,97 (cm)
Độ đồng đều phân liều	Các liều nằm trong khoảng 0,1178-0,1766 (g) Trung bình các liều đầu và liều cuối phải nằm trong khoảng 0,1251-0,1693 (g)	Các liều nằm trong khoảng 0,1165-0,1747 (g) Trung bình các liều đầu và liều cuối phải nằm trong khoảng 0,1238-0,1674 (g)
Định tính	Sắc ký lớp mỏng có xuất hiện màu từ xanh đến đỏ tím của eucalyptol	



Hình 1. Sắc ký lớp mỏng của mẫu thử so với eucalyptol chuẩn.

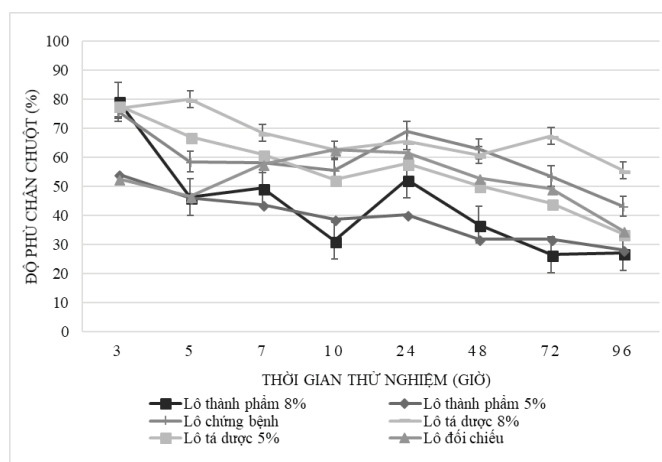
Đánh giá khả năng kháng viêm của thành phẩm

Khả năng kháng viêm của thành phẩm được thể hiện ở bảng 11 và hình 2.

Bảng 11. Hiệu quả giảm phù so với lô chứng bệnh/gel nhũ tương nền.

Lô	Độ phù bàn chân chuột trung bình (%)							
	3 giờ	5 giờ	7 giờ	10 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
Chứng bệnh	75,83 ±4,29	58,61 ±6,33	58,33 ±3,80	55,69 ±5,48	68,89 ±6,04	62,92 ±7,20	53,61 ±5,94	43,19 ±4,25
Thành phẩm 8%	79,58 ±11,16	46,42 ±7,91	49,53 ±6,71	31,40 ±4,15	52,46 ±5,91	36,91 ±7,59*	26,55 ±7,06*	27,25 ±5,34*
Tá dược 8%	76,87 ±6,89	80,16 ±9,70	68,49 ±7,75	62,78 ±6,94	65,50 ±7,54	60,77 ±13,46	67,32 ±11,72	55,52 ±11,87
Thành phẩm 5%	54,20 ±3,78*	46,10 ±4,71*	43,80 ±4,04*	38,80 ±3,18*	40,30 ±3,63*	31,80 ±4,74*	31,9 ±6,26*	28,2 ±5,41*
Tá dược 5%	77,92 ±7,23	67,28 ±3,20	61,13 ±4,58	52,38 ±3,89	58,08 ±3,71	50,26 ±6,12	44,21 ±5,45	33,65 ±4,81
Đối chiếu	52,68 ±4,91*	46,67 ±4,31	57,58 ±7,50	62,72 ±6,92	61,65 ±5,44	53,04 ±7,11	49,21 ±3,00	34,92 ±4,69

*P<0,05: giá trị có ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô chứng bệnh/tá dược.



Hình 2. Kết quả thử nghiệm khả năng kháng viêm của thành phẩm.

Kết quả độ phù chân chuột giữa lô chứng bệnh, tá dược 8%, tá dược 5% và thuốc đối chiếu khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$) (hình 2). Như vậy tá dược 8% và tá dược 5% không có tác dụng kháng viêm. Thuốc đối chiếu chỉ có tác dụng giảm phù ở thời điểm 3 giờ sau khi tiêm carragenin ($P<0,05$) với hiệu quả giảm phù là 30,53%, tuy nhiên độ phù chân chuột tăng dần sau 24 giờ và giảm nhẹ sau 96 giờ do lượng carrageenan được chuyển hóa và đào thải. Như vậy sau 5 ngày sử dụng, thuốc đối chiếu Anginovag® chỉ có tác dụng phòng viêm trong thời gian ngắn.

Độ phù chân chuột giữa lô thành phẩm 8% và lô chứng bệnh khác nhau có ý nghĩa thống kê ở thời điểm 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ ($P<0,05$).

Bảng 12. Tác động kháng viêm của thành phẩm so với lô chứng bệnh.

Lô	Hiệu quả giảm phù so với lô chứng bệnh (%)							
	3 giờ	5 giờ	7 giờ	10 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
Thành phẩm 1 (8%)	-4,95	20,79	15,09	43,62	23,85	41,34	50,47	36,92
Thành phẩm 2 (5%)	28,57	21,33	25,00	30,42	41,53	49,45	40,41	34,73
Đối chiếu	30,53	20,38	1,29	-12,61	10,51	15,70	8,22	19,15

Thành phẩm 5% có tác dụng kháng viêm khá tốt với độ phù chân chuột thấp và giảm đều ở mọi thời điểm, sau 96 giờ độ phù chân chuột giảm từ 54,2% xuống 28,2%, (hình 2). Hiệu quả giảm phù tăng dần theo thời gian và đạt cao nhất ở thời điểm 48 giờ là 49,45% (bảng 12). Khác biệt về độ phù chân chuột giữa lô thành phẩm 5% và lô chứng bệnh đạt ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$. Như vậy thành phẩm có chứa 5% eucalyptol có tác dụng phòng viêm tốt.

Kết luận

Các kết quả trên cho thấy, nghiên cứu này đã đạt được thành công trong việc ứng dụng hoạt chất eucalyptol vào dạng khí dung xịt họng có tác dụng tại chỗ để điều trị viêm

họng. Sản phẩm hoàn tất đã được khảo sát chỉ tiêu về cảm quan, pH, tỷ trọng, hình dạng phun, độ đồng đều khối lượng phun và định tính. Hơn nữa, sản phẩm còn cho khả năng kháng viêm tốt so với lô không điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Y tế (2016), *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh về tai mũi họng*, Nhà xuất bản Y học.
- [2] F. Farrer (2012), “Sprays and lozenges for sore throats”, *South African Family Practice*, **54(2)**, pp.26-31.
- [3] M.M. Thosar (2011), “Intra oral sprays - An overview”, *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, **2(11)**, pp.1235-1246.
- [4] Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, Nhà xuất bản Y học.
- [5] USFDA CDER (2002), *Nasal spray and inhalation solution, suspension, and spray drug product chemistry, manufacturing, and controls documentation*.
- [6] The United State Pharmacopeial Convention (2013), “Aerosol chapter <601>”, *USP 36 - NF 31*, p.244.
- [7] Hans Gerhard Vogel (2008), *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays (Second editon)*, Springer, pp.1099-1106.

Nghiên cứu tác dụng của dịch chiết cây Hạ khô thảo nam [*Blumea lacera* (Burn. f.) DC] trên chuột bị gây suy thận mạn bởi adenine

Trịnh Khánh Linh¹, Trần Văn Cường¹, Hồ Anh Sơn^{2*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y

Ngày nhận bài 3/12/2018; ngày gửi phản biện 5/12/2018; ngày nhận phản biện 2/1/2019; ngày chấp nhận đăng 8/1/2019

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá tác dụng của dịch chiết Hạ khô thảo nam (*Blumea lacera*) trên chuột bị suy thận mạn. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: bột cây Hạ khô thảo nam được chiết 3 lần bằng EtOH 96%, bốc hơi dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn EtOH để làm thí nghiệm. Chuột bị gây suy thận mạn bằng cách cho uống adenine liều 100 mg/kg cách ngày. Sau 35 ngày, lấy ngẫu nhiên 16 chuột (đã bị suy thận) chia thành 2 nhóm: (i) Nhóm HKT: uống dịch chiết Hạ khô thảo nam, liều tương đương 8 g dược liệu/kg, uống cách ngày, xen kẽ uống adenine liều 100 mg/kg; (ii) Nhóm ST: không uống dịch chiết, uống adenine liều 100 mg/kg, uống cách ngày. Ngoài ra, nhóm chứng gồm 8 chuột nhất khỏe mạnh, cho uống nước cất. Quá trình này kéo dài 21 ngày. Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm: nồng độ ure, creatinin, huyết đồ và giải phẫu bệnh thận, hình ảnh siêu cấu trúc thận. Kết quả cho thấy, sau 21 ngày, các chỉ tiêu theo dõi ở nhóm chứng và nhóm HKT có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Nhóm ST có nồng độ ure và creatine cao hơn rõ rệt, số lượng hồng cầu và hemoglobine giảm rõ rệt so với 2 nhóm còn lại. Hình ảnh cấu trúc và siêu cấu trúc thận ở nhóm HKT không có tổn thương rõ rệt, trong khi ở nhóm ST có hình ảnh tổn thương rất rõ. Qua nghiên cứu có thể kết luận: cặn chiết EtOH Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị bệnh suy thận mạn trên mô hình gây tổn thương thận chuột bằng adenine.

Từ khóa: adenine, Hạ khô thảo nam, suy thận mạn.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Suy thận mạn là hậu quả cuối cùng của các bệnh thận, tiết niệu mạn tính, làm chức năng thận giảm sút dần dần và mất hoàn toàn chức năng. Lúc đó, thận không lọc được các chất độc ra khỏi cơ thể như ure, creatinin, gây rối loạn các chức năng nội tiết, ngoại tiết của thận, đòi hỏi phải điều trị bằng phương pháp lọc máu chu kỳ hoặc ghép thận.

Số lượng bệnh nhân suy thận mạn tính đang gia tăng nhanh ở nhiều nước trên thế giới, đặc biệt là bệnh suy thận mạn giai đoạn cuối. Chi phí để điều trị cho nhóm bệnh nhân này cũng không ngừng gia tăng. Tại các nước phát triển, chi phí cho bệnh nhân suy thận mạn chiếm 2-3% tổng chi phí của ngành y tế [1].

Ở Việt Nam, cho đến nay chưa có số liệu thống kê chính xác trên toàn quốc về căn bệnh này, song ước tính có khoảng 6 triệu người bị bệnh suy thận mạn, chiếm 6,73% dân số,

trong đó có khoảng 800.000 bệnh nhân giai đoạn cuối, trung bình có 8.000 bệnh nhân mắc mới mỗi năm. Khi bị suy thận mạn giai đoạn cuối thì bệnh nhân có chỉ định điều trị thay thế thận, bao gồm 3 phương pháp: chạy thận nhân tạo; lọc màng bụng; hoặc ghép thận với chi phí điều trị là rất lớn, gây ra gánh nặng cho gia đình và xã hội.

Hạ khô thảo nam còn gọi là cây Cỏ trời, là loài cây đặc hữu của Việt Nam và được dùng trong bài thuốc đông y cho bệnh nhân bị bệnh thận [2, 3]. Dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng dự phòng suy thận mạn trên mô hình gây suy thận cho chuột bằng adenine [4]. Tuy nhiên, cho đến nay ở nước ta chưa có tác giả nào nghiên cứu về tác dụng điều trị suy thận mạn của cây Hạ khô thảo nam. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này trên mô hình động vật [4-6], nhằm từng bước đánh giá tác dụng điều trị suy thận mạn của Hạ khô thảo nam.

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

The effectiveness of *Blumea lacera* extract on chronic renal failure animal model induced by adenine

Khanh Linh Trinh¹, Van Cuong Tran¹, Anh Son Ho^{2*}

¹University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²Biomedical & Pharmaceutical Applied Research Centre,
Vietnam Military Medical University

Received 3 December 2018; accepted 8 January 2019

Abstract:

Objective: to evaluate the effectiveness of *Blumea lacera* extract on chronic renal failure model induced by adenine in mice. **Methods:** *Blumea lacera* was extracted by 96% ethanol three times, then the liquid was evaporated with low pressure to get EtOH extract. Swiss mice were induced with renal failure by adenine oral administration (100 mg/kg) every 2 days. After 35 days, 16 renal failure mice were randomly divided into two groups: (i) HKT group, *Blumea lacera* EtOH extract was orally administrated (at the dose equivalent to 8 g/kg) every 2 days; in other days adenine was orally administrated (100 mg/kg); (ii) ST group: adenine was orally administrated (100 mg/kg) every 2 days, without *Blumea lacera* EtOH extract. Experimental periods prolonged to 21 days. Bio-parameters were collected such as blood cell count, urea, creatine, renal histopathology. **Results:** at the end of 21-day duration, the similarity between the control group and the HKT group was identified. ST group showed the significantly higher urea and creatine concentrations than other groups; red blood cells and hemoglobine were significantly lower than those in other groups. The renal structure image and superstructure image showed that, there was no renal damage in the HKT group, while the damage was observed in mitochondrial level in the ST group. **Conclusion:** *Blumea lacera* EtOH extract showed the effectiveness on renal failure animal model induced by adenine.

Keywords: adenine, *Blumea lacera*, chronic renal failure.

Classification number: 3.4

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Chuột nhắt trắng, chủng Swiss, cả hai giống, khỏe mạnh, khối lượng 20 ± 2 g, do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống tại Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự - Học viện Quân y từ trước khi nghiên cứu 5 ngày và trong suốt thời gian nghiên cứu.

Nguyên liệu nghiên cứu là phần trên mặt đất của cây Hạ khô thảo nam được thu hái tại Sapa, Lào Cai có ký hiệu là HKTN-018-4 vào tháng 3/2018 để làm tiêu bản (với đầy đủ bộ phận sinh sản) được xác định bởi TS Đỗ Văn Hải, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Tiêu bản mẫu nghiên cứu được lưu giữ tại Phòng tiêu bản, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật.

Chiết xuất hoạt chất từ Hạ khô thảo nam

Cân 1,1 kg bột thô phần trên mặt đất của cây Hạ khô thảo nam được chiết hồi lưu 3 lần với EtOH 96%, để nguội, lọc, tập trung dịch lọc, bốc hơi dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn EtOH (86,4 g).

Đánh giá tác dụng điều trị suy thận mạn

Chuẩn bị hóa chất và mẫu thử:

- Pha adenine: adenine của Hãng Sigma được pha trong dầu ăn với hàm lượng 10 mg/ml dầu (chuột được uống 0,1 ml/10 g thể trọng, tương ứng liều 100 mg/kg thể trọng) [4].

- Pha mẫu thử: cặn EtOH được hòa tan trong dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO), sau đó được pha vào nước với thể tích vừa đủ tạo dung dịch 630 mg/10 ml (chuột được uống 0,1 ml/10 g thể trọng, tương đương 8 g dược liệu khô/kg thể trọng).

Đánh giá tác dụng của Hạ khô thảo nam:

- Nhóm chứng (n=8 con): chuột được cho ăn uống bình thường, không cho uống adenine và dịch chiết Hạ khô thảo nam.

- Nhóm gây bệnh suy thận mạn: chuột được uống adenine với liều 100 mg/kg, uống cách ngày, các ngày khác uống nước cất. Sau 35 ngày, lấy ngẫu nhiên 16 con chuột (đã bị suy thận) chia thành 2 nhóm:

+ Nhóm HKT (8 con): cho uống dịch chiết Hạ khô thảo nam, liều tương đương 8 g dược liệu khô/kg/ngày; uống xen kẽ adenine liều 100 mg/kg, cách ngày. Quá trình kéo dài 3 tuần.

+ Nhóm ST (8 con): không uống dịch chiết; uống adenine liều 100 mg/kg, uống cách ngày. Quá trình kéo dài 3 tuần.

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Nồng độ ure và creatinine máu (sử dụng máy phân tích sinh hóa bán tự động BTS350 của Hãng Biosystem Tây Ban Nha).

- Số lượng hồng cầu, nồng độ Hemoglobin (trên máy xét nghiệm huyết học bán tự động).

- Hình ảnh cấu trúc của thận trên kính hiển vi quang học.

- Hình ảnh siêu cấu trúc của thận trên kính hiển vi điện tử truyền qua.

Xử lý số liệu

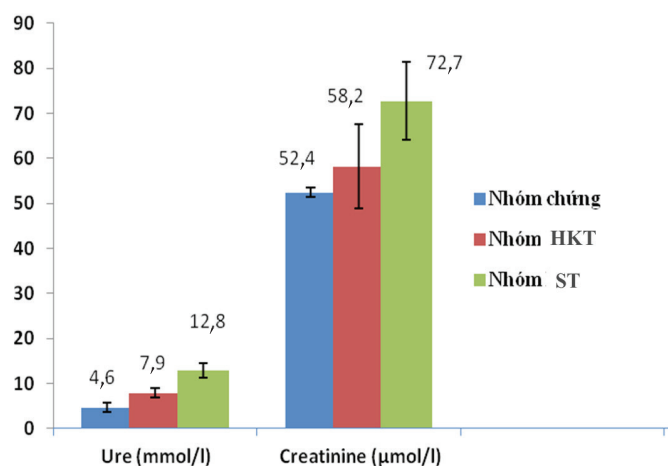
Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê Statview 5.0.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu về nồng độ ure và creatinine

Bảng 1. So sánh nồng độ ure và creatinine của các nhóm chuột.

Chỉ tiêu theo dõi	Nhóm chứng (1) (n=8)	Nhóm HKT (2) (n=8)	Nhóm ST (3) (n=8)	P
Ure (mmol/l)	4,6±0,6	7,9±1,0	12,8±1,6	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,01$ $p_{2,3}<0,05$
Creatinine (μmol/l)	49,5±0,7	58,2±9,3	72,7±8,7	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}<0,05$



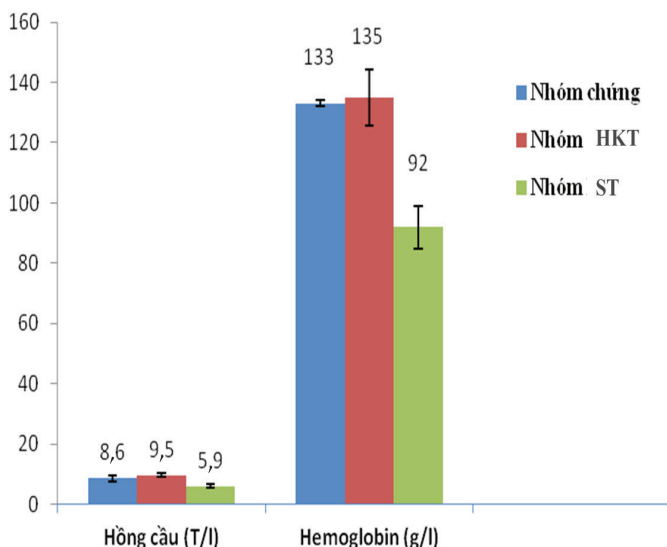
Hình 1. So sánh nồng độ ure, creatinine giữa nhóm HKT và các nhóm.

Nhận xét: bảng 1 và hình 1 cho thấy, mặc dù nồng độ ure và creatinine ở nhóm HKT cao hơn so với nhóm chứng nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa với $p>0,05$. Trong khi đó, nồng độ này thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm ST với $p<0,01$ và $p<0,05$. Như vậy, dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn, thể hiện việc làm giảm rõ rệt nồng độ ure, creatinine trong máu so với nhóm ST.

Kết quả về số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin

Bảng 2. So sánh số lượng hồng cầu, hemoglobin của các nhóm chuột.

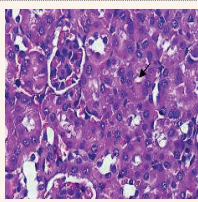
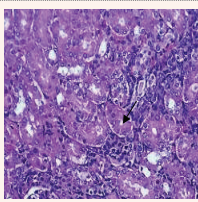
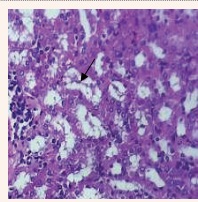
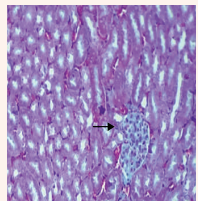
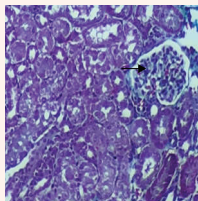
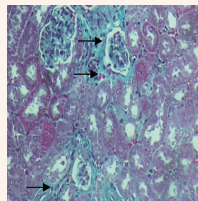
Chỉ tiêu theo dõi	Nhóm chứng (1) (n=8)	Nhóm HKT (2) (n=8)	Nhóm ST (3) (n=8)	P
Số lượng hồng cầu (T/l)	8,6±1,6	9,5±0,6	5,9±0,6	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}<0,05$
Nồng độ hemoglobin (g/l)	133±12,7	135±9,3	92±7,1	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}<0,05$



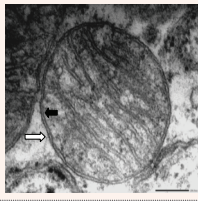
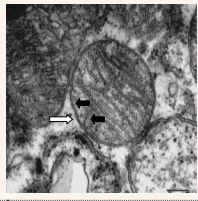
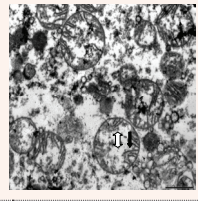
Hình 2. So sánh hồng cầu, hemoglobin giữa nhóm HKT và các nhóm.

Nhận xét: bảng 2 và hình 2 cho thấy, số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin ở nhóm HKT và nhóm chứng tương đương nhau với $p>0,05$. Ở nhóm ST thì số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin thấp hơn rõ rệt so với nhóm điều trị. Điều đó chứng tỏ, dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn, qua đó đã khôi phục được tình trạng thiếu máu ở chuột bị suy thận mạn.

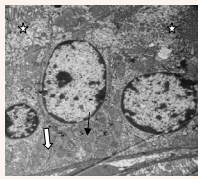
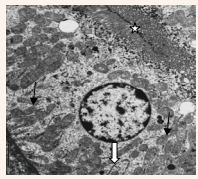
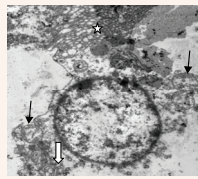
So sánh hình ảnh cấu trúc thận nhóm HKT với nhóm chứng và nhóm ST

Nhóm chứng	Nhóm HKT	Nhóm ST
a) Hình ảnh cấu trúc thận nhuộm HE, độ phóng đại 200 lần:		
		
Hình ảnh các ống thận có cấu trúc bình thường, lòng ống hẹp, không có hình ảnh tổn thương, viêm.	Hình ảnh cấu trúc ống thận bình thường, rải rác có các tế bào viêm.	Hình ảnh thoái hóa biểu mô ống thận, có các trụ niệu trong lòng ống thận, rải rác có các tế bào viêm.
b) Hình ảnh cấu trúc thận nhuộm Masson, độ phóng đại 200 lần:		
		
Hình ảnh cho thấy rõ các sợi của tổ chức liên kết ở cầu thận và rải rác trong khe thận (nhuộm 3 màu Masson, tổ chức liên kết có màu xanh dương).	Mật độ tổ chức sợi liên kết không khác biệt nhiều so với nhóm chứng (nhuộm 3 màu Masson, tổ chức liên kết có màu xanh dương).	Mật độ tổ chức sợi liên kết xuất hiện nhiều ở cầu thận và tổ chức khe thận (nhuộm 3 màu Masson, tổ chức liên kết có màu xanh dương).

So sánh hình ảnh siêu cấu trúc thận của nhóm HKT với nhóm chứng và nhóm ST

Nhóm chứng	Nhóm HKT	Nhóm ST
a) Hình ảnh siêu cấu trúc ty thể tế bào ống lượn gần:		
		
Cấu trúc ty thể nhóm chứng tương tự như nhóm HKT với màng ngoài (mũi tên trắng), màng trong (mũi tên đen) rõ nét, nguyên vẹn, mào ty thể bình thường, chất nền phân bố đậm đặc đồng đều. TEM. x 30.000.	Cấu trúc ty thể nhóm HKT tương tự như nhóm chứng với màng ngoài (mũi tên trắng), màng trong (mũi tên đen) rõ nét, nguyên vẹn, mào ty thể bình thường, chất nền phân bố đậm đặc đồng đều. TEM. x 20.000.	Ty thể với hình ảnh tương phản, màng trong, mào ty thể rách gãy, phân mảnh (mũi tên đen), chất nền (mũi tên trắng) phân bố không đồng đều, chỗ đông vón, chỗ hốc hóa. TEM. x 5.000.

b) Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào ống lượn gần:

		
Cấu trúc tế bào nhóm chứng tương tự như nhóm HKT với tế bào dạng vuông cao, cực đỉnh có bờ bàn chải (ngôi sao trắng), cực đáy có nhiều nếp gấp (mũi tên trắng), màng nhân 2 lớp rõ, chất nhân phân bố đều, bào tương có nhiều ty thể dạng hình trụ với cấu trúc được bảo tồn tốt và tập trung ở cực đáy của tế bào (mũi tên đen). TEM. x 2.000.	Cấu trúc tế bào nhóm HKT tương tự như nhóm chứng với tế bào dạng vuông cao, cực đỉnh có bờ bàn chải (ngôi sao trắng), cực đáy có nhiều nếp gấp (mũi tên trắng), màng nhân 2 lớp rõ, chất nhân phân bố đều, bào tương có nhiều ty thể dạng hình trụ với cấu trúc được bảo tồn tốt và tập trung ở cực đáy của tế bào (mũi tên đen). TEM. x 2.000.	Tế bào ống thận gần bị tương phản, bờ bàn chải phân mảnh (ngôi sao trắng), màng nhân không rõ hai lớp, chất nhân phân bố không đều, chỗ hốc hóa, chỗ đông vón, bào tương sắp xếp lộn xộn, tổn thương nghiêm trọng, nếp gấp cực đáy không còn thấy rõ (mũi tên trắng), ty thể tương phản, màng trong, mào ty thể rách gãy, phân mảnh (mũi tên đen). TEM. x 3.000.

Bàn luận

Về mô hình thí nghiệm, 16 chuột suy thận được lấy ngẫu nhiên đưa vào thử nghiệm tác dụng điều trị bằng dịch chiết Hạ khô thảo nam. Ở đây, cả nhóm HKT và ST đều tiếp tục cho uống adenine là phù hợp với điều kiện thực tế trên bệnh nhân suy thận mạn ở nước ta, đó là mặc dù đã bị bệnh suy thận mạn nhưng các tác nhân gây bệnh suy thận mạn thường vẫn tồn tại.

Dịch chiết Hạ khô thảo nam đã làm giảm đáng kể nồng độ ure và creatinine ở nhóm HKT so với nhóm ST. Đồng thời, nhóm chuột HKT có số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm ST. Điều đó chứng tỏ, dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn, góp phần khôi phục được tình trạng thiếu máu ở chuột bị suy thận mạn.

Hình ảnh cấu trúc và siêu cấu trúc ở nhóm chứng và nhóm HKT tương đương nhau về cấu trúc cơ bản của cầu thận, ống thận, tổ chức liên kết. Tuy nhiên, ở nhóm ST, cấu trúc thận cho thấy hình ảnh thoái hóa biểu mô ống thận, có các trụ niệu trong lòng ống thận, rải rác có các tế bào viêm. Đồng thời trên tiêu bản cấu trúc nhuộm Masson, thấy rõ sự tăng sinh tổ chức xơ sợi ở khe thận, dày màng nền tiểu cầu thận. Trên tiêu bản siêu cấu trúc, ở nhóm ST có hình ảnh tổn thương mức ty thể (mào ty thể đứt gãy, vón đặc), tế bào ống thận xa bị tương phản, bờ bàn chải phân mảnh, màng nhân không rõ hai lớp, chất nhân phân bố không đều, hốc hóa, đông vón, các bào quan sắp xếp lộn xộn, tổn thương

nghiêm trọng, nếp gấp cực đáy không còn thấy rõ, ty thể trương phồng, màng trong, mào ty thể rách gãy, phân mảnh. Như vậy, từ những phân tích trên cho thấy, rõ ràng dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn trên mô hình gây suy thận mạn bằng adenine.

Kết luận

Cần EtOH cây Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn trên mô hình suy thận mạn chuột bằng adenine, thể hiện ở các kết quả sau:

- Nồng độ ure, creatinine ở nhóm HKT tương đương nhóm chứng và thấp hơn rõ rệt so với nhóm ST.
- Số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin ở nhóm HKT tương đương nhóm chứng và cao hơn rõ rệt so với nhóm ST.
- Hình ảnh cấu trúc ở nhóm ST có tổn thương tế bào ống thận, tăng sinh tổ chức xơ.
- Hình ảnh siêu cấu trúc ở nhóm ST có tổn thương ty thể và tổn thương tế bào ống lượn xa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nathan R. Hill, Samuel T. Fatoba, Jason L. Oke, Jennifer A. Hirst, Christopher A. O'Callaghan, Daniel S. Lasserson, and F.D. Richard Hobbs (2016), "Global prevalence of chronic kidney disease - a systematic review and meta-analysis", *PLOS ONE*, **11**(7), p.e0158765.
- [2] Võ Văn Chi (1997), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tr.170, Nhà xuất bản Y học.
- [3] F.A. Ahmed, et al. (2014), "Ethnobotany and antibacterial potentiality of *Blumea lacera* L. from Sundarban Mangrove forest of Bangladesh", *Jahangirnagar University J. Biol. Sci.*, **3**(2), pp.17-24.
- [4] Trịnh Khánh Linh, Trần Văn Cường, Hồ Anh Sơn (2018), "Nghiên cứu tác dụng điều trị dự phòng suy thận mạn của dịch chiết Hạ khô thảo nam (*Blumea lacera*) trên động vật thực nghiệm", *Y dược lâm sàng* **108**, **13**(6), tr.133-138.
- [5] V. Diwan, A. Mistry, G. Gobe, L. Brown (2013), "Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats", *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **68**(2), pp.197-207.
- [6] T. Yokozawa, P.D. Zheng, H. Oura, F. Koizumi (1986), "Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats", *Nephron*, **44**(3), pp.230-234.

Đánh giá hàm lượng 20-hydroxyecdysone các loài cây thuốc ở Vườn quốc gia Tam Đảo và vùng đệm

Lê Xuân Đắc^{1*}, Đặng Ngọc Huyền¹, Vũ Thị Loan¹, Trần Thị Thanh Hương¹,
Nguyễn Vũ Anh¹, Nguyễn Đăng Hội¹, V.V. Volodin²

¹Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

²Trung tâm Khoa học Komî, Viện Hàn lâm Khoa học Liên bang Nga

Ngày nhận bài 15/10/2018; ngày chuyển phản biện 18/10/2018; ngày nhận phản biện 22/11/2018; ngày chấp nhận đăng 26/11/2018

Tóm tắt:

20-hydroxyecdysone (20E) là hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học, thuộc nhóm ecdysteroid và là dạng tồn tại phổ biến trong thực vật. Các loại ecdysteroid tách chiết từ thực vật có nhiều tính chất dược lý quan trọng, các sản phẩm chứa ecdysteroid đã được sử dụng phổ biến trong y dược và nông nghiệp. Tuy nhiên, những nghiên cứu và ứng dụng về ecdysteroid ở Việt Nam còn rất hạn chế. Nghiên cứu này thu thập và phân tích hàm lượng 20E của 167 loài cây thuốc ở Vườn quốc gia (VQG) Tam Đảo và vùng đệm. Kết quả đã xác định được 45 loài có chứa 20E trong tổng số 167 loài, chiếm tỷ lệ 26,96%. Hàm lượng 20E của các loài từ 0,002 đến 0,588% khối lượng chất khô, cao nhất là loài Khổ sâm (*Croton tonkinensis*) có hàm lượng 0,588%. Trong các mẫu nghiên cứu, 20E tập trung chủ yếu ở lá và chồi. Trong số 45 loài, có 28 loài chưa được công bố về hoạt chất 20E trên thế giới, 7 loài thuộc các chi có các loài đã công bố và chỉ có 10 loài đã được công bố. Kết quả này đã ghi nhận sự đa dạng và giá trị dược liệu của các loài cây thuốc chứa 20E ở VQG Tam Đảo và vùng đệm, góp phần bảo tồn và phát triển bền vững nguồn tài nguyên thực vật.

Từ khóa: cây thuốc, ecdysteroid, Khổ sâm, vùng đệm, 20E.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Hợp chất 20-hydroxyecdysone (20E) thuộc nhóm ecdysteroid (ECs) ở thực vật. ECs là các hormone steroid đầu tiên được tìm thấy trong giới động vật, đây là loại hormone đóng vai trò quan trọng tham gia vào quá trình lột xác và biến thái ở côn trùng [1]. Ở thực vật, ECs được phát hiện từ năm 1960 cũng có cấu trúc tương tự như ECs ở động vật. ECs được xác định trong khoảng 6% các loài thực vật và được gọi là phytoecdysteroids (PEs) để phân biệt chúng với ECs có nguồn gốc từ động vật. Cho đến nay, các nhà khoa học đã xác định được 503 hợp chất tự nhiên có chứa ECs [2]. Trong nhóm các hợp chất ECs, hợp chất 20E được nghiên cứu và ứng dụng phổ biến nhất [3, 4].

Các nghiên cứu ứng dụng đã chỉ ra rằng, PEs có nhiều tính chất dược lý quan trọng được sử dụng làm thực phẩm chức năng và dược phẩm cho con người, như tăng cường khả năng thích ứng, tác dụng bảo vệ gan và hạ đường huyết, tăng cường các quá trình đồng hóa trong cơ thể, không gây phản ứng phụ và không độc đối với động vật có vú và con người. Trên thị trường thế giới đã có hàng trăm loại chế phẩm sinh học được bổ sung PEs sử dụng cho con người và động vật nuôi [5].

Việt Nam có hệ thực vật khá đa dạng và phong phú, đã ghi nhận có 13.766 loài thực vật. Trong đó, có tới 11.373 loài thực vật bậc cao thuộc 305 họ (chiếm 4% tổng số loài và 57% tổng số họ thực vật trên thế giới) [6]. Mặc dù Việt Nam có sự đa dạng sinh học thực vật rất cao, nhưng những nghiên cứu về các loài thực vật có chứa PEs còn rất hạn chế. VQG Tam Đảo có 1.282 loài thực vật thuộc 660 chi và 179 họ thực vật bậc cao có mạch, trong đó có 214 loài thực vật có giá trị làm dược liệu, nhiều loài đã và đang được sử dụng làm thuốc có giá trị cho nhân dân trong vùng [7].

Bài báo này trình bày kết quả phân tích hàm lượng 20E của các loài cây thuốc thu thập ở VQG Tam Đảo và vùng đệm, nhằm phát hiện những loài chứa 20E để định hướng làm nguyên liệu sử dụng trong y - dược, nông nghiệp và công nghệ sinh học, đồng thời xác định các loài có giá trị phục vụ công tác bảo tồn và sử dụng bền vững tài nguyên đa dạng sinh học của VQG Tam Đảo.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Các loài thực vật có giá trị làm thuốc thu thập ở VQG Tam Đảo và vùng đệm, tỉnh Vĩnh Phúc.

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

The evaluation on 20-hydroxyecdysone content of medicinal plants in Tam Dao National Park and the buffer zone

Xuan Dac Le^{1*}, Ngoc Huyen Dang¹, Thi Loan Vu¹,
Thi Thanh Huong Tran¹, Vu Anh Nguyen¹,
Dang Hoi Nguyen¹, V.V. Volodin²

¹Vietnam - Russia Tropical Center

²Komi Science Center, Russian Academy of Sciences

Abstract:

20-hydroxyecdysone (20E) is a biologically active compound, belonging to the ecdysteroid group, which is commonly found in plants. The ecdysteroids extracted from plants have many important pharmacological properties; products containing ecdysteroids have been widely used in pharmaceutical medicine and agriculture. However, researches and applications of ecdysteroids in Vietnam are very limited. In this study, the 20E contents of 167 medicinal plant species have been collected and analysed in Tam Dao National Park and the buffer zone. The results have revealed 45 species containing 20E out of 167 species, accounting for 26.96%. The contents of 20E in the species ranged from 0.002 to 0.588% of dry matter; the highest content was found in *Croton tonkinensis*, that is 0.588%. 20E concentrated in leaves and buds of most species. Among of the 45 species, 28 species have not been published on 20E worldwide, 7 species belong to the genera which contained the published species, and only 10 species were published. These results exhibit the diversity and value of medicinal plants containing 20E in Tam Dao National Park and the buffer zone, contributing to the conservation and sustainable development of plant resources.

Keywords: buffer zone, *Croton tonkinensis*, ecdysteroid, medicinal plants, 20E.

Classification number: 3.4

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp kế thừa: thu thập, tổng hợp và phân tích thông tin từ các công trình khoa học đã công bố trong nước và quốc tế, các dữ liệu khoa học liên quan đến đối tượng nghiên cứu.

Phương pháp điều tra, thu và xử lý mẫu ngoài thực địa: tiến hành theo Nguyễn Nghĩa Thìn (2008) [8], có sự tham gia của người dân địa phương và chuyên gia về thực vật của VQG Tam Đảo.

Điều tra, thu mẫu theo điểm: thu mẫu ở khu vực dân cư tại thị trấn Tam Đảo và một số xã vùng đệm VQG Tam Đảo, bao gồm các loài mọc tự nhiên và được trồng trong vườn các hộ gia đình hoặc vườn dược liệu.

Điều tra, thu mẫu theo tuyến: 1) Tuyến thị trấn Tam Đảo - Hồ Sanh sang Thái Nguyên: chiều dài tuyến 3 km, sinh cảnh là rừng hỗn giao cây lá rộng và tre nứa chiếm ưu thế; 2) Tuyến thị trấn Tam Đảo - Nhà sàn: chiều dài tuyến 6 km, sinh cảnh là rừng hỗn giao cây lá rộng và rừng hỗn giao tre nứa chiếm ưu thế; 3) Tuyến hồ Vĩnh Thành - suối Vĩnh Ninh: chiều dài tuyến 4 km, 2 km đầu tiên sinh cảnh là nương rẫy và rừng tái sinh, 2 km tiếp theo sinh cảnh là rừng hỗn giao cây lá rộng.

Xử lý mẫu tiêu bản và xác định tên khoa học: mẫu tiêu bản của mỗi loài được đánh số, xử lý làm tiêu bản và bảo quản mẫu trong túi polyetylen chứa silicagel phục vụ việc giám định tên khoa học. Xác định tên khoa học các loài thực vật được tiến hành bằng phương pháp so sánh hình thái theo các tác giả: Đỗ Huy Bích (2006), Võ Văn Chi (2012), Phạm Hoàng Hộ (1999, 2000), Đỗ Tất Lợi (2009) [9-12], đồng thời so sánh và hiệu chỉnh theo Danh lục thực vật VQG Tam Đảo (2016) [13].

Xử lý mẫu phân tích: mẫu phân tích được tách riêng từng phần (thân, chồi, lá, rễ củ, quả...), tùy thuộc vào bộ phận thường được sử dụng làm thuốc hoặc điều kiện thực tế khi thu mẫu. Mẫu được sấy ở 60°C đến khối lượng không đổi, nghiền mẫu thành bột mịn bằng máy nghiền mẫu thực vật chuyên dụng và bảo quản mẫu trong bình hút ẩm chứa silicagel cho đến khi sử dụng.

Xác định hàm lượng 20E trong mẫu thực vật [14]: sử dụng 20E (do Viện Sinh học, Trung tâm Khoa học Komi, Viện Hàn lâm Khoa học Liên bang Nga cung cấp) làm chất chuẩn để xác định hàm lượng 20E trong các mẫu phân tích. Cân 100 mg bột mẫu thực vật, trộn đều mẫu trong 3 ml dung dịch methanol 60%, giữ hỗn hợp mẫu ở nhiệt độ 25°C trong 16 giờ. Ly tâm hỗn hợp mẫu 12.000 vòng/phút trong 25 phút, lấy 1 ml dịch nổi pha loãng với 2 ml nước cất, sau đó cho dung dịch đã pha loãng qua cột Diapak C₁₆ (do Công ty BioChemMak, Liên bang Nga sản xuất). ECs trong mẫu được rửa rửa từ cột bằng dung dịch methanol 60%.

Xác định hàm lượng 20E có trong mẫu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao trên hệ thống HPLC Agilent 1200 (Mỹ), cột Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 4,6x150 mm), thành phần pha động: nước/axetonitrin là 80/20, tốc độ dòng là 1 ml/phút, bước sóng λ =242 nm, nhiệt độ cột 30°C.

Tính hàm lượng 20E trong mẫu phân tích theo công thức: $C\% = [(9 \times C)/m] \times 100$

Trong đó: C% là hàm lượng 20E trong mẫu phân tích (% khối lượng chất khô); C là hàm lượng 20E tính theo diện tích pic trên sắc ký đồ; m là khối lượng mẫu phân tích (g); 9 là hệ số pha loãng dịch chiết mẫu.

Mỗi mẫu phân tích lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích và xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2010.

Kết quả

Hàm lượng 20E trong các loài cây thuốc ở VQG Tam Đảo và vùng đệm

Qua điều tra, khảo sát khu vực VQG Tam Đảo và vùng đệm, chúng tôi đã thu được 167 loài thực vật thường được người dân địa phương sử dụng làm thuốc. Kết quả phân tích 167 mẫu đã xác định được 45 mẫu có chứa hoạt chất 20E (bảng 1).

Bảng 1. Hàm lượng 20E trong các loài cây thuốc ở VQG Tam Đảo và vùng đệm.

TT	Tên loài	Hàm lượng 20E (%)	Bộ phận phân tích chứa 20E	Thế giới đã xác định 20E*
1	Khô sâm (<i>Croton tonkinensis</i>)	0,588	Lá, chồi	0
2	Mần tưới (<i>Eupatorium fortunei</i>)	0,245	Lá, chồi	0
3	Bái hoa vàng (<i>Sida rhombifolia</i>)	0,223	Lá, chồi	L
4	Thanh thất (<i>Ailanthus triphyssa</i>)	0,223	Lá, chồi	0
5	Hoàng lực (<i>Zanthoxylum nitidum</i>)	0,209	Lá non	0
6	Xương cá (<i>Vitex triplinata</i>)	0,183	Lá	C
7	Cam thảo nam (<i>Seoparia dulcis</i>)	0,139	Toàn thân	0
8	Gáo (<i>Anthocephalus indicus</i>)	0,079	Lá	0
9	Cò xước (<i>Achyranthes aspera</i>)	0,074	Toàn thân	L
10	Đòn gánh (<i>Gouania leptostachya</i>)	0,054	Lá, chồi	0
11	Sỏi rừng (<i>Sarcandra glabra</i>)	0,050	Lá	0
12	Dây đau xương (<i>Tinospora sinensis</i>)	0,043	Lá, chồi	L
13	Đèn 5 lá (<i>Vitex negundo</i>)	0,039	Lá	L
14	Tiết đề (<i>Cissampelos pareira</i>)	0,038	Toàn thân	L

15	Khôi nhung (<i>Ardisia silvestris</i>)	0,038	Lá	0
16	Đon dò ngọn (<i>Cyathula prostrata</i>)	0,036	Lá	L
17	Bìm bìm nhỏ (<i>Ipomoea maxima</i>)	0,031	Lá, chồi	C
18	Cuồng vàng (<i>Gonocaryum lobbianum</i>)	0,028	Lá	0
19	Rau trai (<i>Commelina communis</i>)	0,024	Toàn thân	C
20	Sâm nam (<i>Millettia speciosa</i>)	0,022	Rễ củ	0
21	Bò công anh (<i>Lactuca indica</i>)	0,021	Toàn thân	C
22	Dương kỳ thảo (<i>Achillea millefolium</i>)	0,020	Lá	L
23	Bột ếch (<i>Callicarpa candicans</i>)	0,016	Lá, chồi	C
24	Rau sắng (<i>Melientha suavis</i>)	0,013	Lá	0
25	Xạ đen (<i>Celastrus hindsii</i>)	0,011	Lá, chồi	0
26	Thu hải đường lá lệch (<i>Begonia</i> sp)	0,010	Lá	0
27	Trà hoa vàng gilbert (<i>Camellia gilbertii</i>)	0,009	Lá	0
28	Đò ngọn (<i>Cratogeomys prunifolium</i>)	0,008	Lá	0
29	Diệp hạ châu (<i>Phyllanthus urinaria</i>)	0,008	Toàn thân	0
30	Kiến cò (<i>Rhinacanthus nasutus</i>)	0,006	Lá, chồi	0
31	Thừng mực trâu (<i>Holarrhena antidysenteria</i>)	0,006	Lá	0
32	Trái lá dài (<i>Commelina diffusa</i>)	0,006	Toàn thân	C
33	Ké hoa đào (<i>Urena lobata</i>)	0,006	Lá, chồi	0
34	Lầu (<i>Psychotria reevesii</i>)	0,006	Lá	0
35	Thanh táo (<i>Justicia gendarussa</i>)	0,005	Lá	L
36	Bồng bồng (<i>Curculigo orchioidea</i>)	0,005	Rễ củ	0
37	Hy thiêm (<i>Siegesbeckia orientalis</i>)	0,005	Lá, chồi	0
38	Bạch chỉ nam (<i>Millettia pulchra</i>)	0,005	Lá, chồi	0
39	Cà gai lông (<i>Solanum torvum</i>)	0,005	Quả	L
40	Trà hoa vàng tam đảo (<i>Camellia tamdaoensis</i>)	0,005	Lá	0
41	Dâu tằm (<i>Morus alba</i>)	0,004	Lá	L
42	Chua chất (<i>Docynia indica</i>)	0,004	Lá	0
43	Hoàng lực không gai (<i>Zanthoxylum avicennae</i>)	0,004	Lá, chồi	0
44	Mô gói thuốc (<i>Actinodaphne cochinchinensis</i>)	0,003	Lá	0
45	Dê quạt (<i>Iris domestica</i>)	0,002	Rễ củ	C
Trung bình		0,057		

Ghi chú: *: lá, chồi là một mẫu; 0: chưa phân tích 20E; C: có các loài cùng chi đã phân tích 20E; L: loài đã phân tích 20E.

Kết quả phân tích ở bảng 1 cho thấy, các mẫu thực vật thu được ở VQG Tam Đảo và vùng đệm có hàm lượng 20E dao động 0,002-0,588% khối lượng khô, tính trung bình mỗi mẫu chứa 20E là 0,057% khối lượng chất khô. Trong đó, loài Khổ sâm có hàm lượng 20E cao nhất là 0,588%, loài Dẻ quạt có hàm lượng 20E thấp nhất là 0,002% khối lượng khô. Đáng chú ý nhất có 7 loài chứa hàm lượng 20E cao từ 0,139 đến 0,588%, bao gồm Khổ sâm, Mần tưới, Bái hoa vàng, Thanh thất, Hoàng lực, Xương cá và Cam thảo nam.

Kết quả thu được ở bảng 1 cũng cho thấy, hầu hết các loài phân tích đều có 20E tập trung ở phần lá và chồi (35 loài). Có 7 loài chứa 20E trong toàn thân cây (Cam thảo nam, Cỏ xước, Tiết dê, Rau trai, Bồ công anh, Diệp hạ châu, Trai lá dài). Chỉ có 2 loài có chứa 20E trong rễ củ (Bồng bồng, Dẻ quạt) và một loài có 20E ở quả (Cà gai lông).

So sánh các loài thực vật đã công bố có chứa PEs trên thế giới [2] với kết quả của nghiên cứu này cho thấy, trong số 45 loài thực vật chứa 20E thu ở khu vực VQG Tam Đảo và vùng đệm có đến 28 loài chưa được công bố trên thế giới, 7 loài thuộc cùng các chi có các loài đã công bố và chỉ có 10 loài đã công bố (bảng 1). Kết quả này cho thấy sự đa dạng các loài thực vật chứa PEs cũng như triển vọng nghiên cứu, phát hiện các loài mới có hàm lượng cao PEs ở VQG Tam Đảo nói riêng, Việt Nam nói chung.

Đa dạng các taxon thực vật chứa 20E ở VQG Tam Đảo và vùng đệm

Theo kết quả tổng hợp các taxon (bậc phân loại) thực vật thu thập tại VQG Tam Đảo và vùng đệm, đã thu được 167 loài thuộc 70 họ và 146 chi (bảng 2).

Bảng 2. Đa dạng các taxon thực vật chứa 20E ở VQG Tam Đảo và vùng đệm.

TT	Thành phần các taxon	Tổng số các taxon	Số lượng các taxon chứa 20E	Tỷ lệ các taxon chứa 20E (%)
1	Họ	70	31	44,29
2	Chi	146	37	25,34
3	Loài	167	45	26,95

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, các loài thực vật có chứa 20E thuộc các bậc phân loại khá đa dạng và phong phú. Cụ thể, ở bậc phân loại họ có 31/70 họ, chiếm tỷ lệ 44,29% các họ có các loài chứa 20E; bậc phân loại chi có 37/146 chi, chiếm tỷ lệ 25,34%; bậc phân loại loài có 45/167 loài, chiếm tỷ lệ 26,95%.

Theo Lafont và cs (2017) [2], các nhà khoa học đã xác định được 1.339 loài thực vật thuộc 132 họ có chứa PEs, các họ có nhiều loài chứa PEs như Cẩm chướng (Caryophyllaceae), Rau muối (Chenopodiaceae), Rau dền (Amaranthaceae), Cúc (Asteraceae)... Theo các kết quả đã

công bố, trên thế giới có khoảng 6% các loài thực vật chứa PEs thuộc các ngành hạt kín, hạt trần và dương xỉ. Đặc biệt, PEs thường tồn tại trong nhiều loài thực vật được sử dụng trong các bài thuốc dân tộc, vì vậy nghiên cứu này tập trung thu mẫu và phân tích 20E của các loài cây thuốc. Do đó, kết quả thu được của nghiên cứu này có tỷ lệ các loài chứa 20E cao gấp 4,5 lần (26,95%) so với công bố trên thế giới (6%) [2, 3, 15]. Tuy nhiên, kết quả của nghiên cứu này mới chỉ phát hiện được 45 loài thực vật chứa 20E đều thuộc ngành hạt kín.

Bàn luận

Theo công bố gần đây, các nhà khoa học đã xác định được 503 hợp chất tự nhiên có chứa ECs, nhiều giả thuyết cho rằng ECs có thể tham gia hơn 1.000 cơ chế hoạt động sinh lý của cơ thể sinh vật trong tự nhiên [2]. Sự đa dạng của PEs do khác nhau về số lượng các nguyên tử carbon của bộ khung steroid (từ 24C đến 29C), chúng còn khác nhau về số lượng và vị trí của các nhóm hydroxyl và keto gắn trên bộ khung steroid. Dạng tồn tại phổ biến nhất của ECs trong thực vật là 20E và propodine B [16].

Theo các nghiên cứu đã công bố, hàm lượng PEs trung bình chiếm khoảng 0,1% khối lượng chất khô. Từ trước đến nay, mới chỉ phát hiện loài có hàm lượng PEs cao nhất là Dây song bào (*Diploclisia glaucescens*) với hàm lượng PEs trong vỏ cây là 3,2% khối lượng khô [3, 17].

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, các loài thực vật ở VQG Tam Đảo và vùng đệm đã được phân tích có hàm lượng trung bình 20E (0,057%) thấp hơn so với các công bố trước đây trên thế giới (0,1%). Sự khác nhau có thể do nghiên cứu này mới chỉ xác định hàm lượng một loại hoạt chất phổ biến nhất là 20E. Đặc biệt, kết quả của nghiên cứu này đã xác định được 28 loài thực vật chứa 20E lần đầu tiên được phát hiện ở Việt Nam chưa được công bố trên thế giới, có 7 loài thuộc các chi đã được công bố và 10 loài đã công bố trên thế giới [2]. Volodin và cs (2016) [18] đã phân tích hàm lượng PEs của 51 loài thực vật thu thập ở VQG Cúc Phương. Kết quả phát hiện các loài chứa PEs có hàm lượng dao động từ 0,2% (loài *Cyathula prostrata*) đến gần 2% khối lượng khô (loài *Vitex quinata*).

Theo các nghiên cứu, PEs thường được phát hiện trong các loại mô mới xuất hiện (lá non, chồi) và các cơ quan sinh sản (hoa, hạt phấn, hạt) của thực vật, nhưng ít tồn tại hơn trong thân và rễ. Điều này có nghĩa là hàm lượng PEs cao được tìm thấy ở những bộ phận quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển, hoặc các cơ quan và mô cần thiết để duy trì cho các thế hệ tiếp theo của thực vật [3, 19].

Nghiên cứu này mới chỉ tập trung nghiên cứu và sàng lọc các loài cây thuốc có chứa 20E ở khu vực VQG Tam Đảo và vùng đệm, nhưng đã ghi nhận sự đa dạng và phong phú ở các bậc phân loại, có đến 45 loài thuộc 37 chi và 31

họ. Kết quả phân tích cũng cho thấy, tỷ lệ các loài chứa 20E ở khu vực VQG Tam Đảo và vùng đệm khá cao, đến 26,95% trong tổng số 167 loài. Kết quả nghiên cứu của Volodin và cs (2016) [18], đã xác định được 6 loài có chứa PEs, chiếm tỷ lệ 11,7% trong tổng số 51 loài thu được ở VQG Cúc Phương.

Tính từ khi phát hiện PEs lần đầu tiên ở thực vật đến năm 2000, các nhà khoa học mới chỉ ghi nhận được 176 loài thực vật có chứa PEs thuộc 28 họ [16]. Nhưng đến năm 2017 đã xác định được 1.339 loài thực vật có chứa PEs thuộc 132 họ khác nhau [2]. Như vậy, trong vòng 17 năm các nhà khoa học đã phát hiện số họ có chứa PEs tăng gấp 4,7 lần và số loài tăng gấp 7,6 lần so với công bố từ năm 2000. Điều này cho thấy tầm quan trọng, sự quan tâm đặc biệt đối với các hợp chất chứa PEs cũng như tốc độ nghiên cứu phát hiện các loài thực vật chứa PEs của các nhà khoa học trên thế giới tăng lên rất nhanh.

Việt Nam có hệ thực vật rất đa dạng và phong phú, giá trị của các hoạt chất sinh học từ thực vật của Việt Nam đang còn nhiều điều bí ẩn và đầy tiềm năng nghiên cứu ứng dụng, trong đó có các hoạt chất thuộc nhóm PEs. Vì vậy, cần thiết có những nghiên cứu mang tính hệ thống và chuyên sâu về các loài thực vật chứa PEs, cũng như nghiên cứu quy trình công nghệ tách chiết, thử nghiệm và ứng dụng tạo ra các sản phẩm sử dụng trong nông nghiệp, công nghệ sinh học, mỹ phẩm, y dược, phục vụ sức khỏe cộng đồng và góp phần khai thác, bảo tồn, phát triển bền vững tài nguyên đa dạng sinh học.

Kết luận

Kết quả phân tích 167 loài cây thuốc ở VQG Tam Đảo và vùng đệm đã xác định được 45 loài có chứa hàm lượng 20E. Hàm lượng 20E của các loài dao động từ 0,002 đến 0,588% khối lượng chất khô, cao nhất là loài Khổ sâm có hàm lượng là 0,588%. Phần lớn các loài có chứa 20E tập trung ở lá và chồi. So với danh lục các loài thực vật chứa ECs trên thế giới, nghiên cứu này đã xác định có 28 loài chưa được công bố trên thế giới, 7 loài thuộc các chi có các loài đã công bố và chỉ có 10 loài đã được công bố.

Các bậc phân loại thực vật có chứa 20E ở VQG Tam Đảo và vùng đệm khá đa dạng và phong phú (ở bậc phân loại họ có 31 họ, chiếm 44,29% số họ có các loài chứa 20E trong tổng số 70 họ; bậc phân loại chi có 37 chi, chiếm 25,34% trong tổng số 146 chi; bậc phân loại loài có 45 loài, chiếm 26,95% trong tổng số 167 loài). Tổng số 45 loài cây thuốc có chứa 20E ở VQG Tam Đảo và vùng đệm đều thuộc ngành hạt kín.

LỜI CẢM ƠN

Bài báo này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài E-1.2 và M-4.1 thuộc Chương trình Ủy ban phối hợp Việt Nam - Liên bang Nga.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Butenandt, P. Karlson (1954), "Über die Isolierung eines metamorphose-hormons der Insekten in kristallisierter Form", *Z. Naturforsch.*, **9B**, pp.389-391.
- [2] R. Lafont, et al. (2017), *The Ecdysone Handbook* (3rd edition), <http://ecdybase.org>.
- [3] L. Dinan (2001), "Phytoecdysteroids: biological aspects", *Phytochemistry*, **57**, pp.325-339.
- [4] L. Dinan, R.E. Hormann (2005), "Ecdysteroid agonists and antagonists", *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, **3**, pp.197-242.
- [5] D. Tarkowska, M. Strnad (2016), "Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones", *Planta*, **244**, pp.545-555.
- [6] Bộ Tài nguyên và Môi trường (2014), *Tài liệu đào tạo, tập huấn về tiếp cận nguồn gen và chia sẻ lợi ích từ việc sử dụng nguồn gen*.
- [7] Trần Công Khánh, Trần Văn Ôn (2009), *Cây thuốc ở VQG Tam Đảo*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [8] Nguyễn Nghĩa Thìn (2008), *Các phương pháp nghiên cứu thực vật*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [9] Đỗ Huy Bích (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, **Tập 1, 2**, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [10] Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, **Tập 1, 2**, Nhà xuất bản Y học.
- [11] Phạm Hoàng Hộ (1999, 2000), *Cây cỏ Việt Nam*, **Quyển 1, 2, 3**, Nhà xuất bản Trẻ.
- [12] Đỗ Tất Lợi (2009), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học và Nhà xuất bản Thời đại.
- [13] VQG Tam Đảo (2016), *Danh lục thực vật VQG Tam Đảo*.
- [14] S.O. Volodina, I. Chadin, V. Martunhenko, V.V. Volodin (2004), "Đặc điểm sinh thái - quần lạc và sinh khối phần trên mặt đất của *Silene tatarica* trong các quần thể tự nhiên (phần đông bắc châu Âu của Nga)", *Tạp chí Khoa học Trung tâm khoa học Komi*, **6**, tr.4-7 (tiếng Nga).
- [15] J. Gorelick-Feldman, (2009), *Phytoecdysteroids - Understanding their anabolic activity*, New Jersey, USA.
- [16] U.A. Baltaev (2000), "Phytoecdysteroids: Structure, sources, and biosynthesis in plants", *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **26(12)**, pp.799-831.
- [17] B.M.R. Bandara, et al. (1989), "Ecdysterone from stem of *Diploclisia glaucescens*", *Phytochemistry*, **28**, pp.1073-1075.
- [18] V.V. Volodin, S.O. Volodina, Vũ Thị Loan, Võ Thị Hoài Thu, Phạm Khắc Linh (2016), "Phương pháp nghiên cứu sự phân bố của ecdysteroid trong thực vật thế giới - Kết quả sàng lọc ban đầu về ecdysteroid trong thực vật Việt Nam", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nhiệt đới*, **11**, tr.3-14 (tiếng Nga).
- [19] L. Dinan (2009), "Phytoecdysteroids: what use are they?", *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **72**, pp.126-141.

Tuyển chọn giống lúa (*Oryza sativa* L.) chịu mặn sodic cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long

Trần Thị Phương Thảo*, Võ Công Thành, Quan Thị Ái Liên,
Đái Phương Mai, Đặng Thị Ngọc Nhiên, Huỳnh Văn Toàn, Trần Ngọc Sơn, Nguyễn Hoài Thanh,
Phạm Vũ Khương Duy, Phan Thị Anh Thơ

Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng,
Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 6/8/2018; ngày chuyển phản biện 10/8/2018; ngày nhận phản biện 10/9/2018; ngày chấp nhận đăng 14/9/2018

Tóm tắt:

Xuất phát từ nhu cầu cung cấp giống lúa chịu mặn tốt, thích hợp cho mô hình tôm - lúa trên nền đất mặn kiềm (sodic) vùng Đồng bằng sông Cửu Long, 4 giống/dòng lúa mới (D1-1, LSĐB D4, LSĐB D6, NQBĐB) cùng với IR28 (chuẩn nhiễm), lúa Sỏi (chuẩn kháng) và đối chứng địa phương OM6677 đã được thử nghiệm tính chống chịu mặn trong điều kiện phòng thí nghiệm và thực tế ngoài đồng: (1) Trong điều kiện phòng thí nghiệm, các giống/dòng lúa được thử nghiệm trong dung dịch dinh dưỡng mặn vào giai đoạn mạ ở các nồng độ mặn 15, 19 và 22 dSm⁻¹ (tương đương với 9-14‰); đồng thời kết hợp nghiên cứu giải phẫu hình thái rễ và điện di protein SDS-PAGE trên rễ và lá của các giống/dòng này để tìm ra sự khác biệt giữa giống chịu mặn và giống nhiễm mặn; (2) Các giống/dòng lúa chịu mặn trong điều kiện phòng thí nghiệm được tiếp tục thử nghiệm thực tiễn trên đồng ruộng qua một vụ. Kết quả cho thấy, 4 giống/dòng trên đều có khả năng chịu mặn tốt ở giai đoạn mạ (15-19 dSm⁻¹), kết quả được ghi nhận khi giống đối chứng nhiễm IR28 chết (cấp 9) sau 7-12 ngày thử nghiệm. Riêng hai dòng D1-1 và NQBĐB có khả năng chịu mặn giai đoạn mạ cao (19 dSm⁻¹). Trên nền đất mặn sodic (độ dẫn điện E_{Ce}>4 mScm⁻¹, tỷ lệ natri hấp thu SAR>13, tỷ lệ natri trao đổi ESP>15), hai dòng lúa vẫn cho năng suất trên 1 tấn/ha.

Từ khóa: đất mặn, lúa chịu mặn, sodic.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Vùng trồng lúa bị nhiễm mặn ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) ước khoảng 700.000 ha [1]. Huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau là một trong những vùng điển hình tại ĐBSCL về đất bị mặn hoá, không trồng lúa được do nông dân nuôi tôm vài chục năm nay nên hàm lượng Na có điều kiện xâm nhập vào keo đất.

Do mô hình nuôi tôm thuần tạo ra hiện tượng phú dưỡng, tôm hay bị bệnh, năng suất tôm không cao, dẫn đến hiệu quả kinh tế thấp, qua khảo sát thực địa cho thấy nông dân cây cây “năng bọp” trong ruộng nuôi tôm lại cho năng suất tôm ổn định. Do chi phí trồng cây năng bọp tốn kém (giống, công cấy, xử lý bằng hoá chất...) nên việc thay thế cây năng bọp bằng giống lúa chịu mặn (hạt thu được để ăn, gốc để lại trên ruộng phân huỷ dần diệt các ký sinh có hại cho tôm) giúp nuôi tôm cho năng suất ổn định. Vì thế, mô hình lúa - tôm đã dần hình thành ở vùng này. Thực tiễn cho thấy, việc tìm ra giống lúa chịu mặn đáp ứng cho vùng ven biển nuôi tôm là cấp thiết hiện nay.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm nghiên cứu

Hạt các giống/dòng lúa nhận từ Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng - Trường Đại học Cần Thơ bao gồm: D1-1, LSĐB D6, LSĐB D4, NQBĐB, OM6677, IR28, lúa Sỏi.

Phương pháp nghiên cứu

+ Đánh giá khả năng chống chịu mặn giai đoạn mạ của các giống/dòng lúa với các nồng độ 15, 19, 22 dSm⁻¹ [2].

Theo dõi thí nghiệm, chuẩn pH=5, nồng độ muối mỗi ngày, cho đến khi giống chuẩn nhiễm IR28 chết hoàn toàn (cấp 9) và đánh giá theo tiêu chuẩn (SES) [2].

+ Khảo sát hình thái rễ: quan sát mặt cắt rễ đoạn 10-20 mm với thuốc nhuộm son phenyl-lục iod [3].

+ Phương pháp điện di protein tổng số trên lá, bẹ lá và rễ: tiến hành theo phương pháp điện di protein SDS-

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

Selecting rice (*Oryza sativa* L.) varieties with salinity tolerance to sodic soil conditions in the Mekong River Delta

Thi Phuong Thao Tran*, Cong Thanh Vo,
Thi Ai Lien Quan, Phuong Mai Dai,
Thi Ngoc Nien Dang, Van Toan Huynh,
Ngoc Son Tran, Hoai Thanh Nguyen,
Vu Khuong Duy Pham, Thi Anh Tho Phan

Department of Genetics and Plant Breeding,
College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University

Received 6 August 2018; accepted 14 September 2018

Abstract:

Based on the urgent need of rice varieties which can adapt well to sodic soil in the Mekong River Delta, this study was carried out on four selected varieties/lines of rice D1-1, LSĐB D4, LSĐB D6, NQBĐB and controls (OM6677, IR28, Lua Soi) through the following steps: (1) screening varieties/lines in the salty nutrient solution (IRRI, 1997) at concentrations of 15, 19, and 22 dSm⁻¹, and analysing root anatomy and protein electrophoresis of leaves, leaf sheath, and root to serve the breeding strategy; (2) testing in a paddy field in which raising shrimp for long time. The results showed that four varieties highly tolerated salinity at the seedling stage (15-19 dSm⁻¹), while the control varieties was sensitive after 7-12 days testing (scale 9). Particularly, D1-1 and NQBĐB lines had the salinity tolerance at 19 dSm⁻¹. On sodic soils (ECe>4 mScm⁻¹, SAR>13, ESP>15), both of the two rice lines could give yields over 1 tonne per hectare.

Keywords: saline soil, salinity tolerant, sodic.

Classification number: 4.1

PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

+ Đánh giá năng suất và khả năng chống chịu mặn ngoài đồng tại huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau.

+ Phương pháp thí nghiệm: khảo nghiệm cơ bản [4].

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí tại huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu

nhiên, 3 lần lặp lại, 6 nghiệm thức là các giống/dòng D1-1, OM6677, LSĐB D4, NQBĐB, LSĐB D6 và IR28.

Diện tích lô thí nghiệm 20 m² (4x5 m), tổng diện tích thí nghiệm là 360 m², khoảng cách là 20x20 cm.

+ Phương pháp theo dõi độ mặn: đánh giá diễn biến mặn nước bề mặt hàng tuần; độ mặn trong đất tại 3 thời điểm (sạ, tượng khởi sơ khởi và thu hoạch): đất được lấy ở độ sâu từ 0-20 cm.

+ Phương pháp xử lý số liệu: tất cả số liệu được phân tích thống kê ANOVA và so sánh theo phương pháp thử Duncan ở mức độ 5% bằng phần mềm thống kê SPSS, vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel.

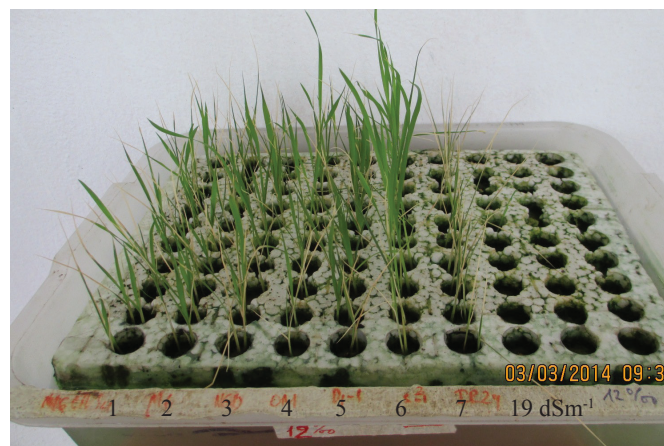
Kết quả và thảo luận

Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống/dòng lúa giai đoạn mạ

Ở độ mặn 15 dSm⁻¹, sau 12 ngày thử mặn giống chuẩn nhiễm IR28 chết hoàn toàn (cấp 9), hầu hết các giống/dòng được đánh giá cấp 5 - cấp chống chịu trung bình, riêng D1-1 được đánh giá cấp 3 (cấp chống chịu), giống OM6677 đang trồng ở Cà Mau là cấp 7 (nhiễm).

Ở nồng độ 19 dSm⁻¹, NQBĐB, lúa Sỏi, D1-1, LSĐB D4 và LSĐB D6 có khả năng chống chịu trung bình (cấp 5), trong khi OM6677 tương đương với giống chuẩn nhiễm IR28 (cấp 9) sau 8 ngày.

Ở nồng độ 22 dSm⁻¹, sau 7 ngày các giống/dòng IR28, OM6677, LSĐB D4, LSĐB D6 đều có hiện tượng nhiễm mặn (cấp 9), riêng NQBĐB, lúa Sỏi và D1-1 vẫn còn sống nhưng đã ngừng tăng trưởng hoàn toàn, lá khô và một số chồi bị chết (cấp 7).



Hình 1. Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống/dòng lúa ở 19 dSm⁻¹.

Ghi chú: 1: LSĐB D4, 2: LSĐB D6, 3: NQBĐB, 4: OM6677, 5: D1-1, 6: lúa Sỏi, 7: IR28.

Kết quả thí nghiệm cho thấy 4 giống/dòng lúa thí nghiệm D1-1, NQBĐB, LSĐB D4, LSĐB D6 đều có khả năng chống chịu mặn giai đoạn mạ ở nồng độ 15 đến 19 dSm⁻¹.

Mối liên quan giữa hình thái giải phẫu rễ cây lúa và khả năng chống chịu mặn

Sự thay đổi số lượng mạch gỗ:

Đề thích nghi với tình trạng thiếu nước trong điều kiện mặn, cây lúa phải giảm quá trình dẫn nước và thoát hơi nước. Việc giảm số lượng mạch gỗ là điều rất cần thiết, góp phần giúp cây ngăn chặn quá trình dẫn nước và mất nước.

Kết quả khảo sát số mạch gỗ ở rễ lúa sau 7 ngày trong dung dịch mặn được trình bày trong bảng 1 cho thấy, ở nồng độ 0 dSm⁻¹ giống IR28 có số mạch gỗ thấp nhất (7,5), giống có mạch gỗ cao nhất là LSĐB D6 (16,0), khác biệt có ý nghĩa thống kê 5%.

Bảng 1. Số lượng mạch gỗ trong rễ cây lúa của các giống/dòng lúa ở các nồng độ mặn khác nhau.

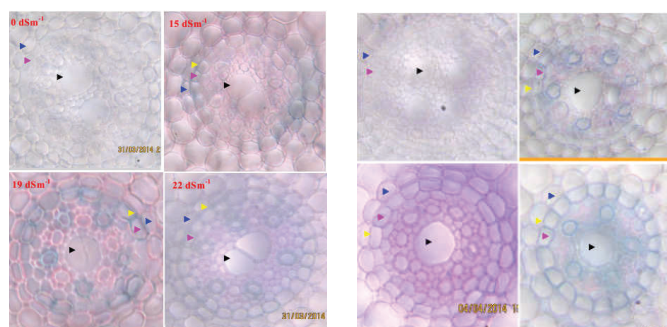
STT	Giống/dòng	Nồng độ (dSm ⁻¹)			
		0	15	19	22
1	D1-1	12,0 ^b	10,5 ^a	9,5 ^a	8,5 ^a
2	NQBĐB	13,5 ^b	10,0 ^a	7,5 ^{abc}	7,0 ^{ab}
3	LSĐB D6	16,0 ^a	9,5 ^a	7,0 ^{bc}	6,0 ^b
4	LSĐB D4	12,0 ^b	9,5 ^a	8,5 ^{abc}	6,0 ^b
5	OM6677	9,5 ^c	8,0 ^b	6,5 ^c	6,0 ^b
6	IR28	7,5 ^d	7,0 ^b	6,5 ^c	5,5 ^b
7	Lúa Sỏi	13,5 ^b	10,5 ^a	9,0 ^{ab}	8,5 ^a
<i>F</i>		*	*	*	*
<i>CV (%)</i>		5,92	5,76	10,3	13,1

Ghi chú: *Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Những số trong cùng một cột có mẫu tự theo sau giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê.

Ở nồng độ 15 dSm⁻¹, số mạch gỗ ở rễ giống lúa IR28, OM6677 (7-8,0) thấp hơn so với các giống/dòng thí nghiệm (9,5-10,5), khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% qua phép thử Duncan.

Ở nồng độ 19 dSm⁻¹, giống IR28 và OM6677 có số mạch gỗ thấp nhất là 6,5; cao nhất là hai giống Sỏi và D1-1.

Ở nồng độ 22 dSm⁻¹ số lượng mạch gỗ ở tất cả các giống đều giảm, khác nhau ở mức ý nghĩa 5%. Trong đó, giống IR28 có khả năng chống chịu kém nhất nên số lượng mạch gỗ thấp nhất (5,5), cao nhất là dòng D1-1 (8,5) tương đương với giống lúa Sỏi (hình 2). Các giống còn lại tương đương nhau và không khác biệt ý nghĩa thống kê.



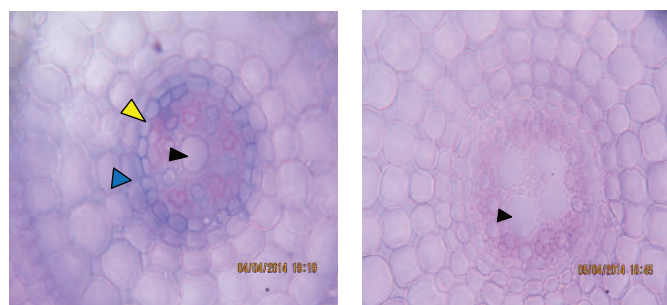
Hình 2. Số mạch gỗ của giống IR28 (trái) và D1-1 (phải) qua các nồng độ.

Chú thích: mũi tên màu xanh là nội bì, màu vàng là sự tẩm lignin và suberin, màu hồng là chu luân, màu đen là mạch gỗ.

Như vậy, trong cùng một giống, nồng độ mặn càng cao thì số lượng mạch gỗ càng giảm. Bên cạnh đó, các giống có khả năng chống chịu mặn tốt hơn được ghi nhận là có số lượng mạch gỗ cao hơn giống nhiễm trong cùng nồng độ mặn.

Sự tẩm lignin và suberin ở nội bì:

Quá trình khảo sát đã ghi nhận được sự khác nhau về cấu tạo của mô dẫn truyền, sự tẩm lignin và suberin sớm hơn đối với giống chuẩn nhiễm (IR28).



A) Rễ D1-1 ở 19 dSm⁻¹, đoạn 10-20 mm. B) Rễ D1-1 ở 0 dSm⁻¹, đoạn 10-20 mm.

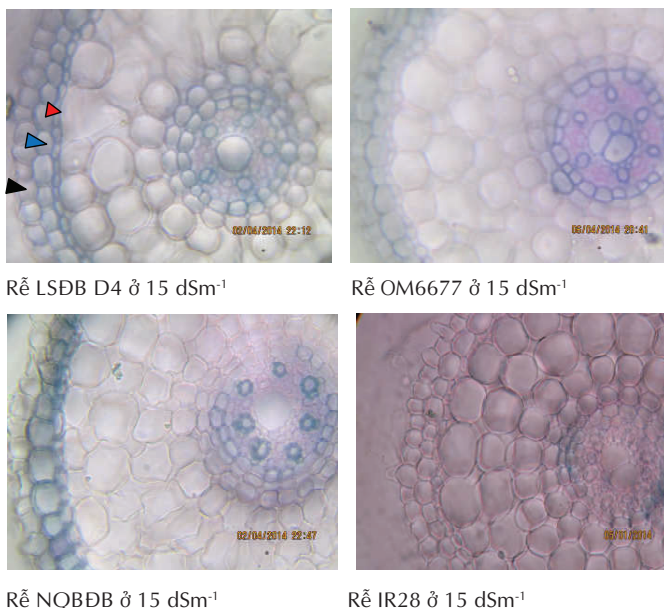
Hình 3. Sự khác nhau về cấu tạo tế bào rễ trong môi trường mặn và không mặn của cùng 1 dòng D1-1.

Chú thích: mũi tên màu xanh là nội bì, màu vàng là sự tẩm lignin và suberin ở đai casparian, màu đen là mạch gỗ.

Rễ dòng D1-1 (chống chịu trung bình ở 19 dSm⁻¹) có sự bắt màu với thuốc nhuộm, còn ở môi trường không mặn (0 dSm⁻¹) thì không có (hình 3A, B). Theo Krishnamurthy, et al. (2009) [5], sự tẩm lignin và suberin trong nội bì và ngoại bì của rễ thực vật có mạch luôn xuất hiện sớm để ngăn chặn việc xâm nhập của muối vào rễ nhằm tạo cơ chế kháng mặn cho cây. Khảo sát trên đoạn 10-20 mm ở các nồng độ 15 dSm⁻¹, 19 dSm⁻¹ và 22 dSm⁻¹ cho thấy có sự tẩm lignin và suberin xuất hiện ở tất cả các giống/dòng, trong khi ở 0 dSm⁻¹ thì không bắt màu thuốc nhuộm. Riêng giống IR28 cho thấy sự tẩm lignin và suberin xảy ra ở vị trí gần đỉnh rễ (10 mm) hơn so với các giống/dòng còn lại (15-20 mm).

Sự hình thành lớp tế bào ngấm lignin và suberin ở ngoại bì của rễ lúa trong điều kiện mặn:

Khảo sát trên đoạn 10-20 mm (hình 4) cho thấy, tại nồng độ 15 dSm^{-1} rễ giống NQBĐB và D1-1 có sự tẩm lignin và suberin ở ngoại bì, còn giống IR28 và OM6677 thì không xuất hiện thuốc nhuộm son phen. Tương tự, trên giống LSĐB D6 và LSĐB D4 cũng xuất hiện thuốc nhuộm ở lớp tế bào này.



Hình 4. Cấu tạo tế bào rễ của các giống/dòng thí nghiệm ở nồng độ 15 dSm^{-1} .

Chú thích: mũi tên màu xanh là ngoại bì, màu đỏ là cương mô, màu đen là biểu bì ngoài.

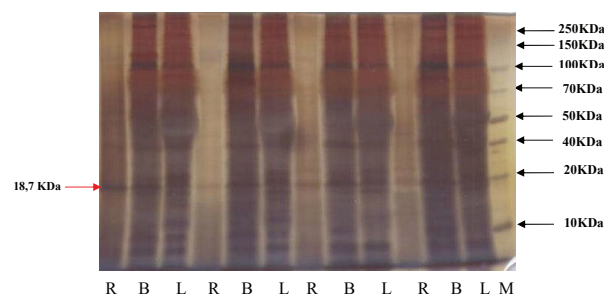
Theo Nguyễn Bá (2007) [6], ngoại bì (exodermis) là lớp xuất hiện ở dưới biểu bì, vách tế bào của nó có thấm lignin và suberin. Sự hiện diện của ngoại bì ở các cây ngập mặn có liên quan đến khả năng loại ra những ion Cl^- và lớp này như một màng chắn cho cây chống lại nồng độ muối cao [7]. Theo Nguyễn Anh Duy (2012) [8], khi sống trong điều kiện mặn rễ sẽ hình thành thêm một hệ thống vi lọc góp phần ngăn cản muối hấp thu vào cây, hệ thống vi lọc đó chính là lớp tế bào tẩm lignin và suberin ở ngoại bì vùng gần chóp rễ.

Theo X. Cai, et al. (2011) [9], các giống lúa chịu mặn ngoại bì hình thành sớm hơn giống nhiễm mặn, vùng này ở gần chóp rễ có chức năng ngăn cản muối. Sự hình thành lớp tế bào ngấm lignin và suberin ở ngoại bì của rễ liên quan đến khả năng chống chịu mặn của cây. Như vậy, khả năng chống chịu mặn của cây lúa có liên quan mật thiết đến quá trình hình thành lớp tế bào ngấm suberin ở ngoại bì để thực hiện chức năng là rào cản ngăn chặn sự hấp thu các ion độc khi cây stress muối. Giống có khả năng chống chịu mặn tốt thì rào cản này đạt hiệu quả hơn so với giống nhiễm mặn.

Tóm lại, bước đầu khảo sát hình thái giải phẫu của rễ lúa có thể khẳng định rằng có sự khác nhau giữa giống chống chịu mặn và giống nhiễm mặn thông qua sự tẩm lignin và suberin ở nội bì và ngoại bì tế bào rễ. Tại độ mặn 15 dSm^{-1} thì 4 giống: LSĐB D6, LSĐB D4, NQBĐB và D1-1 có khả năng chống chịu mặn tốt.

Kết quả điện di protein lá và rễ

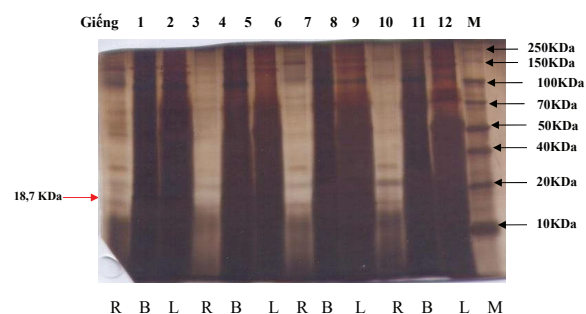
Quan sát phổ điện di ở rễ, bẹ lá và lá (hình 5) của giống NQBĐB cho thấy, ở rễ có sự xuất hiện band polypeptide (18,7 KDa). Khi cây sống trong điều kiện mặn thì band polypeptide thể hiện khá rõ, trong khi điều kiện 0 dSm^{-1} thì band này bắt màu nhạt trên phổ điện di. Nồng độ càng cao, mức độ bắt màu của band polypeptide càng đậm. Kết quả này cho thấy mặn ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp polypeptide (18,7 KDa) ở rễ.



Giống 1,2,3: 0 dSm^{-1} ; giống 4,5,6: 15 dSm^{-1} ; giống 7,8,9: 19 dSm^{-1} ; giống 10, 11, 12: 22 dSm^{-1} ; M: marker; L: lá; B: bẹ lá; R: rễ.

Hình 5. Phổ điện di protein ở bẹ lá, lá và rễ của giống NQBĐB.

Tiếp tục quan sát sự xuất hiện của band polypeptide này đối với giống chuẩn nhiễm IR28 (hình 6), band này bắt màu nhạt ở tất cả các nồng độ. Điều đó chứng tỏ rằng khi sống trong điều kiện mặn, protein này sẽ được tăng cường tổng hợp ở rễ của giống chống chịu và giảm tổng hợp ở giống chống chịu kém. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của B. Claes, et al. (1990) [10] và G.H. Salekdeh, et al. (2002) [11] đã phát hiện ra band protein chịu mặn trên rễ lúa ở vị trí 14,5 KDa.



Giống 1,2,3: 0 dSm^{-1} ; giống 4,5,6: 15 dSm^{-1} ; giống 7,8,9: 19 dSm^{-1} ; giống 10,11,12: 22 dSm^{-1} ; M: Marker; L: lá; B: bẹ lá; R: rễ.

Hình 6. Phổ điện di protein trên lá, bẹ lá và rễ của giống IR28.

Qua các phổ điện di protein trên lá và bẹ lá cho thấy chưa phát hiện được sự khác biệt về các polypeptide giữa các giống/dòng chịu mặn hay không. Tuy nhiên, có biểu hiện rất rõ ở nồng độ polypeptide trên rễ qua kỹ thuật nhuộm màu bằng nitrate bạc.

Khảo nghiệm cơ bản tại huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau

Diễn biến mặn tại huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau:

Đặc tính của đất tại huyện Cái Nước được trình bày ở bảng 2 cho thấy, đất trên ruộng thí nghiệm được đánh giá là giàu đạm ($>0,20\%$) [12], nghèo lân ($0,04-0,074\%$) [13] và có hàm lượng kali khá ở đầu vụ ($1,94\%$), giảm dần ở giai đoạn tượng khối sơ khởi ($1,22\%$) và cuối vụ ($0,66\%$) [12]. Kết quả phân tích đất cho thấy nghèo chất lân, nên trong canh tác lúa vùng này cần bón thêm lân ở đầu vụ.

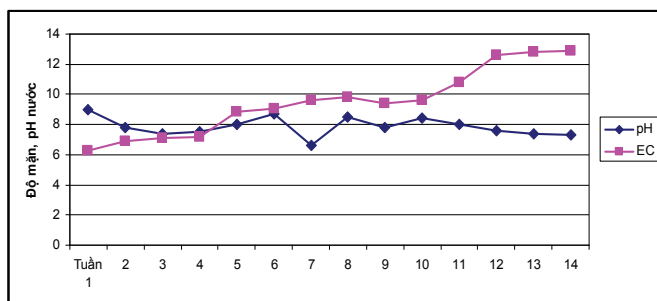
Bảng 2. Đặc tính hóa học đất tại Cái Nước - Cà Mau qua 3 giai đoạn phát triển cực trọng của lúa.

Giai đoạn	pH _{so}	EC _{so} (mScm ⁻¹)	CEC (meq/100 g)	ESP	N _{so} (%)	P _{so} (%)	K _{so} (%)	SAR	Đặc tính đất
Mạ	6,94	17,76	24,55	36,92	0,29	0,04	1,94	80,03	Mặn sodic
Tượng khối sơ khởi	6,29	10,49	22,51	26,36	0,3	0,074	1,22	77,95	Mặn sodic
Thu hoạch	6,77	9,13	28,77	24,86	0,25	0,055	0,66	117,97	Mặn sodic

Ghi chú: bh: bão hòa, ts: tổng số.

Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy, mẫu đất được lấy tại ruộng thí nghiệm qua các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây lúa thuộc nhóm đất mặn sodic [14] vì các giá trị quy định mặn sodic là: $EC_e > 4$ mScm⁻¹; $SAR > 13$ và $ESP > 15$. Bên cạnh đó, pH đất trong khoảng 6,29-6,94, đây là mức pH tối hảo cho cây lúa phát triển [15]. Ở đầu vụ, mặn đất lên đến 11,4‰, độ mặn giảm dần do mưa đến khi thu hoạch (6‰).

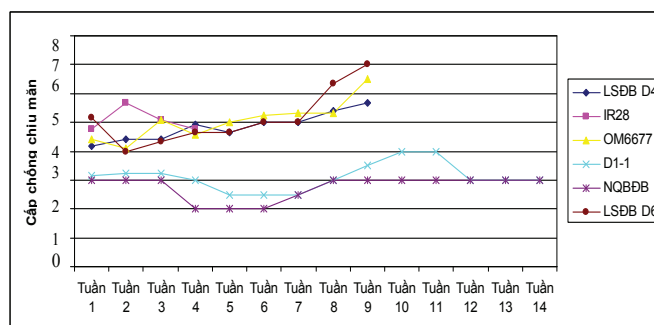
Độ mặn nước ruộng (hình 7) tăng dần từ đầu vụ đến cuối vụ: giai đoạn đầu (giai đoạn mạ) là 6-9 dSm⁻¹, đến giai đoạn trổ (tuần 8-9) tăng lên 10 dSm⁻¹ và đạt mức cao nhất vào cuối vụ (13 dSm⁻¹). Sự gia tăng độ mặn nước tại ruộng thí nghiệm là do thời điểm xuống giống ngay mùa mưa, đất được rửa mặn. Lượng mưa giảm dần các giai đoạn sau, đến gần cuối vụ thì nắng gắt nên ruộng càng mặn thêm. Về chỉ tiêu pH, pH nước ruộng tương đối ổn định (từ 6-8).



Hình 7. Biểu đồ diễn biến độ mặn và pH nước ruộng qua các giai đoạn sinh trưởng của cây lúa.

Với kết quả phân tích đất, độ mặn và pH nước ruộng như đã trình bày tại bảng 2 và hình 7 giúp lý giải vì sao vùng này khó canh tác lúa nếu không có giống lúa có khả năng chịu mặn.

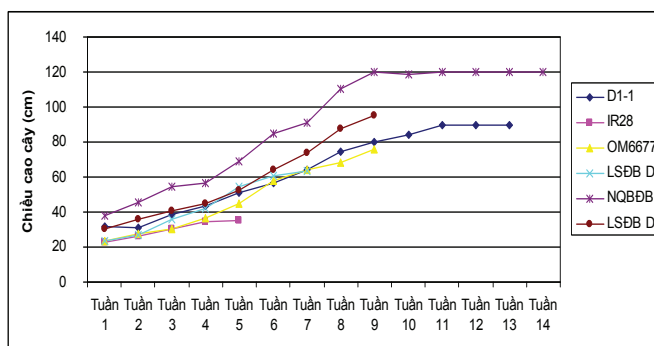
Hình 8 thể hiện cấp chống chịu của bộ giống thí nghiệm cho thấy, giống IR28 chỉ chịu đựng được qua giai đoạn mạ (tuần 3) do giai đoạn này cây sử dụng dinh dưỡng từ nội nhũ. Sau đó bắt đầu suy yếu và chết ở tuần thứ 5 (cấp 9). Chống chịu mặn tốt nhất là dòng NQBĐB và D1-1 (cấp 2-4). Các giống còn lại chống chịu trung bình (cấp 5) ở giai đoạn mạ lại bị nhiễm cấp 7-9 khi đến giai đoạn trổ.



Hình 8. Biểu đồ diễn biến cấp chống chịu mặn qua các giai đoạn sinh trưởng của cây lúa.

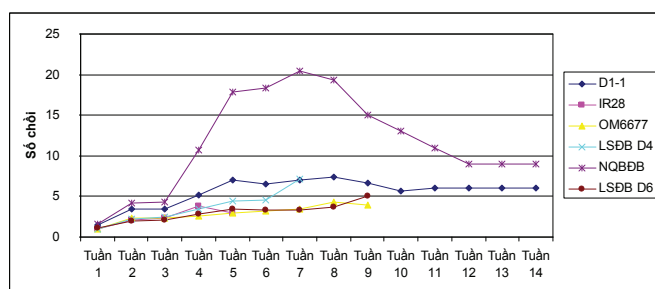
Diễn biến một số chỉ tiêu nông học của các giống/dòng lúa thí nghiệm tại Cái Nước, Cà Mau:

Chiều cao cây: giống/dòng LSĐB D4 chết ở tuần thứ 8, OM6677 và LSĐB D6 chết ở tuần thứ 10. Dòng NQBĐB và dòng D1-1 có khả năng chống chịu mặn tốt nên vẫn sinh trưởng tốt, chúng có chiều cao cây dao động từ 90-120 cm (hình 9).



Hình 9. Diễn biến chiều cao cây của bộ giống thí nghiệm tại huyện Cái Nước, Cà Mau.

Số chồi: số chồi vô hiệu của các dòng IR28, OM6677, LSĐB D4, LSĐB D6 dao động từ 3-8 chồi (hình 10), trong khi số chồi hữu hiệu của dòng NQBĐB và D1-1 dao động 7-9 chồi (bông).



Hình 10. Diễn biến số chồi của các giống/dòng lúa thí nghiệm tại Cái Nước, Cà Mau.

Một số chỉ tiêu về thành phần năng suất và năng suất:

Đến giai đoạn chín chỉ còn hai dòng D1-1 và NQBĐB cho năng suất (bảng 3).

Bảng 3. Một số chỉ tiêu thành phần năng suất và năng suất của 2 giống/dòng thí nghiệm.

Giống/dòng	Số bông/m ²	Dài bông (cm)	Số hạt chắc/bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)	KL 1.000 hạt (g)	NSTT (tấn/ha)
D1-1	132	23,73	65,67	63	25,47	1,06
NQBĐB	215	24,9	81,67	71	25,87	1,33

KL: khối lượng, NSTT: năng suất thực tế.

Dòng D1-1 có 132 bông/m², cũng được đánh giá là khá cao trong điều kiện mặn. Chiều dài bông hai dòng D1-1 và NQBĐB dao động từ 23,73-24,9 cm, số hạt/bông dao động từ 65 đến 81 hạt chắc/bông, khối lượng 1.000 hạt khoảng 25-26 g, hạt chắc có tỷ lệ trên 60%, năng suất đạt trên 1 tấn/ha.

Chỉ tiêu sâu bệnh:

Bốn giống/dòng lúa thí nghiệm đều không bị nhiễm rầy nâu, cũng không bị đạo ôn, chỉ bị nhiễm sâu cuốn lá nhẹ (15-20%). Giống IR28 chết sớm nên không ghi nhận được tỷ lệ gây hại (bảng 4).

Bảng 4. Tình hình sâu bệnh trên ruộng thí nghiệm.

STT	Tên giống/dòng	Rầy nâu	Đạo ôn	Sâu cuốn lá
1	D1-1	0	0	3
2	NQBĐB	0	0	3
3	LSĐB D6	0	0	3
4	LSĐB D4	0	0	3
5	OM6677	3	3	3
6	IR28	-	-	-

Kết luận

Để chọn tạo giống lúa có khả năng thích nghi với điều kiện mặn cao tại khu vực ĐBSCL, điển hình là tại huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau, việc nghiên cứu đất mặn là yếu tố

quyết định cũng như diễn biến mặn của nước là quan trọng.

Hai dòng NQBĐB và D1-1 có khả năng thích nghi với điều kiện huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau với độ mặn đất 17,76 dSm⁻¹ (≥12‰) và mặn nước 13 dSm⁻¹ (≥8‰) cho năng suất ≥1 tấn/ha. Kết quả của nghiên cứu là nền tảng quan trọng có thể áp dụng cho các tỉnh lân cận, đồng thời nâng cao năng suất tằm trong mô hình tằm - lúa do cải thiện hiện tượng phú dưỡng ở các tỉnh ĐBSCL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Thị Lang, Nguyễn Văn Tạo, Nguyễn Duy Bảy và Bùi Chí Bửu (2001), *Chọn tạo giống lúa chống chịu mặn ở ĐBSCL*, Nxb Nông nghiệp, tr.49-62.
- [2] IRRI (1997), *Screening rice for salinity tolerance*.
- [3] Bộ môn Sinh (2002), *Giáo trình thực hành sinh đại cương A2*, Trường Đại học Cần Thơ.
- [4] Ngô Ngọc Hưng (2009), *Giáo trình phì nhiêu đất*, Trường Đại học Cần Thơ.
- [5] Krishnamurthy, Pannaga, et al. (2009), "The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.)", *Planta*, **230**(1), pp.119-134.
- [6] Nguyễn Bá (2007), *Giáo trình thực vật học*, Nxb Giáo dục.
- [7] Phạm Thị Nga và Võ Văn Bé (2008), *Giáo trình thực vật học I*, Trường Đại học Cần Thơ.
- [8] Nguyễn Anh Duy (2012), *Sự biến đổi của rễ thực vật bậc cao để thích nghi với vùng Hòn Chông - Hà Tiên*, Luận văn thạc sĩ chuyên ngành sinh thái học, Trường Đại học Cần Thơ.
- [9] X. Cai, et al. (2011), "Development of Casparian strip in rice cultivars", *Plant Signaling & Behavior*, **6**(1), pp.59-65.
- [10] B. Claes, R. Dekeyser, R. Villarroel, M. Van den Bulcke, G. Bauw, M. Van Montagu and A. Caplan (1990), "Characterization of rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought", *The Plant Cell*, **2**, pp.19-27.
- [11] G.H. Salekdeh, J. Siopongco, L.J. Wade, B. Ghareyazie and J. Bennett (2002), "A proteomic approach to analyzing drought and salt - responsiveness in rice", *Field Crops Research*, **76**, pp.199-219.
- [12] K. Kyuma (1976), *Paddy soils in the Mekong Delta of Vietnam*, Kyoto University.
- [13] Lê Văn Căn (1978), *Giáo trình nông hóa*, Nxb Đại học và Trung học chuyên nghiệp.
- [14] Donald A. Horneck, Hopkins G. Bryan, Robert G. Stevens, Jason W. Ellsworth, and Dan M. Sullivan (2007), "Managing Irrigation Water Quality for Crop Production in the Pacific Northwest", *Pacific Northwest Extension Bulletin*, **597-E**, pp.1-29.
- [15] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2011), *Quy phạm khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa*, Tiêu chuẩn ngành 558-2002.

Chọn tạo giống ngô kiểu cây mới cho trồng mật độ cao

Vũ Thị Bích Hạnh^{1*}, Vũ Văn Liệt², Trần Thị Thanh Hà¹, Nguyễn Văn Hà¹,
Dương Thị Loan¹, Hoàng Thị Thuỳ¹, Nguyễn Văn Việt¹

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 12/9/2018; ngày chuyển phản biện 17/9/2018; ngày nhận phản biện 16/10/2018; ngày chấp nhận đăng 22/10/2018

Tóm tắt:

Chọn tạo giống ngô kiểu cây mới cho trồng mật độ cao là mục tiêu của nhóm nghiên cứu ngô tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Cây trồng trong giai đoạn 2015-2025. Việc chọn tạo các dòng ngô theo hướng kiểu cây mới được áp dụng cả phương pháp truyền thống (dòng tự phối, dòng full-sib) và phương pháp hiện đại (sử dụng chỉ thị phân tử, dòng đơn bội kép - DH). Từ 2010-2016, nhóm nghiên cứu đã đánh giá và chọn lọc các dòng B3 (E4), B6, L901, H2161 và T1691 là đứng dựa trên kiểu hình và chỉ thị phân tử, các dòng B6, H246, H493, H13412 có thời gian sinh trưởng (TGST) ngắn và đều có năng suất khá (>25 tạ/ha). Các dòng B3, B6, H2161, L901 và T1691 có khả năng kết hợp cao, là bố mẹ của các tổ hợp triển vọng VNUA36, VNUA17, VNUA18. VNUA36 là giống ngô lai có kiểu cây gọn, thích ứng với trồng mật độ cao. Đây là thành công bước đầu của nhóm nghiên cứu ngô trong chương trình chọn tạo giống ngô kiểu cây mới. Hiện nay, giống đang được công nhận sản xuất thử và mở rộng sản xuất tại các tỉnh phía Bắc nước ta.

Từ khóa: lá đứng, mật độ, năng suất ngô, ngô.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Canh tác hiện đại có quan hệ mật thiết với trồng mật độ cao. Cần nâng cao năng suất trên đơn vị diện tích của các giống ngô lai mới, bởi vì việc tăng tối đa năng suất quần thể để đạt được hơn so với tăng năng suất cá thể [1]. Năng suất ngô đã tăng lên có ý nghĩa trong kỷ nguyên giống ưu thế lai và tăng số cây trên đơn vị diện tích là một trong những đóng góp chính để cải tiến năng suất. Hầu hết các cây lấy hạt có năng suất ổn định trong phạm vi rộng của mật độ, bởi vì chúng có thể phản ứng với môi trường bằng điều chỉnh số nhánh. Ngô là cây lấy hạt nhưng không dễ nhánh hoặc dễ nhánh rất ít, thường chỉ tạo ra một bắp trên một cây nên không có khả năng điều chỉnh năng suất tương ứng giữa nguồn và sức chứa. Do vậy năng suất ngô, đặc biệt là với ngô lai phụ thuộc vào mật độ cây trên đơn vị diện tích. Để trồng dày (mật độ cao), các giống ngô lai cần một cấu trúc kiểu cây mới. Donald (1968) [2] lần đầu tiên đưa ra thuật ngữ kiểu cây lý tưởng (ideotype), trong khi Mark và Pearce (1975) [3] đề xuất kiểu cây lý tưởng (ideal plant type) của ngô. Những đề xuất kiểu cây lý tưởng sau này đưa ra là ngô có cờ nhỏ, dễ nhánh ít, bắp lớn và góc lá tiếp nhận ánh sáng tốt. Cây ngô lý tưởng (ideotype) có thể sử dụng cho sản xuất tối ưu. Bắt đầu từ những năm 1970, thể hệ giống ngô ưu thế

lai phát triển theo hướng tạo ra góc lá nhỏ, thẳng đứng, đặc biệt các lá trên bắp. Giống ngô có cấu trúc lá đứng thích nghi với trồng mật độ cao. Công bố của Zhang và cs (2014) [4] cho rằng, cấu trúc cây ngô là một yếu tố chính đóng góp đối với năng suất cao của chúng. Các giống ngô kiểu hình lá đứng (erect-leaf-angle - LA) giúp tăng khả năng thu nhận ánh sáng để quang hợp và chắc hạt, cho năng suất hạt cao hơn. Cấu trúc cây là yếu tố chìa khóa cho năng suất cao ở ngô, bởi vì cấu trúc cây với góc lá và hướng lá thẳng giúp thu nhận ánh sáng cho quang hợp hiệu quả hơn, lưu thông không khí tốt hơn trong điều kiện mật độ cao [5]. Đối với mô hình cây ngô trong tương lai cần quan tâm khai thác những tính trạng như: thời gian trổ cờ - phun râu, thời gian chắc hạt, diện tích lá và góc lá, độ bền lá xanh, chống chịu mật độ cao và tiềm năng quang hợp có thể nâng cao năng suất ngô trong thời gian tới.

Nhiều nghiên cứu tại Mỹ khẳng định, mật độ cây đã góp phần tăng năng suất. Năng suất tăng trong khi trung bình năng suất cá thể gần như là hằng số, chỉ tăng từ 0,34 kg/ha năm 1965 đến 0,37 kg/cây năm 2008. Trong khi đó, mật độ trồng cây đã tăng trung bình 720 cây/ha/năm qua 44 năm. Điều này chỉ ra rằng, tăng mật độ cây là nguyên nhân tăng năng suất hạt. Tại Trung Quốc, một thí nghiệm kéo dài trong

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

Erect-leaf maize breeding for high-density cultivation

Thi Bích Hạnh Vu^{1*}, Van Liet Vu², Thi Thanh Hà Trần¹,
Van Hà Nguyễn¹, Thi Loan Dương¹, Thi Thụy Hoàng¹,
Van Viet Nguyễn¹

¹Crop Research and Development Institute, VNUA

²Faculty of Agronomy, VNUA

Received 12 September 2018; accepted 22 October 2018

Abstract:

The ideotype plant is a combination of different types of biological traits or the genetic basis that refer to the enhanced performance for a particular biophysical environment, adaptation to the stress of high population density. The breeding of maize varieties with erect leaves for high-density cultivation was targeted by the research group of the Crops Research and Development Institute for the period of 2015-2025. Selecting inbred lines in the direction of stand foliage plants applied both traditional methods (inbred, fullsib) and modern methods (MAS, DH). From 2010 to 2016, the group evaluated and selected 5 erect-leaf inbred lines, including B3 (E4), B6, L901, H2161 and T1691 based on the phenotype and molecular markers; and 3 lines including B6, H246, H13412 which had short duration and high yield (above 2.5 ton/ha). The B3, B6, H2161, L901 and T1691 which had a high specific combining ability were parents in some crosses as VNUA36, VNUA17, and VNUA18. VNUA36 was the cross that have compact plant architecture, so it would be adaptable to high-density cultivation. This is the initial success of the research group in breeding a stand foliage hybrid named VNUA36. VNUA36 has been approved and duplicated for production in the Northern Vietnam.

Keywords: density, erect leaf, maize, yield.

Classification number: 4.1

3 năm (2013-2015) trên giống ngô lai DH618 ở mật độ dày từ 120.000-135.000 cây/ha đã cho năng suất trung bình đạt tới 22,5 tấn/ha [6], phá vỡ mọi kỷ lục về năng suất trồng ngô trước đây.

Tại Việt Nam, việc nghiên cứu thay đổi mật độ trồng ngô được Phan Xuân Hào và cs tiến hành nghiên cứu từ năm 2010 [7]. Năm 2006, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật thâm canh ngô lai đạt năng suất trên 7 tấn/ha ở các tỉnh miền Bắc. Trong đó khuyến cáo, với các giống dài ngày nên trồng với mật độ 5,5-5,7 vạn cây/ha, các giống ngắn và trung ngày trồng 6,0-7,0 vạn cây/ha với khoảng cách giữa các hàng là 60-70 cm. Tuy vậy, nhiều nơi bà con nông dân chưa trồng đạt mật độ khuyến cáo, có nơi chỉ đạt khoảng 3 vạn cây/ha, tương đương một sào Bắc Bộ chỉ đạt 1.200-1.300 cây. Đây là một trong những nguyên nhân chính dẫn đến năng suất ngô trong sản xuất của nước ta chỉ mới đạt 30-40% so với năng suất thí nghiệm. Các nghiên cứu về khoảng cách hàng đã được thực hiện ở Việt Nam nhưng còn hạn chế, chỉ dựa theo khuyến cáo của CIMMYT là 70-75 cm. Về mật độ, cũng khuyến cáo dựa vào TGST, đặc điểm hình thái như chiều cao cây, bộ lá. Bộ giống dài ngày, cao cây, lá rậm trồng thưa; bộ giống ngắn ngày, thấp cây, lá thoáng hoặc đứng trồng dày... và tùy theo mùa vụ; nhưng chưa có một nghiên cứu cụ thể về các vấn đề trên ở điều kiện nước ta [7].

Chọn tạo giống ngô kiểu cây mới cho trồng mật độ cao là mục tiêu của nhóm nghiên cứu ngô tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Cây trồng trong giai đoạn 2015-2025. Theo Báo cáo của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (<http://baochinhpvu.vn/Khoa-hoc-Cong-nghe/Ngo-noi-can-mot-cuoc-cach-mang-moi/311930.vgp>), nhu cầu về sử dụng ngô làm thực phẩm, thức ăn chăn nuôi vẫn tăng ở Việt Nam đến năm 2050. Trong khi diện tích trồng ngô trong 5 năm trở lại đây không tăng và có xu hướng giảm, giải pháp sử dụng các giống ngô kiểu cây mới thích ứng với mật độ cao càng trở nên hữu hiệu. Vì vậy, chọn tạo các giống ngô lai kiểu cây mới thích ứng cho trồng dày là cần thiết.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Nguồn gen ngô nhập nội và địa phương được lưu giữ, bảo tồn tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Cây trồng từ năm 2007-2018 trong nhiệm vụ quỹ gen và nhiệm vụ khai thác và phát triển nguồn gen ngô.

Vật liệu gốc lá hẹp là chuyển gen từ Mo17 và B73.

Phương pháp nghiên cứu

+ Phương pháp tạo dòng: tự phối theo phương pháp của Shull (1909).

+ Phương pháp đánh giá khả năng kết hợp sớm: lai đình toàn phần giữa 15 dòng thử với 2 tester theo Devis (1927), Jenkins và Bruce (1932).

+ Phương pháp đánh giá khả năng kết hợp riêng bằng luân giao toàn phần theo Griffing (1956).

+ Thiết kế thí nghiệm so sánh giống bố trí khối ngẫu nhiên (RCBD), ba lần nhắc lại theo phương pháp của A. Gomez (1984).

+ Khảo nghiệm cơ bản, khảo nghiệm DUS và khảo nghiệm sản xuất theo QCVN 01-56:2011/BNNPTNT và QCVN 01-66:2011/BNNPTNT của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả đánh giá và chọn lọc các dòng ngô ưu tú

Vật liệu tạo dòng ngô lá đứng đã được các nhóm nghiên cứu ngô tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Cây trồng phát triển từ nguồn gen ngô địa phương và nhập nội trong giai đoạn 2010-2015. Mỗi vụ tiến hành đánh giá chọn lọc 500-650 dòng dựa trên tính trạng về TGST, độ thuần của các tính trạng số lượng, các tính trạng liên quan đến cấu trúc cây (góc lá), năng suất và chống chịu bất thuận. Vụ xuân 2015, chúng tôi tiến hành đánh giá tổng số 505 dòng ngô tự phối đời S3-S8. Vì các giống ngô ngắn ngày được khuyến cáo có khả năng trồng dày nên mục tiêu đầu tiên là tiến hành chọn các dòng có thời gian từ ngắn đến trung ngày. TGST của các dòng nghiên cứu dao động khá lớn (93-122 ngày), trong đó có 293 dòng thuộc nhóm ngắn ngày, 209 dòng thuộc nhóm trung ngày và 3 dòng còn lại thuộc nhóm dài ngày (theo phân loại của Cao Đắc Điểm, 1998) (bảng 1).

Bảng 1. TGST của các dòng ngô lá đứng trong điều kiện vụ xuân 2015 tại Hà Nội.

Nhóm vật liệu	TGST (ngày)	Số vật liệu nghiên cứu
Ngắn ngày	93-105	293
Trung ngày	106-120	209
Dài ngày	>120	3
Tổng số		505

Góc lá, đặc biệt là các lá trên bắp là chỉ tiêu được đánh giá thứ hai để tiến hành chọn lọc vật liệu cho chọn tạo giống ngô lá đứng. Theo Kiều Xuân Đàm và cs (2002) [8], dựa trên góc lá phân chia các vật liệu nghiên cứu thành 3 nhóm như sau: 1) Nhóm lá đứng có góc lá nhỏ hơn hoặc bằng 30°; 2) Nhóm lá gọn có góc lá nằm trong khoảng 30-35°; 3) Nhóm lá thường có góc lá lớn hơn 35°. Các vật liệu nghiên cứu có góc lá nằm trong khoảng 14,6-40,7°. Nhóm lá đứng chỉ gồm 336/505 vật liệu, nhóm lá gọn có 104/505 vật liệu, có 65 vật liệu thuộc nhóm lá thường. Các vật liệu lá đứng và lá gọn đều thuộc nhóm ngắn đến trung ngày (bảng 2).

Bảng 2. Góc lá của các vật liệu nghiên cứu trong vụ xuân 2015 tại Hà Nội.

Nhóm	Góc lá	Số lượng vật liệu
Lá đứng	30°	336
Lá gọn	31-35°	104
Lá thường	>35°	65

Bảng 3. Phân nhóm năng suất của 505 dòng trong vụ xuân 2015 tại Hà Nội.

Phân nhóm	Số lượng vật liệu
Thấp (<20 tạ/ha)	142
Trung bình (20-25,0 tạ/ha)	308
Khá (25,1-30 tạ/ha)	55
Cao (30,1-35 tạ/ha)	0

Năng suất các dòng dao động 10,1-30,0 tạ/ha trong điều kiện trồng ở mật độ khuyến cáo 57.000 cây/ha. Trong đó, nhóm <20 tạ/ha chiếm 142/505 dòng, nhóm năng suất 20-25,0 tạ/ha chiếm 308/505 dòng, nhóm năng suất trung bình 25,1-30 tạ/ha chiếm 55/505 dòng, không có dòng nào thuộc nhóm năng suất cao (bảng 3). Từ nguồn dòng trên tiến hành chọn lọc ra những dòng ngắn ngày (TGST ≤ 105 ngày), năng suất ≥ 25 tạ/ha và có bộ lá đứng (góc lá ≤ 30°), kết quả đã chọn ra được 51 dòng thỏa mãn yêu cầu đề ra. Các dòng ngô năng suất cao là tiền đề cho khả năng sản xuất hạt lai F₁ hiệu quả.

Từ năm 2015-2016, các dòng ngô lá đứng, TGST ngắn và năng suất dòng khá được đánh giá khả năng kháng bệnh thối thân thối bắp; được kích tạo hạt đơn bội bằng dòng inducer UH400 để tạo dòng đơn bội kép (DH1-DH20) và thử khả năng kết hợp sớm.

Đánh giá khả năng kết hợp của các dòng ngô lá đứng và con lai

Vụ xuân 2015 - thu đông 2016, lần lượt tiến hành 4 khối lai thử khả năng kết hợp chung của 51 dòng với hai cây thử Mo17 và B73. Vụ xuân 2015, đánh giá khả năng kết hợp và sử dụng chỉ thị phân tử SSR để xác định gen *lg1* và *lg2* trên các dòng ngô lá đứng thông qua khối lai thử giữa 8 dòng (E1-E8) với hai cây thử Mo17 và B73 [9]. Kết quả bảng 4 cho thấy, 3 dòng E4, E7, E8 và cây thử Mo17 có giá trị kết hợp chung về tính trạng góc lá (giá trị âm) khi tạo ra con lai có góc lá hẹp; 6 dòng E1, E2, E3, E4, E6 và Mo17 có giá trị kết hợp chung dương về tính trạng năng suất hạt. Sử dụng hai môi *umc1165* và *bnlg1505* để xác định gen *lg1* và *lg2* trên các dòng bố mẹ và con lai trong vụ xuân 2015. Kết quả xác định được dòng bố mẹ, con lai và đối chứng đều chứa gen *lg1*, *lg2* bằng chỉ thị SSR. Đây là chỉ thị phân tử hữu hiệu được sử dụng trong chương trình chọn tạo giống ngô

lai phản ứng tốt với mật độ trồng dày. Như vậy, sau kết quả đánh giá trong vụ xuân 2015, dòng ngô E4 được sử dụng tiếp tục cho chương trình chọn tạo giống ngô lá đứng.

Bảng 4. Giá trị khả năng kết hợp chung của các dòng ngô lá đứng về tính trạng gốc lá, năng suất, chiều cao cây, chiều cao đóng bắp với hai cây thử trong vụ xuân 2015.

Dòng	Giá trị khả năng kết hợp chung (GCA)			
	Gốc lá	Năng suất hạt	Chiều cao cây	Chiều cao đóng bắp
E1	0,492*	0,718*	15,269*	1,021*
E2	0,282 ^{ns}	0,476*	4,044 ^{ns}	1,818*
E3	0,337*	0,498*	12,454 ^{ns}	1,268*
E4	-0,908 ^{ns}	0,463*	6,374 ^{ns}	1,568*
E5	0,657*	-0,742 ^{ns}	-5,306 ^{ns}	-0,732*
E6	0,702*	0,528*	-18,090*	-0,032
E7	-0,533 ^{ns}	-1,919 ^{ns}	-15,896*	-2,832*
E8	-1,028 ^{ns}	-0,022 ^{ns}	1,149 ^{ns}	-2,082*
Mo17	-0,367 ^{ns}	0,047*	-2,568 ^{ns}	-0,469*
B73	0,367*	-0,047 ^{ns}	2,568 ^{ns}	0,469*
CV(%)	0,69	0,055	17,612	0,470
LSD _(0,05)	0,261	0,039	12,453	0,332

ns: năng suất; *: độ tin cậy 95%.

Vụ thu đông 2016, chúng tôi tiến hành luân giao 6 dòng ngô lá đứng (L1-L6) theo mô hình 1 của Griffing thu được 30 con lai F₁, ký hiệu là C1-C30. Vụ xuân 2017, gieo trồng 37 vật liệu bao gồm 30 tổ hợp lai, 6 dòng bố mẹ và đối chứng GS9989 trong một thí nghiệm đánh giá được thiết kế ngẫu nhiên theo khối (RCDB) với 3 lần nhắc lại (kết quả trình bày ở bảng 5, 6). Các dòng tự phối có nguồn gốc Việt Nam, Trung Quốc và Mỹ. Khả năng kết hợp của 6 dòng trong thí nghiệm được xác định dựa trên chỉ tiêu TGST, gốc lá, năng suất thân lá và năng suất hạt khô theo mô hình 1 của Griffing. Dòng L1 với 75% nguồn gốc Việt Nam có khả năng kết hợp cao với dòng L4 (75% nguồn gốc Trung Quốc) và L5 (75% nguồn gốc Mỹ), con lai F₁ đạt năng suất hạt 8,60-9,47 tấn/ha, bộ lá gọn, TGST trung ngày, có khả năng phát triển thành giống ngô thương mại phục vụ chăn nuôi.

Bảng 5. Vật liệu trong thí nghiệm luân giao 6 dòng ngô lá đứng vụ thu đông 2016 tại Hà Nội.

Tên dòng	Ký hiệu	Thành phần sử dụng của các quần thể tạo dòng và thời gian tạo dòng	
		Nguồn gốc quần thể tạo dòng	Số vụ tự phối tạo dòng
H2161	L1	Khẩu lương 2.1.6.1 (Việt Nam)/Mo17 (Mỹ)/Khẩu lương 2.1.6.1 (Việt Nam)	6(2013-2016)
H13412	L2	Tây lương 1.5.1.2 (Việt Nam)/BA(Pioneer, Mỹ)/Tây lương 1.5.1.2 (Việt Nam)	6(2013-2016)
H264	L3	1350 (Quảng Tây, Trung Quốc)/Hủ nú khảo/1350	6(2013-2016)
L901	L4	901 (Hò Nam, Trung Quốc)/Khẩu lương/901	6(2013-2016)
T1691	L5	169 (Mỹ)/Tây lương 1.2.4.3/169	6(2014-2016)
H493	L6	H493(Monsanto, Mỹ)/Bắp Châm /H493	6(2012-2015)

Bảng 6. Giá trị khả năng kết hợp chung và giá trị khả năng kết hợp của 6 dòng bố mẹ về tính trạng gốc lá trong vụ xuân 2017 tại Hà Nội.

Ký hiệu dòng	S _{ij}						G _{ij}
	H2161	H13412	H264	L901	T1691	H493	
L1	-	0,051	3,400	-2,879	-0,849	-1,324	-3,830
L2	-0,747	-	0,882	3,740	-0,303	1,970	-0,524
L3	-5,050	1,000	-	-1,257	1,044*	0,036*	0,603
L4	-0,555	0,777	0,853	-	6,713**	4,568**	3,465
L5	1,4483	-5,020	-0,132	0,108	-	-0,942	-0,415
L6	1,897**	1,597	0,947	0,613	0,347	-	0,701
LSD _(0,05)	0,828						0,363
LSD _(0,01)	1,100						0,482

** : độ tin cậy 99%.

Một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất trong chọn tạo giống ngô là năng suất hạt khô. Do vậy, khả năng kết hợp của 6 dòng ngô tự phối trong các phép lai được tính toán dựa trên năng suất thực thu (tấn hạt khô/ha). Năng suất của các tổ hợp lai thuận nghịch cùng bố mẹ và đối chứng được trình bày ở bảng 7. Kết quả cho thấy, tổ hợp lai thuận (L1xL5) đạt năng suất cao nhất (9,47 tấn/ha) trong điều kiện trồng mật độ 8,3 vạn cây/ha, vượt đối chứng ở mức có ý nghĩa với độ tin cậy 95%. Đây là sự kết hợp giữa một dòng ngô có nguồn gốc Việt Nam (dòng mẹ) với 1 dòng ngô Mỹ và Trung Quốc (dòng bố). Các dòng ngô có nguồn gốc xa nhau về địa lý sinh thái đã cho ưu thế lai cao về năng suất hạt ở phép lai này. Tổ hợp lai L1xL5 được đặt tên là VNUA18.

Bảng 7. Giá trị trung bình của chỉ tiêu năng suất hạt ở độ ẩm 14% (tấn/ha) khi trồng mật độ 8,3 vạn cây/ha trong vụ xuân 2017.

Đơn vị tính: tấn/ha

Ký hiệu dòng	H2161	H13412	H264	L901	T1691	H493
	L1	L2	L3	L4	L5	L6
L1	3,12	6,15	6,64	8,60	9,47	7,58
L2	6,43	2,97	5,84	5,66	5,91	5,63
L3	7,20	5,88	2,67	6,29	7,48	5,77
L4	7,98	6,57	5,84	2,93	8,09	6,39
L5	8,33	6,26	7,70	7,44	2,93	7,79
L6	7,61	5,44	7,06	6,65	6,67	3,25
GS9989	6,96					
LSD _(0,05)	0,34					
CV _%	9,3					

Các phép lai thử khác đã giúp nhóm nghiên cứu chọn lọc các dòng ngô ưu tú như E4, B3, B6, H2161, H13412, T1691, L901, H925, H493, H264, V672... Các dòng B3 (dòng mẹ của tổ hợp lai VNUA36), H2161 (dòng mẹ của tổ hợp VNUA18), L901 (dòng mẹ của tổ hợp VNUA17) đều được mở rộng nền di truyền trên cơ sở các dòng ngô được rút từ quần thể ngô địa phương Khẩu lương, Táy lương (50-75%), bổ sung bằng phép lai lại với các dòng Mo17 và BA (Mỹ). Ngược lại, các dòng B6 và T1691 (dòng bố của 3 tổ hợp lai VNUA36, VNUA17, VNUA18) có nguồn gốc ngoại lai nhưng được bổ sung thêm 25% thông tin di truyền từ các dòng ngô nguồn gốc Việt Nam (bảng 8). VNUA36 được lai tạo và chọn lọc trong vụ xuân 2015, VNUA17 được lai tạo ở vụ xuân 2016, VNUA18 được lai tạo ở vụ xuân 2017 thông qua các khối lai dialen như trình bày ở trên. Công cụ di truyền đánh giá khả năng kết hợp của các dòng tự phối phục vụ tạo giống ngô ưu thế lai chống chịu trồng mật độ cao rất hữu hiệu và kết quả chỉ ra rằng, hệ số tương quan di truyền giữa các tính trạng nghiên cứu và phạm vi hệ số tương quan giữa dòng ngô lá đứng tương ứng với tổ hợp lai của chúng trong thí nghiệm nêu trên hoàn toàn phù hợp với công bố của Al-Naggar và cs (2011) [10].

Bảng 8. Giá trị khả năng kết hợp chung và giá trị khả năng kết hợp riêng của 6 dòng bố mẹ về tính trạng năng suất hạt khô trong vụ xuân 2017.

Ký hiệu dòng	S _{ij}						G _{ij}
	H2161	H13412	H264	L901	T1691	H493	
L1	-	0,189	0,374	1,385	1,528**	0,877	0,624
L2	-0,143	-	0,695	0,586	0,086	0,197	-0,752
L3	-0,280	-0,018	-	0,092	1,147	0,631	-0,310
L4	0,308	-0,453	0,225	-	0,962	0,379	0,054
L5	0,570	-0,178	-0,112	0,327	-	0,671	0,522
L6	-0,015	0,095	-0,645	-0,130	0,557	-	-0,139
LSD _(0,05)	0,146						0,064
LSD _(0,01)	0,194						0,085

** : độ tin cậy 99%.

Kết quả khảo nghiệm và sản xuất giống ngô kiểu cây mới VNUA36

Thành công đầu tiên trong chương trình chọn tạo giống ngô kiểu cây mới thích ứng với điều kiện trồng mật độ cao tại miền Bắc nước ta là giống ngô lai VNUA36. Giống ngô này đã được Hội đồng khoa học cấp cơ sở công nhận sản xuất thử vào tháng 4/2018. Đây là giống ngô lai đơn được tạo ra giữa dòng mẹ B3 và dòng bố B6 do Viện Nghiên cứu và Phát triển Cây trồng chọn tạo năm 2015. VNUA36 sinh trưởng phát triển khỏe, TGST ngắn, chống chịu tốt với sâu bệnh và điều kiện bất thuận, năng suất cao và vượt đối

chứng NK66 trong khảo nghiệm tác giả tại Hà Nội, bộ lá gọn và đặc biệt có khả năng thâm canh ở mật độ dày (80-100 nghìn cây/ha tùy thời vụ) (bảng 9, 10).

Bảng 9. Một số đặc điểm chính của giống VNUA36 và đối chứng NK66 tại Hà Nội.

Vụ	Vật liệu	Chỉ tiêu									
		TGST (ngày)	CCC (cm)	CĐB (cm)	MS hạt	CDB (cm)	ĐKB (cm)	SHH	H/H	Khối lượng 1000 hạt (g)	NSTT (tấn/ha)
Đông 2015	VNUA36	105	213,5	98,7	Vàng	17,1	4,8	15,3	33,6	281,4	7,18
	NK66	107	200,5	100,0	Vàng	16,8	4,4	13,2	33,2	257,3	6,98
Xuân 2016	VNUA36	110	207,3	93,7	Vàng	18,1	4,9	14,9	35,7	272,9	7,32
	NK66	112	191,3	96,3	Vàng	16,5	4,4	13,1	35,2	261,3	7,12

CCC: chiều cao cây; CĐB: cao đóng bắp; MS: màu sắc; CDB: chiều dài bắp; ĐKB: đường kính bắp; SHH: số hàng hạt; H/H: hạt/hàng; NSTT: năng suất thực thu.

Bảng 10. Năng suất hạt khô của giống ngô lai VNUA36 và đối chứng qua hai vụ khảo nghiệm.

Đơn vị tính: tạ/ha

TT	Địa điểm	VNUA36		DK9901 (đ/c)	
		Đông 2016	Xuân 2017	Đông 2016	Xuân 2017
1	Hà Nội	73,14	71,96	76,71	72,00
2	Hải Dương	66,12	-	64,71	-
3	Thái Bình	72,66	77,62	58,22	70,81
4	Vĩnh Phúc	56,90	-	62,86	-
5	Bắc Giang	60,24	79,51	62,24	68,54
6	Thanh Hóa	59,77	70,50	59,47	63,50
7	Nghệ An	69,76	-	63,67	-
Trung bình		65,51	74,90	63,98	68,71

Nguồn: Trung tâm Khảo kiểm nghiệm giống và sản phẩm cây trồng quốc gia 2016, 2017.

Vụ đông 2016, giống ngô lai VNUA36 tham gia mạng lưới khảo nghiệm cơ bản quốc gia tại 7 điểm (Hà Nội, Hải Dương, Thái Bình, Vĩnh Phúc, Bắc Giang, Thanh Hóa và Nghệ An), đến vụ xuân 2017 giống tiếp tục được khảo nghiệm tại 4 điểm (Hà Nội, Thái Bình, Bắc Giang, Thanh Hóa). Năng suất trung bình của giống trong vụ xuân 2017 vượt đối chứng 9%, là một trong 3 giống có năng suất cao nhất trong bộ các giống tham gia 2 vụ khảo nghiệm.

Khảo nghiệm DUS qua vụ xuân 2017 cho thấy, giống VNUA36 khác biệt rõ ràng và chắc chắn so với các giống được biết đến rộng rãi như VS36 với 5 tính trạng khác biệt (bảng 11). Giống có tính đồng nhất do số cây khác dạng trên tổng số cây quan sát là 0/120, không vượt quá số cây khác dạng cho phép.

Bảng 11. Sự khác biệt của giống VNUA36 so với giống tương tự VS36.

Tính trạng	Năm	Giống đăng ký	Giống tương tự	Khoảng cách tối thiểu LSD _{0,05}
21 Cờ: chiều dài trục chính từ nhánh thấp nhất (cm)	2017	38,45	42,65	2,71
23 Cờ: chiều dài nhánh (cm)	2017	23,60	30,35	2,27
24.2 Cây: chiều cao. Đối với giống lai và giống thu phân tự do (kể cả bông cờ) (cm)	2017	264,70	241,65	18,49
27 Bắp: chiều dài cuống	2017	3	5	2
31 Bắp: số hàng hạt	2017	16,10	14,10	1,07

Kết quả khảo nghiệm sản xuất cho thấy, giống VNUA36 thích ứng tốt với điều kiện sinh thái ở cả 5 điểm đại diện cho 3 vùng sinh thái khác nhau (đồng bằng, trung du, miền núi phía Bắc) với TGST trong vụ đông 104-105 ngày, trong vụ xuân 108-110 ngày, ngắn hơn đối chứng LVN61 2-6 ngày. Giống VNUA36 có năng suất cao hơn đối chứng, do đó đem lại lãi suất cao hơn. Cụ thể, trong vụ đông 2016, VNUA36 cho mức lãi 9,45-13,49 triệu đồng/ha, cao hơn giống đối chứng LVN61 13,7-51,7%. Trong vụ xuân 2017, mức lãi của cả 2 giống ngô đều cao hơn vụ đông 2016, giống VNUA36 cho lãi 11,48-15,72 triệu đồng/ha, vượt đối chứng LVN61 19,5-35,4%.

Nhân dòng mẹ B3 và dòng bố B6 rất thuận lợi do hai dòng có độ thuần cao, sức sống tốt, ít nhiễm sâu bệnh, chênh lệch trổ cờ - phun râu (0-4 ngày) hợp lý, khả năng giao và nhận phấn tốt, năng suất dòng mẹ B3 đạt 30-34 tạ hạt khô/ha, năng suất dòng bố B6 đạt 25-28 tạ hạt khô/ha. Sản xuất hạt lai F₁ trong vụ xuân 2017 tại Hà Nội thu được năng suất 31,7 tạ hạt khô/ha do bố trí ngày gieo hợp lý.

Với các giống ngô kiểu cây mới có khả năng thích ứng với trồng mật độ cao, khi đăng ký khảo nghiệm cơ bản hay khảo nghiệm sản xuất cần lưu ý bố trí mật độ và khoảng cách trồng dày sẽ đánh giá được ưu điểm vượt trội của giống, nhất là năng suất quần thể.

Kết luận

Tạo vật liệu và lai thử là hai bước không thể bỏ qua của tất cả các chương trình chọn giống ưu thế lai. Việc chọn tạo các dòng ngô theo hướng kiểu cây mới được áp dụng cả phương pháp truyền thống (dòng tự phối, dòng full-sib) và phương pháp hiện đại (sử dụng chỉ thị phân tử, dòng đơn bội kép - DH). Từ 2010-2016, nhóm nghiên cứu đã đánh giá và chọn lọc các dòng B3 (E4), B6, L901, H2161 và T1691 lá đứng dựa trên kiểu hình và chỉ thị phân tử, các dòng B6, H246, H493, H13412 có TGST ngắn và đều có năng suất khá (>25 tạ/ha). Các dòng B3, B6, H2161, L901 và T1691 có khả năng kết hợp cao, là bố mẹ của các tổ hợp triển vọng

VNUA36, VNUA17, VNUA18.

Để đánh giá các giống ngô kiểu cây mới, nhóm nghiên cứu khuyến cáo bố trí mật độ 8,3-10 vạn cây/ha trong điều kiện vùng Đồng bằng sông Hồng. VNUA36 là kết quả đầu tiên của chương trình chọn tạo giống ngô lai kiểu cây mới thích ứng với trồng dày cho các tỉnh phía Bắc Việt Nam. Giống được khảo nghiệm tác giả (3 vụ), khảo nghiệm cơ bản (3 vụ): thu đông 2016, xuân 2017 và thu đông 2017, đồng thời đang tiến hành khảo nghiệm DUS vụ thứ 2 (xuân 2018). Bên cạnh đó, giống ngô lai mới đều được tổ chức triển khai khảo nghiệm sản xuất tại một số tỉnh thuộc khu vực Đồng bằng sông Hồng (Nam Định, Hải Dương, Hà Nội), khu vực trung du và miền núi (Phú Thọ, Lạng Sơn) và Nghệ An. Giống được công nhận sản xuất thử ở cấp cơ sở vào tháng 4/2018.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Sher, et al. (2017), "Response of maize grown under high plant density; Performance, Issues and Management - a critical review", *Adv. Crop. Sci. Tech.*, **5(3)**, doi: 10.4172/2329-8863.1000275.
- [2] C.M. Donald (1968), "The breeding of crop ideotypes", *Euphytica*, **17(3)**, pp.385-403.
- [3] J.J. Mark, R.B. Pearce (1975), "Ideotype of maize", *Euphytica*, **24**, pp.613-623.
- [4] L. Zhang, et al. (2014), "The ZmCLA4 gene in the qLA4-1 QTL controls leaf angle in maize (*Zea mays* L.)", *Journal of Experimental Botany*, **65(17)**, pp.5063-5076.
- [5] Chunhui Li, et al. (2015), "Genetic Control of the Leaf Angle and Leaf Orientation Value as Revealed by Ultra-High Density Maps in Three Connected Maize Populations", *PLOS ONE*, **10(3)**, p.e0121624, doi: 10.1371/journal.pone.0121624.
- [6] G. Liu, et al. (2017), "Canopy characteristics of high-yield maize with yield potential of 22.5Mg ha⁻¹", *Field Crops Research*, **213**, pp.221-230.
- [7] Phan Xuân Hào (2010), *Một số giải pháp nâng cao năng suất và hiệu quả sản xuất ngô ở Việt Nam*, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- [8] Kiều Xuân Đàm và cs (2002), *Nghiên cứu chọn tạo giống ngô lai lá đứng*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- [9] H.T. Thuy, V.V. Liet, V.T.B. Hanh (2016), "Study on combining ability and SSR markers detecting LG1 and LG2 in erect leaf maize inbred lines with Mo17 and B73 using line x tester mating design", *Academia Journal of Agricultural Research*, **5(10)**, pp.323-330, doi: 10.15413/ajar.2017.0528.
- [10] A.M.M. Al-Naggar, R. Shabana, A.M. Rabie (2011), "Per se performance and combining ability of 55 new maize inbred lines developed for tolerance to high plant density", *Egypt. J. Plant Breed.*, **15(5)**, pp.59-84.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy *in vitro* tới khả năng kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của chủng *Bacillus velezensis* YMĐ1

Nguyễn Văn Giang*, Nguyễn Xuân Cảnh, Phùng Thị Lệ Quyên

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

Ngày nhận bài 12/7/2018; ngày chuyển phản biện 17/7/2018; ngày nhận phản biện 16/8/2018; ngày chấp nhận đăng 28/9/2018

Tóm tắt:

Bệnh đốm nâu trên thân cây và quả Thanh long do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* làm giảm khả năng sinh trưởng, phát triển của cây và chất lượng quả. Nghiên cứu ứng dụng các chủng vi sinh vật đối kháng với nấm *N. dimidiatum* hiện nay có ý nghĩa rất quan trọng để sản xuất Thanh long an toàn và bền vững. Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy *in vitro* tới khả năng đối kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *Bacillus velezensis* YMĐ1. Kết quả nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 sinh trưởng, phát triển, đối kháng tốt với nấm *N. dimidiatum* trong điều kiện nuôi cấy ở nhiệt độ 25-40°C, pH=4-7, thời gian nuôi cấy là 48 giờ, với hoạt lực đối kháng trên 55%. Điều kiện tốt nhất để chủng *B. velezensis* YMĐ1 đối kháng với hoạt lực lên đến 64% là ở nhiệt độ 30°C, pH=6 và thời gian nuôi cấy là 48 giờ. Nguồn carbon và nitơ thích hợp lần lượt là glucose và peptone.

Từ khóa: *Bacillus velezensis*, bệnh trên Thanh long, đối kháng, *Neoscytalidium dimidiatum*.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Hiện nay, nhiều loại bệnh xuất hiện trên thân và quả Thanh long như bệnh đốm nâu do nấm *N. dimidiatum*, bệnh thối thư do nấm *Coletotrichum gloeosporioides*, bệnh thối đầu cành do nấm *Alternaria* sp.. Các bệnh này ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của cây, làm giảm năng suất, chất lượng và giá trị thương phẩm của quả, gây thiệt hại lớn cho người trồng Thanh long. Bệnh đốm nâu do nấm *N. dimidiatum* gây ra là một trong những bệnh hại nghiêm trọng nhất. Bào tử nấm *N. dimidiatum* này mầm trên bề mặt tiếp xúc rồi xâm nhập vào trong mô gây hoại tử, bệnh gây hại cả trên thân cành và quả Thanh long. Bệnh gây hại làm cho cành Thanh long bị sần sùi, gây thối khô từng mảng. Trên quả, những đốm làm cho vỏ quả trở nên sần sùi, thối khô, làm giảm nghiêm trọng giá trị thương phẩm.

Các biện pháp phòng trừ bệnh chủ yếu hiện nay là sử dụng thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc hóa học. Các biện pháp này tác động xấu đến môi trường do dư lượng hóa chất tồn đọng trong đất, nguồn nước và không khí gây nguy hiểm đối với sức khỏe con người và các sinh vật khác. Phòng trừ bệnh cho cây bằng việc sử dụng vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh là biện pháp sinh học đang rất được quan tâm

nghiên cứu. Vấn đề quan trọng sau khi tuyển chọn được chủng vi sinh vật kháng mạnh với nấm *N. dimidiatum* là xác định được các yếu tố môi trường nuôi cấy (nhiệt độ, pH, nguồn carbon và nitơ...) thích hợp để tăng cường hiệu quả đối kháng của chúng.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* YMĐ1 được phân lập và tuyển chọn từ đất vùng rễ trồng Thanh long tại xã Yên Mỹ, huyện Lạng Giang, tỉnh Bắc Giang và đang lưu giữ tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Chủng nấm *N. dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên Thanh long được cung cấp bởi Viện Di truyền Nông nghiệp.

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của pH: vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 được nuôi cấy trên môi trường LB (Luria - Bertani) lỏng trong 48 giờ (trong quá trình làm thí nghiệm, nhóm thực hiện thấy đây là thời gian chủng *B. velezensis* YMĐ1 sinh trưởng tốt nhất - mật độ cao nhất) ở điều kiện nhiệt độ 30°C, các giá

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

Effect of *in vitro* culture conditions of the antagonistic bacterium (*Bacillus velezensis* YMD1) on its ability to protest *Neoscytalidium dimidiatum* fungus

Van Giang Nguyen*, Xuan Canh Nguyen,
Thi Le Quyen Phung

Faculty of Biotechnology,
Vietnam National University of Agriculture

Received 12 July 2018; accepted 28 September 2018

Abstract:

The fungus *Neoscytalidium dimidiatum* caused canker disease on dragon fruit, reducing the growth and development of the plants and the quality of dragon fruits. Nowadays, applications of microorganisms to control diseases on dragon fruit plants play an important role for the safe and sustainable dragon fruit production. This study was carried out with the aim to evaluate the effects of some culture conditions of antagonistic bacterium (*Bacillus velezensis* YMD1) with *N. dimidiatum* including: temperature, pH and medium compositions. The growth of *N. dimidiatum* was inhibited by *B. velezensis* YMD1 when the bacteria were cultured in 48 hours at the temperature of 25-40°C and pH=6-7 *in vitro*. The maximum inhibition activity (64%) of *B. velezensis* YMD1 with *N. dimidiatum* exhibited when the bacteria were cultured in the medium with glucose and peptone at 30°C and pH=6.

Keywords: antagonistic, *Bacillus velezensis*, canker disease on dragon fruit, *Neoscytalidium dimidiatum*.

Classification number: 4.1

trị pH khác nhau (4, 5, 6, 7 và 8). Thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của nhiệt độ: vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 được nuôi cấy trên môi trường NA lỏng trong 48 giờ ở nồng độ pH thích hợp nhất, các điều kiện nhiệt độ khác nhau (25, 30, 37, 40 và 60°C). Thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của nguồn carbon: tiến hành nuôi lỏng vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 trong môi trường muối khoáng cơ bản được bổ sung thêm 1% các loại đường là tinh bột, lactose, dextrin, saccarose, D-sorbitol, mantose, glucose và fructose. Các thí nghiệm được bố trí ở nhiệt độ và pH thích hợp. Sau 48 giờ nuôi cấy, thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ: tiến hành nuôi vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 trên môi trường khoáng cơ bản với nguồn carbon thích hợp nhất và bổ sung 0,1% nguồn nitrogen vô cơ là NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 và nguồn nitơ hữu cơ là pepton, cao nấm men. Các thí nghiệm được bố trí ở nhiệt độ và pH thích hợp. Sau 48 giờ nuôi cấy, thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của nồng độ muối đến sinh trưởng của chủng *B. velezensis* YMD1: nuôi vi khuẩn trên môi trường LB được bổ sung thêm NaCl với các nồng độ khác nhau (1, 2, 3 và 4%) và quan sát khả năng sinh trưởng.

Khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 với nấm *N. Dimidiatum* được tiến hành theo mô tả của Dhanasekaran và cs (2012) [1]. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB lỏng, lắc 200 vòng/phút ở 30°C. Dịch vi khuẩn được thu sau 48 giờ nuôi cấy, ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Nấm được hoạt hóa trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar), dùng que cấy lấy sợi nấm cho vào ống eppendorf chứa 500 µl nước cất vô trùng, vortex để bào tử nấm phát tán đều trong nước. Dùng dụng cụ đục lỗ tạo giếng thạch trên đĩa thạch PDA đã được cấy trải 50 µl dung dịch nấm. Chuyển 100 µl dịch vi khuẩn được ly tâm và 100 µl dịch vi khuẩn không ly tâm vào giếng thạch, ủ đĩa petri thí nghiệm ở 30°C. Dịch vi khuẩn có khả năng ức chế sinh trưởng của nấm được thể hiện thông qua vòng sáng xuất hiện quanh giếng thạch. Hiệu lực đối kháng của vi khuẩn với nấm *N. dimidiatum* được xác định bằng công thức sau:

$$\% \text{ Đối kháng} = [1 - (A/B)] * 100\%$$

Trong đó: A là đường kính vòng đối kháng; B là đường kính giếng thạch (18 mm).

Môi trường

Môi trường LB (g/l): peptone 10 g, cao nấm men 5 g, NaCl 10 g, agar 15 g, nước cất 1 l, pH=7,0.

Môi trường PDA (g/l): potato extract 4 g, dextrose 20 g, agar 15 g, nước cất 1 l, pH=5,6.

Môi trường khoáng cơ bản để khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, KH_2PO_4 0,5 g và nước cất 1 l.

Môi trường khoáng cơ bản để khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ: KH_2PO_4 1,36 g, CaCl_2 0,03 g, NaH_2PO_4 2,13 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, glucose 10 g và nước cất 1 l.

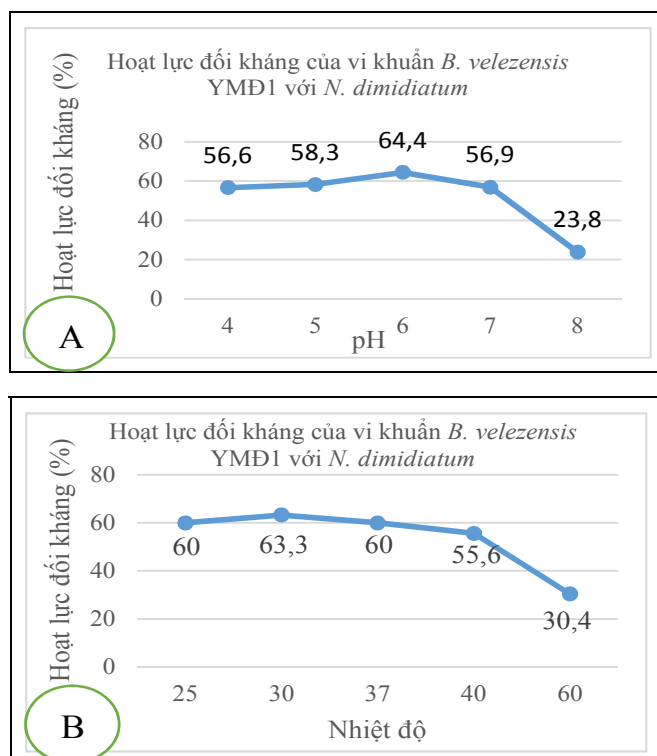
Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của pH môi trường

pH của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng tới nhiều phản ứng được xúc tác bởi enzyme thông qua tác động tới vận chuyển một số sản phẩm qua màng tế bào. Chúng vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 30°C, giá trị pH 4, 5, 6, 7 và 8. Sau 48 giờ nuôi, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm, thu phần dịch nổi để thử khả năng đối kháng theo phương pháp của Dhanasekaran và cs (2012) [1]. Kết quả (hình 1 A) cho thấy, hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 tăng khi pH môi trường trong khoảng 4-6 và đạt giá trị cao nhất (64,4%) tại pH=6. Hoạt lực đối kháng giảm khi pH môi trường vượt quá giá trị này, tại pH=8 hoạt lực đối kháng chỉ đạt 23,8%. Hai chủng vi khuẩn B7 và A3 kháng nấm *N. dimidiatum* được Hà Thị Thúy và cs tuyển chọn năm 2016 cũng sinh trưởng và phát triển tốt tại pH=6-7,5 [2]. Chen Jing và cs (2015) [3] công bố pH thích hợp cho chủng HTN-5 kháng nấm *N. dimidiatum* là 6,8. Điều này có thể được giải thích do các chủng vi khuẩn được phân lập từ các vùng khác nhau, do đó yêu cầu về pH môi trường nuôi cũng khác nhau.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Mỗi loài vi sinh vật có một ngưỡng nhiệt độ thích hợp để sinh trưởng và phát triển, nếu nuôi các loài vi sinh vật ở nhiệt độ quá cao hay quá thấp so với nhiệt độ thích hợp sẽ làm chậm hay ngừng quá trình hoạt động của các phản ứng được xúc tác bởi các enzyme do enzyme bị biến tính hay tốc độ tổng hợp enzyme giảm. Vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 được nuôi tại pH=6, ở các nhiệt độ khác nhau, sau 48 giờ, kiểm tra hoạt lực đối kháng với nấm *N. dimidiatum*. Kết quả thí nghiệm (hình 1 B) cho thấy, hoạt lực đối kháng của vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 tăng từ 60% đến 63,3% khi tăng nhiệt độ từ 25 lên 30°C, sau đó tăng nhiệt độ đã làm giảm

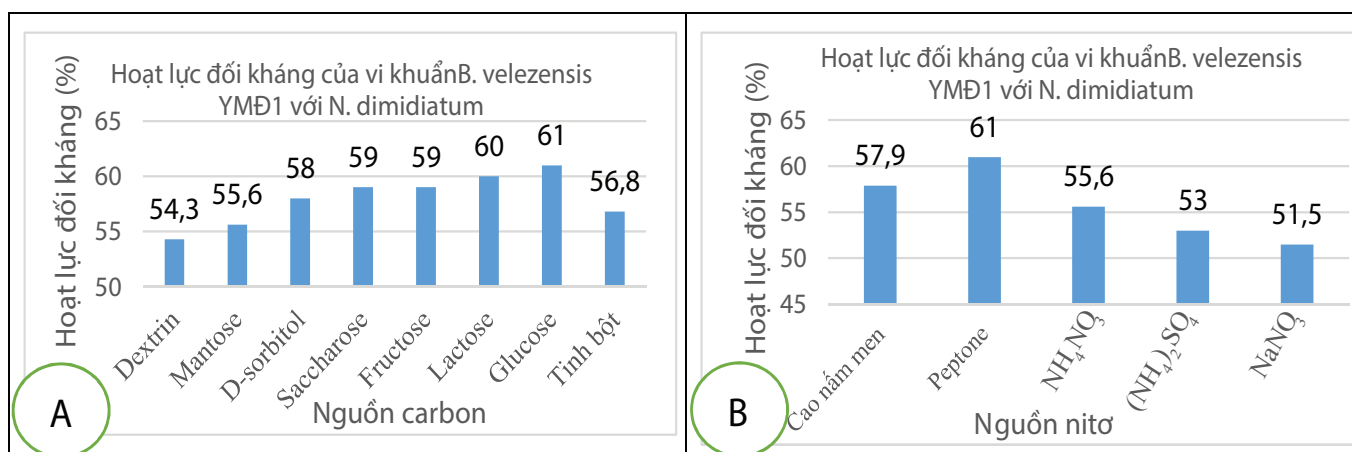


Hình 1. Ảnh hưởng của pH (A) và nhiệt độ (B) môi trường nuôi tới hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1.

hoạt lực đối kháng của vi khuẩn này. Luong Huu Thanh và cs (2016) [4] đã ghi nhận 2 chủng vi khuẩn kháng *N. dimidiatum* được họ phân lập phát triển tốt tại nhiệt độ 35°C.

Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ

Carbon và nitơ là hai nguồn dinh dưỡng cần thiết với vi sinh vật vì chúng tham gia vào thành phần cấu trúc của các phân tử quan trọng như nucleotide, aminoacid, protein. Chính vì vậy, đáp ứng nhu cầu về nguồn carbon, nitơ sẽ giúp cho vi sinh vật phát triển tốt hơn khi được nuôi *in vitro*. Vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 đối kháng nấm *N. dimidiatum* được nuôi trong môi trường muối khoáng cơ bản được bổ sung thêm 1% các nguồn đường gồm glucose, fructose, D-sorbitol, lactose, mantose, saccarose, tinh bột và dextrin tại nhiệt độ 30°C và pH=6. Sau 2 ngày nuôi cấy, thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả hình 2A cho thấy, vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 sử dụng tốt các nguồn carbon này, hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* đạt trên 54%, đặc biệt nếu sử dụng glucose trong môi trường nuôi cấy thì hoạt lực đối kháng của *B. velezensis* YMĐ1 cao nhất (61%). Tuy nhiên, khi sản xuất công nghiệp, cần tìm nguồn carbon có giá thành thấp để thay thế glucose.



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn carbon (A) và nguồn nitơ (B) tới hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *B. Velezensis* YMD1.

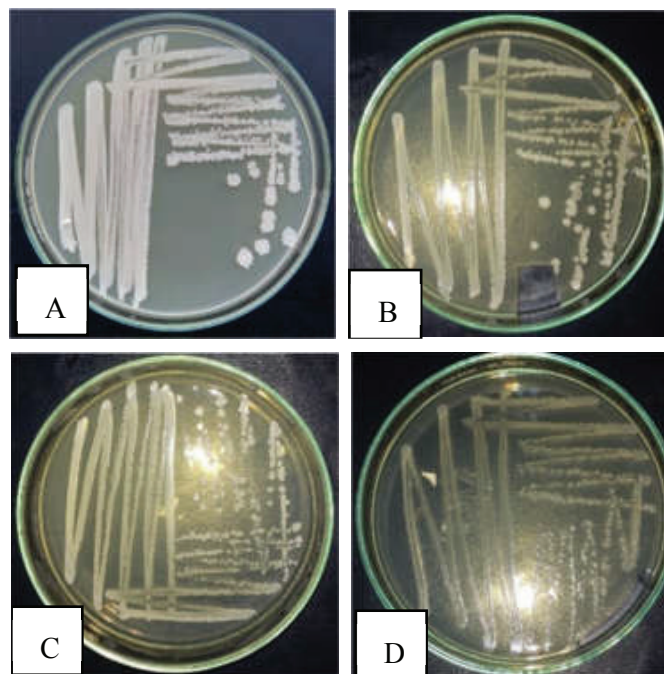
Để khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ tới hoạt lực kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *B. velezensis* YMD1, vi khuẩn được nuôi lỏng trong môi trường khoáng cơ bản có bổ sung các nguồn nitơ là cao nấm men, peptone, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NaNO_3 tại 30°C , $\text{pH}=6$. Sau 48 giờ nuôi, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm, thu phần dịch nổi để kiểm tra hoạt lực đối kháng. Khi được cung cấp các nguồn nitơ hữu cơ, hoạt lực kháng nấm của vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 cao hơn khi được cung cấp nguồn nitơ vô cơ (hình 2B).

Hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* của *B. velezensis* YMD1 cao nhất khi được nuôi trong môi trường có glucose và peptone. Kết quả này tương tự kết quả thí nghiệm của Hà Thị Thúy và cs (2016) [2]. Các tác giả này khi khảo sát các nguồn carbon và nitơ trong môi trường nuôi hai chủng vi khuẩn kháng nấm *N. dimidiatum* cũng kết luận nguồn nitơ thích hợp là cao nấm men và peptone, nguồn carbon là tinh bột, ri đường, cao man, dextrose. Chen Jing và cộng sự (2015) [3] cũng công bố môi trường thích hợp để nuôi chủng vi sinh vật HTN-5 kháng nấm *N. dimidiatum* gồm cao thịt bò, peptone, glucose, lactose, cao nấm men, muối, $\text{pH}=6,8$.

Khả năng chịu mặn của *B. velezensis* YMD1

Ở Việt Nam, đất mặn có diện tích xấp xỉ 2 triệu ha, chiếm gần 6% tổng diện tích đất tự nhiên [5]. Việc khai thác phần diện tích này một cách có hiệu quả phục vụ sản xuất nông nghiệp, ngư nghiệp ngày càng trở nên cấp bách và có ý nghĩa quan trọng đối với nền kinh tế quốc dân. Những năm gần đây, người dân đã chuyển đổi cơ cấu cây trồng, trồng các loại cây thích ứng với đất nhiễm phèn, nhiễm mặn. Tại vùng đất thường bị nhiễm mặn ven sông, ven biển của huyện Gò Công Tây, tỉnh Tiền Giang, cây Thanh long phát triển tốt và cho năng suất cao [6]. Vì thế, để có thể ứng dụng

khả năng đối kháng của vi khuẩn *B. Velezensis* YMD1 với nấm *N. dimidiatum* gây bệnh trên Thanh long thì chủng vi khuẩn được tuyển chọn cũng phải có khả năng chịu mặn tương đối tốt. Vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 được nuôi trên môi trường LB có bổ sung thêm NaCl với các nồng độ từ 1 đến 5% và quan sát sự phát triển của khuẩn lạc (hình 3). Vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 có thể phát triển tốt trên môi trường LB được bổ sung tới 4% muối. Vì vậy, có thể ứng dụng vi khuẩn này trong sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ sản xuất Thanh long tại các vùng đất nhiễm mặn.



Hình 3. Khả năng chịu mặn của chủng vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 ở các nồng độ NaCl khác nhau (A: 1%; B: 2%; C: 3%; D: 4%).

Kết luận

Vì khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 có khả năng đối kháng mạnh với nấm *N. dimidiatum* gây bệnh khi được nuôi cấy ở 30°C trong môi trường khoáng cơ bản lỏng với pH=6, thời gian nuôi cấy là 48 giờ.

Nguồn carbon và nguồn nitơ thích hợp là glucose và peptone.

Chủng *B. velezensis* có thể sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường LB được bổ sung muối với nồng độ lên tới 4%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D. Dhanasekaran, N. Thajuddin, A. Panneerselvam (2012), “Applications of Actinobacterial Fungicides in Agriculture and Medicine”, *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, <https://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/applications-of-actinobacterial-fungicides-in-agriculture-and-medicine>, IntechOpen.

[2] Hà Thị Thủy, Lương Hữu Thành, Vũ Thúy Nga, Hứa Thị Sơn, Tống Hải Vân (2016), “Tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng ức

chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu Thanh long”, *Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ 2*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr.1167-1172.

[3] Chen Jing, Li Shaomei, Xu Xiaoling, Su Tongjie, Xu Yaojie, Xing Yiyuan, Yi Runhua (2015), “Identification of Antagonistic Bacterium against *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Pitaya Canker and Fermentation Medium Optimization”, *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, **10**, pp.64-68, http://caod.orioprobe.com/articles/47133557/Identification_of_Antagonistic_Bacterium_against_Neoscytalidium_dimidi.htm.

[4] Luong Huu Thanh, Nguyen Kieu Bang Tam, Vu Thuy Nga, Tong Hai Van, Hua Thi Son, Nguyen Ngoc Quynh, Nguyen Thi Hang Nga (2016), “Study on the possibility of using microorganisms as biological agents to control fungal pathogens *Neoscytalidium dimidiatum* causing disease of brown spots on the dragon fruit”, *J. Viet. Env.*, **8(1)**, pp.41-44.

[5] <http://www.sonongnghiep.hochiminhcity.gov.vn/tintuc/Lists/Posts/Post.aspx?List=f73cebc3-9669-400e-b5fd-9e63a89949f0&ID=3062>.

[6] <https://www.mard.gov.vn/Pages/trong-thanh-long-tren-dat-nhiem-man-cho-thu-nhap-cao-31446.aspx#>.

Khảo sát sự tích lũy nitrat trong rau muống (*Ipomoea aquatica*) và cải xanh (*Brassica juncea* L.) khi tưới bằng nước thải từ hầm ủ biogas

Nguyễn Lê Phương^{1*}, Nguyễn Võ Châu Ngân², Nguyễn Hữu Chiếm²

¹Ban Quản lý các Khu công nghiệp Hậu Giang

²Khoa Môi trường và Tài nguyên thiên nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 23/5/2018; ngày chuyển phản biện 29/5/2018; ngày nhận phản biện 3/7/2018; ngày chấp nhận đăng 10/7/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu đánh giá hàm lượng nitrat có trong rau muống (*Ipomoea aquatica*), cải xanh (*Brassica juncea* L.) và năng suất rau khi tưới bằng phân vô cơ và bằng nước thải từ hầm ủ biogas nạp phân bò với các liều lượng khác nhau. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên thực hiện liên tiếp qua 3 vụ cho mỗi loại rau với 6 nghiệm thức, trong đó nghiệm thức 1 tưới 100% nước thải biogas, nghiệm thức 2 tưới 75% nước thải biogas + 25% phân vô cơ, nghiệm thức 3 tưới 50% nước thải biogas + 50% phân vô cơ, nghiệm thức 4 tưới 25% nước thải biogas + 75% phân vô cơ, nghiệm thức 5 sử dụng 100% phân vô cơ và nghiệm thức 6 tưới hoàn toàn bằng nước ao. Kết quả cho thấy, năng suất rau muống và cải xanh ở các nghiệm thức có sử dụng nước thải biogas tăng dần qua các vụ. Tại vụ 3, năng suất rau muống khi tưới 100% nước thải biogas (2,9 kg/m²) và năng suất cải xanh khi tưới 100% nước thải biogas, 75% nước thải biogas + 25% phân vô cơ (1,9-2,1 kg/m²) đạt cao nhất và không có sự khác biệt với việc sử dụng hoàn toàn phân vô cơ. Sự tích lũy nitrat ở cả hai loại rau tại từng nghiệm thức không có sự khác biệt qua các vụ canh tác, đồng thời hàm lượng nitrat ở các nghiệm thức sử dụng nước thải biogas kết hợp với phân vô cơ luôn thấp hơn so với sử dụng 100% phân vô cơ. Hàm lượng nitrat thấp nhất đối với rau muống là ở nghiệm thức tưới 100% nước thải biogas (39,4-52,6 mg/kg rau tươi), đối với cải xanh là ở nghiệm thức tưới 75% nước thải biogas biogas + 25% phân vô cơ (32,1-37 mg/kg rau tươi) và đều không có sự khác biệt so với nghiệm thức tưới hoàn toàn bằng nước ao.

Từ khóa: cải xanh, năng suất, nitrate, nước thải biogas, rau muống.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Rau xanh là thực phẩm quen thuộc hàng ngày của mỗi gia đình. Trồng rau cũng trở thành một phần quan trọng trong ngành nông nghiệp ở nước ta. Việc sử dụng phân bón để bón cho cây từ lâu đã trở thành một tập quán của người nông dân, dẫn đến khả năng tồn dư một lượng nitrat trong rau [1]. Nitrat không độc hại nếu dưới mức dư lượng tối đa cho phép, nhưng dư lượng nitrat trong mô thực vật vượt quá ngưỡng an toàn được xem như một độc chất sẽ ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người [2, 3]. Nồng độ nitrat tích tụ cao gây ra chứng methemoglobin máu làm giảm vận chuyển oxy trong máu, đặc biệt nguy hiểm đối với trẻ em dưới sáu tháng tuổi [4]. Các nghiên cứu của Ward, *et al.* (2010, 2011) [5, 6] và báo cáo của ATSDR (2015) [4] cho thấy, nitrat đóng vai trò trong các nguyên nhân làm gia tăng nguy cơ

ung thư. Với những ảnh hưởng của nitrat đối với sức khỏe con người thì vấn đề tồn dư nitrat trong thực phẩm cần được quan tâm.

Nitrat là thành phần tự nhiên của thực vật, và chúng thường có ở mức cao, đặc biệt trong rau xanh [7]. Do tính chất dễ hòa tan và tích hợp, nitrat dễ tồn lưu trong môi trường đất, nước rồi bị hấp thu vào rau củ quả từ việc sử dụng phân bón. Sự tích tụ nitrat phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như sử dụng phân bón, vị trí và loại đất, nồng độ CO₂ (trong rau trồng trong nhà kính), cường độ ánh sáng theo mùa, thời gian tiếp xúc với ánh sáng và lượng nước sẵn có [8]. Nồng độ nitrat trong rau thay đổi phụ thuộc vào loài rau và bộ phận thực vật. Nồng độ nitrat cao có xu hướng tích tụ trong lá, rễ, phiến hoặc thân của một số cây trồng [8, 9]. Theo EFSA (2008) [9], nồng độ nitrat trong lá có xu hướng cao hơn trong củ và hạt, đồng thời lá non có hàm lượng nitrat

*Tác giả liên hệ: Email: nlphuong89@gmail.com

Study on nitrate accumulation in water spinach (*Ipomoea aquatica*) and leaf mustard (*Brassica juncea* L.) fertilised by the biogas effluent

Le Phuong Nguyen^{1*}, Vo Chau Ngan Nguyen²,
Huu Chiem Nguyen²

¹Hau Giang Industrial zones Authority, Hau Giang

²College of the Environment and Nature Resources, Can Tho University

Received 23 May 2018; accepted 10 July 2018

Abstract:

The objective of the study was to compare the content of nitrate in water spinach (*Ipomoea aquatica*) and leaf mustard (*Brassica juncea* L.) and their productivity between being irrigated with inorganic fertilizers and with biogas effluent at different dosages. Three crops for each plant with six treatments were arranged randomly, including irrigating by 100% biogas effluent (1), irrigating by 75% biogas effluent + 25% inorganic fertilizer (2), irrigating by 50% biogas effluent + 50% inorganic fertilizer (3), irrigating by 25% biogas effluent + 75% inorganic fertilizer (4), irrigating by 100% inorganic fertilizer (5), and irrigating by 100% pond water (6). The results showed that the yield of water spinach and leaf mustard in treatments using biogas effluent increased gradually through the crops. In the third crop, the yield of water spinach was highest when irrigated by 100% biogas effluent (at 2.9 kg/m²), and that of leaf mustard was highest when irrigated by 100% biogas effluent as well as 75% biogas effluent + 25% inorganic fertilizer (at 1.9-2.1 kg/m²) and was not different in comparison with the treatment by 100% inorganic fertilizers. There was no significant difference between the accumulation of nitrates in both water spinach and leaf mustard in each treatment, while the nitrate contents in the treatments using combined biogas effluent and inorganic fertilizers were always lower than that of the treatment using 100% inorganic fertilizers. The nitrate content of water spinach was lowest when irrigated by 100% biogas effluent (39.4-52.6 mg/kg fresh vegetable). The leaf mustard's nitrate content was lowest when irrigated by 75% biogas effluent + 25% inorganic fertilizer (32.1-37 mg/kg fresh vegetable). And they had no significant difference compared with the nitrate content of those irrigated by 100% pond water treatment.

Keywords: biogas effluent, leaf mustard, nitrates, productivity, water spinach.

Classification number: 4.1

thấp hơn lá già [10]. Kết quả nghiên cứu của Alexander, *et al.* (2008) [11] cho thấy, hàm lượng nitrat trung bình trong một số loại rau ăn lá khoảng 1614 mg/kg rau tươi, rau ăn quả khoảng 149 mg/kg rau tươi và một số loại đậu khoảng 221 mg/kg rau tươi. Rousta, *et al.* (2010) [12] nghiên cứu trên rau diếp, cà rốt, khoai tây, cà chua cho thấy hàm lượng nitrat trong rau diếp (637-1873 mg/kg rau tươi) luôn lớn hơn các loại còn lại trong cả 3 vụ. Nồng độ nitrat trong các loại rau ăn lá bị ảnh hưởng khi sử dụng phân bón chứa nitơ, hàm lượng nitrat tăng lên theo lượng phân nitơ sử dụng [9], do đó cần tránh sử dụng phân bón nitơ quá mức để giảm sự tích tụ nitrat trong đất và rau [2].

Cải xanh và rau muống là các loại rau ăn lá được sử dụng phổ biến trong các bữa ăn hàng ngày ở nước ta, trong đó rau muống được khoảng 95% hộ gia đình sử dụng [13]. Các nghiên cứu cho thấy, cả hai loại rau này đều có khả năng tích lũy nitrat cao khi được bón phân vô cơ. Nguyễn Minh Trí và cs (2013) [14] khảo sát một số loại rau ăn lá được trồng bằng phân bón vô cơ của các hộ dân tại Hương Long, TP Huế cho thấy, hàm lượng nitrat trong các mẫu rau đều cao hơn so với mức khuyến nghị của WHO (≤ 500 mg/kg rau tươi), với cải xanh là 542 mg/kg rau tươi và rau muống là 637,3 mg/kg rau tươi. Theo nghiên cứu của Santamaria (2006) [2], hàm lượng nitrat trong cải từ 200-500 mg/kg rau tươi. Nguyễn Thị Lan Hương (2013) [15] sử dụng phân đạm amôn 36% N với lượng 14 kg/1000 m², hàm lượng nitrat trong rau muống dao động trong khoảng 169-613,09 mg/kg rau tươi. Tuy nhiên, các nghiên cứu về sự tích lũy nitrat khi sử dụng các loại phân bón hữu cơ đối với các loại rau này ở nước ta lại khá hạn chế. Trong khi đó, những năm gần đây với sự phát triển công nghệ biogas tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, việc sử dụng nước thải từ hầm ủ biogas nạp phân gia súc tưới rau trong đó có các loại rau ăn lá [16] để thay thế một phần việc sử dụng phân bón hóa học ngày càng được quan tâm.

Nước thải biogas có đủ các nguyên tố dinh dưỡng đa lượng, vì lượng có thể sử dụng đối với các loại cây trồng [17]. Phân gia súc là một nguồn cung cấp chất dinh dưỡng và vi chất dinh dưỡng tốt, đặc biệt là nitơ. Nguồn nước thải biogas từ nguồn vật liệu nạp là phân gia súc có hàm lượng dinh dưỡng cao, chứa 1,8-2,4% đạm (N) đối với nguồn nạp là phân bò [18] và theo Văn phòng Dự án khí sinh học Trung ương (2011) [19] trong nước thải biogas chứa 0,5-0,85 gN/l và bã thải biogas có chứa đến 5,6 gN/l đối với nguồn nạp là phân gia súc nói chung và được xem là một nguồn thay thế phân vô cơ hữu hiệu. Theo Veronica (2009) [20] và kết quả nghiên cứu của Viện Nghiên cứu nông nghiệp Bangladesh (BARI) từ năm 2008-2011 [21] cho thấy, sử dụng chất thải

biogas trong thời gian dài giúp duy trì, cải thiện độ màu mỡ của đất, tăng năng suất cây trồng, giúp giảm chi phí phân bón, hạn chế sự suy giảm chất lượng đất canh tác và ô nhiễm môi trường. Đồng thời trong chất thải biogas có chứa hàm lượng dinh dưỡng cao hơn từ 20-30% và giúp tăng 10-30% sản lượng ngũ cốc so với sử dụng phân chuồng [21].

Nghiên cứu này nhằm xác định hàm lượng nitrat tích lũy, năng suất rau khi sử dụng nước thải từ hầm ủ biogas nạp phân gia súc để tưới so với việc sử dụng phân vô cơ trong canh tác rau muống và cải xanh.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu thí nghiệm

Giống rau cải xanh, giống rau muống do Công ty TNHH hạt giống Rạng Đông phân phối.

Nước thải biogas được lấy từ đầu ra túi ủ nạp phân bò với lượng phân nạp hàng ngày của khoảng 4 con bò/túi đã hoạt động ổn định được 3 tháng của hộ nuôi tại xã Đông Phước, huyện Châu Thành, tỉnh Hậu Giang. Nước thải biogas có hàm lượng đạm trong khoảng 387-518 mg/l. Nước thải sau túi ủ được chứa trong túi nylon kín có đường kính 0,8 m, dài 1,5 m, sau đó được lấy trữ lại trong thùng chứa 500 lít sử dụng để tưới cho cây trồng. Trong mỗi vụ, nước thải được thu gom 2 lần, mỗi lần cách nhau khoảng 15 ngày.

Phân bón Urê 46% nitơ mua trên thị trường được sản xuất từ Công ty đạm Phú Mỹ.

Đất trồng cây được lấy từ đất mặt tự nhiên tại khu vực ở độ sâu từ 0,2-0,3 m trở lên, khu vực đất trước thí nghiệm chủ yếu là đất trống có một vài loại cỏ tạp và một số loại cây ăn trái tự nhiên sẵn có, chưa tiến hành canh tác. Đất sau khi được cuốc lên, nhặt hết rễ cây và cỏ lẫn trong đất, phơi trong mát 1 tuần, những cục đất lớn được tán nhỏ bằng chày gỗ. Toàn bộ đất được trộn đều trước khi cho vào các thùng xốp, với lượng 16 kg/thùng, độ cao lớp đất trong thùng khoảng 0,1 m. Sau khi kết thúc từng vụ, đất trong các thùng xốp được giữ nguyên để tiếp tục tiến hành tiếp thí nghiệm cho vụ sau.

Nước tưới rau hàng ngày được lấy từ ao tự nhiên trong khu vực bố trí thí nghiệm, ao có diện tích khoảng 5000 m², thường xuyên lưu thông với rạch tự nhiên tại khu vực.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị cây giống cho thí nghiệm: trong mỗi vụ, lượng giống được gieo đồng đều cho mỗi thí nghiệm thức theo tỷ lệ 10 g/m² đối với rau muống. Đối với cải xanh chuẩn bị khu đất bên cạnh khu vực bố trí các ô thí nghiệm để gieo hạt, sau

khí gieo 15 ngày chọn các cây con có chiều cao tương đối đồng nhất từ 2,4-3,2 cm đem cấy vào ô nghiên cứu với mật độ khoảng 33 cây/m².

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm trồng rau bố trí trong các thùng xốp kích thước 0,6×0,4×0,1 m được trồng qua 3 vụ liên tiếp với cây rau muống và cây cải xanh.

Mỗi loại rau gồm 6 thí nghiệm thức, bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Lượng phân vô cơ và nước thải biogas bón cho rau muống và cải xanh được căn cứ trên tổng lượng nitơ cần cung cấp cho từng loại rau.

- Thí nghiệm thức 1 (100BI): tưới 100% nước thải biogas.
- Thí nghiệm thức 2 (75BI+25VC): tưới 75% nước thải biogas và 25% phân vô cơ.
- Thí nghiệm thức 3 (50BI+50VC): tưới 50% nước thải biogas và 50% phân vô cơ.
- Thí nghiệm thức 4 (25BI+75VC): tưới 25% nước thải biogas và 75% phân vô cơ.
- Thí nghiệm thức 5 (100VC): tưới hoàn toàn bằng phân vô cơ.
- Thí nghiệm thức 6 (đối chứng): chỉ sử dụng nước ao để tưới rau.

Cách tính lượng nitơ bón cho rau được dựa trên lượng phân Urê và NPK cần cung cấp theo khuyến nghị của Nguyễn Thị Trí (2010) [22], Trần Thị Ba (2010) [1] và hàm lượng nitơ trong các loại phân với Urê chứa khoảng 46% nitơ, NPK 16-16-8 chứa 16% nitơ được trình bày tại bảng 1. Dựa trên tổng lượng nitơ cần cung cấp, tính ra lượng phân Urê và nước thải biogas thực tế sử dụng cho từng thí nghiệm thức tại bảng 2 và bảng 3.

Bảng 1. Lượng nitơ cần cung cấp cho cải xanh và rau muống.

Ngày bón phân	Lượng phân cần bón rau muống (g/m ²) (*)	Lượng phân cần bón cải xanh (g/ m ²) (**)		Lượng nitơ cần cung cấp (g/m ²)	
	Urê	Urê	NPK	Rau muống	Cải xanh
7	20			9,2	
10		1	2		0,78
14	20			9,2	
15		2	3		1,4
20		2	3		1,4
21	20			9,2	

Nguồn: (*) theo Nguyễn Thị Trí (2010) [22], (**) theo Trần Thị Ba (2010) [1].

Bảng 2. Lượng phân Urê và nước thải biogas tưới cho các nghiệm thức rau muống ở các vụ.

Nghiệm thức	Lượng phân Urê (g/m ²) và nước thải biogas (l/m ²) tưới					
	Ngày 7		Ngày 14		Ngày 21	
	Biogas	Urê	Biogas	Urê	Biogas	Urê
100BI	19,6-23,7	-	17,7-22	-	18,4-23,5	-
75BI+25VC	14,7-17,8	2,3	13,4-16,5	2,3	13,8-17,6	2,3
50BI+50VC	9,8-11,9	4,6	9-11	4,6	9,2-11,7	4,6
25BI+75VC	4,9-5,9	6,9	4,5-5,5	6,9	4,1-5,9	6,9
100VC	-	9,2	-	9,2	-	9,2

Bảng 3. Lượng phân Urê và nước thải biogas tưới cho các nghiệm thức cải xanh ở các vụ.

Nghiệm thức	Lượng phân Urê (g/m ²) và nước thải biogas (l/m ²) tưới					
	Ngày 10		Ngày 15		Ngày 20	
	Biogas	Urê	Biogas	Urê	Biogas	Urê
100BI	1,5-1,7	-	2,7-3,3	-	2,8-3,6	-
75BI+25VC	1,1-1,3	0,5	2,0-2,5	0,8	2,1-2,7	0,8
50BI+50VC	0,7-0,8	0,9	1,3-1,7	1,5	1,4-1,8	1,5
25BI+75VC	0,4	1,4	0,7-0,8	2,3	0,7-0,9	2,3
100VC	-	1,8	-	3	-	3

Thời gian tiến hành thí nghiệm được thực hiện vào giữa tháng 11, thời gian tiến hành vụ sau cách khoảng 20 ngày sau khi kết thúc vụ trước. Trong quá trình nghiên cứu, trong vụ 1 có mưa một số thời điểm nên có bố trí mái che bằng màng lưới nông nghiệp để hạn chế sự ảnh hưởng của lượng mưa đến các nghiệm thức. Tại vụ 2 và vụ 3 hầu như không có mưa trong suốt quá trình nghiên cứu.

Cây trồng hàng ngày được tưới 1 lần bằng nước ao vào buổi sáng hoặc buổi chiều. Ở mỗi vụ, cây rau muống được bón phân (nước thải biogas và phân Urê) vào các ngày thứ 7, 10, 21 sau khi gieo; cây cải xanh được bón vào ngày 10, 15, 20 sau khi cấy cây con vào thùng xốp. Trước các ngày tưới theo dự kiến, mẫu nước thải được thu và phân tích xác định hàm lượng nitơ để tính toán lượng tưới cho cây. Lượng phân vô cơ được pha vào nước ao (nghiệm thức 100% phân vô cơ) hoặc nước thải biogas (đối với các nghiệm thức kết hợp nước thải biogas) tưới trực tiếp vào gốc để hạn chế sự lây lan của vi khuẩn từ chất thải vào cây trồng [23].

Rau muống và cải xanh sau khi gieo và cấy vào thùng sau 30 ngày tiến hành thu hoạch. Trong quá trình thí nghiệm không phát sinh các bệnh trên rau nên không sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật. Tuy nhiên, vào ngày thứ 18 sau khi gieo (rau muống) và cấy cây con vào thùng (cải xanh)

của vụ thứ 2 có sự tấn công của châu chấu nhưng được phát hiện sớm và được loại bỏ bằng biện pháp thủ công, không sử dụng thuốc phòng trừ.

Phương pháp thu mẫu và phân tích

Năng suất rau: sau khi gieo rau muống và cấy cải xanh lên thùng xốp, quan sát và ghi nhận. Cuối mỗi vụ, toàn bộ rau trong các thùng ở các nghiệm thức được thu hoạch và cân bằng cân 5 kg để xác định năng suất rau. Trong quá trình thu hoạch để xác định năng suất, kết hợp tiến hành thu mẫu phân tích chỉ tiêu NO_3^- trong mẫu rau. Các mẫu rau được nhổ nguyên cây và rửa sạch dưới vòi nước máy.

Thu mẫu phân tích NO_3^- : các mẫu rau sau khi được thu hoạch để xác định năng suất đối với cải xanh chọn ngẫu nhiên 3 cây/thùng, rau muống lấy khoảng 200 g/thùng trên 3 thùng lặp lại của nghiệm thức để tiến hành phân tích NO_3^- . Mẫu cây được loại bỏ rễ chỉ giữ lại phần ăn được để phân tích chỉ tiêu NO_3^- . Mẫu rau sau khi thu thập được đem về phòng thí nghiệm tiến hành phân tích ngay.

Nước thải túi ủ biogas: lấy từ đầu ra của túi ủ, nước thải được chứa trong túi nylon có đường kính 0,8 m, chiều dài 1,5 m và sau đó được lấy trữ lại trong thùng chứa 500 l. Khi thu mẫu, khuấy đều lượng nước trong thùng chứa sau đó thu vào chai nhựa 1 l để phân tích. Nước ao được thu ở độ sâu cách mặt nước 20-30 cm. Mẫu nước thải biogas và nước ao được thu và phân tích vào các ngày thứ 6, 9, 13, 19 của mỗi vụ (trước các ngày tưới). Các mẫu nước thải và nước ao được phân tích các chỉ tiêu pH, tổng N, NO_3^- , NH_4^+ . Phương pháp phân tích các chỉ tiêu trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Phương pháp phân tích mẫu.

STT	Chỉ tiêu	Phương pháp
1	pH	Đo trực tiếp
2	Tổng N	Phân hủy đạm và chưng cất Kjeldahl
3	NO_3^- trong nước	Phương pháp trắc quang với Natri Salicylate
4	NH_4^+ trong nước	Phương pháp Indophenol blue
5	NO_3^- trong rau	Phương pháp so màu ở bước sóng 410 nm với thuốc thử axit phenoldisulfonic trong môi trường kiềm theo TCVN 8742:2011

Phương pháp xử lý số liệu: số liệu thu thập được tổng hợp kết quả và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel 2007. Sử dụng phần mềm SPSS chạy thống kê, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5% để đánh giá sự khác biệt về năng suất, sự tích lũy nitrat ở các nghiệm thức trong từng vụ và giữa các vụ.

Kết quả và thảo luận

Đặc điểm nước thải từ túi ủ biogas, nước ao tưới rau ở các vụ canh tác

Tính chất nước thải biogas và nước ao trong quá trình thí nghiệm được trình bày ở bảng 5. Nguồn nước ao trong suốt quá trình nghiên cứu khá ổn định, các thông số chất lượng không có sự chênh lệch lớn qua các đợt lấy mẫu. Giá trị pH dao động trong khoảng $6,82 \pm 0,2$, nằm trong ngưỡng cho phép của QCVN 8:2015/BTNMT cột B1 [24] quy định chất lượng nước mặt dùng cho mục đích tưới tiêu, thích hợp cho hầu hết các loại cây trồng.

Nước thải biogas có hàm lượng tổng N, NH_4^+ cao. Mặc dù nước thải biogas sử dụng trong thí nghiệm được thu từ túi ủ đã hoạt động ổn định nhưng các thông số chất lượng vẫn có sự dao động khá lớn qua các thời điểm lấy mẫu. Nguyên nhân có thể do ảnh hưởng của việc lưu trữ nước thải và thời điểm lấy mẫu phân tích. Trong điều kiện yếm khí của túi ủ, nitơ chủ yếu tồn tại dưới dạng NH_4^+ . Khi thu gom và lưu trữ trong điều kiện hiếu khí, một phần NH_4^+ trong nước thải đã bị chuyển hóa thành NO_3^- nên có sự dao động giữa hai chỉ tiêu này trong quá trình thí nghiệm. Hàm lượng tổng N nước thải biogas trong thí nghiệm phù hợp với báo cáo của Văn phòng Dự án khí sinh học Trung ương (2011) [19] về chất lượng nước thải túi biogas có nguồn nguyên liệu nạo là phân bò.

Bảng 5. Tính chất nước thải biogas và nước ao trong quá trình thí nghiệm.

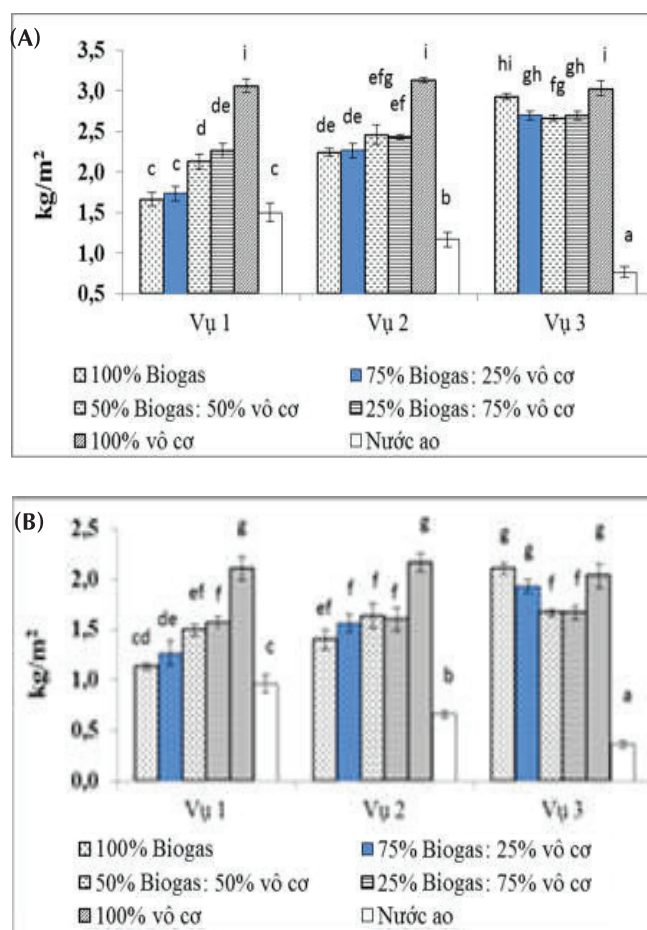
Loại	pH	Tổng N (mg/l)	NO_3^- (mg/l)	NH_4^+ (mg/l)
Nước thải biogas	$6,73 \pm 0,18$	$468,7 \pm 44,1$	$52,3 \pm 22,9$	$207,3 \pm 36,9$
Nước ao	$6,82 \pm 0,2$	$2,65 \pm 0,7$	$1,23 \pm 0,35$	$0,27 \pm 0,08$

Ghi chú: các giá trị trong bảng là giá trị trung bình $\text{mean} \pm \text{SD}$ với số lần lặp lại $n=15$.

Năng suất rau qua các vụ

Kết quả năng suất rau muống và cải xanh qua các vụ được trình bày ở hình 1 cho thấy, các nghiệm thức có sử dụng nước thải biogas để tưới, năng suất cả rau muống và cải xanh đều tăng dần, trong khi các nghiệm thức chỉ sử dụng phân hóa học không có sự khác biệt và nghiệm thức chỉ sử dụng nước ao lại giảm dần qua các vụ. Ở vụ đầu tiên, các nghiệm thức có sử dụng nước thải biogas đều có năng suất thấp hơn nghiệm thức sử dụng hoàn toàn phân vô cơ, trong đó các nghiệm thức sử dụng 100% nước thải biogas có năng suất thấp nhất và không khác biệt với nghiệm thức chỉ sử dụng nước ao. Tại vụ 2, năng suất giữa các nghiệm thức có sử dụng nước thải biogas trong từng loại rau mặc dù có sự chênh lệch nhưng lại không khác biệt có ý nghĩa, dao động trong khoảng $2,2-2,4 \text{ kg/m}^2$ đối với rau muống và $1,4-$

$1,6 \text{ kg/m}^2$ đối với cải xanh nhưng vẫn thấp hơn nghiệm thức sử dụng phân vô cơ. Năng suất các nghiệm thức có sử dụng nước thải biogas tại vụ 3 đều cao hơn các vụ còn lại, trong đó nghiệm thức sử dụng 100% nước thải biogas ($2,9 \text{ kg/m}^2$) của rau muống và nghiệm thức tưới 100% nước thải biogas, 75% nước thải biogas + 25% phân vô cơ ($1,9-2,1 \text{ kg/m}^2$) của cải xanh đạt cao nhất và không khác biệt với nghiệm thức sử dụng hoàn toàn phân vô cơ. Chất thải từ hầm ủ biogas được xem như một dạng phân hữu cơ [25], cây trồng có thể hấp thụ từ 50-60% chất dinh dưỡng từ phân vô cơ, trong khi đó ở phân hữu cơ chỉ vào khoảng 20-30% [10], vì thế các nghiệm thức bón phân hữu cơ sẽ có tác dụng chậm hơn, dẫn đến năng suất rau các nghiệm thức có sử dụng nước thải biogas thấp hơn nghiệm thức bón phân vô cơ trong các vụ đầu. Ngoài ra trong vụ 1, sự quang hợp của rau muống và cải xanh có thể bị hạn chế so với vụ 2 và vụ 3 do việc bố trí mái che để tránh ảnh hưởng của nước mưa trong quá trình thí nghiệm có thể là một trong các nguyên nhân làm năng suất vụ 1 thấp hơn vụ 2 và 3.



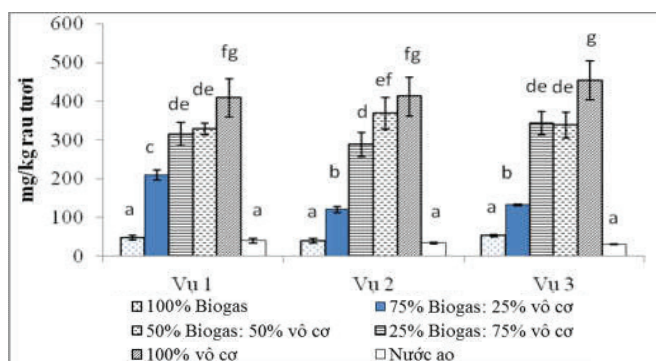
Hình 1. Năng suất rau muống (A) và cải xanh (B) qua các vụ.

Các cột cùng màu hoặc khác màu có cùng ký tự (a, b, c, d, e, f, g, h, i) theo sau không khác biệt có ý nghĩa qua phép thử Duncan.

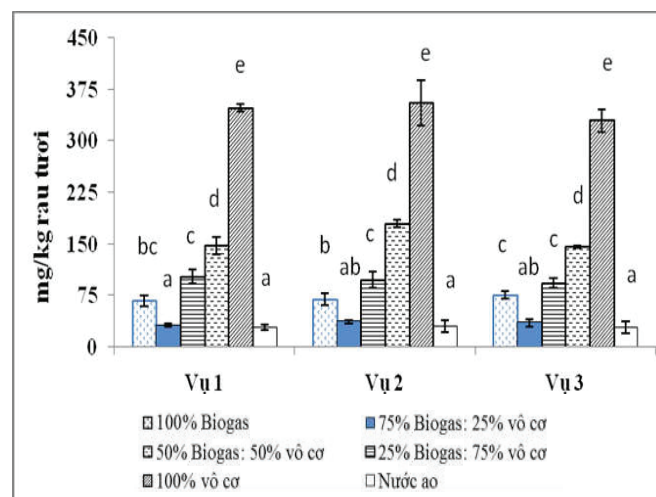
Hàm lượng nitrat tích lũy trong rau qua các vụ

Kết quả phân tích hàm lượng nitrat trung bình qua 3 vụ rau muống và cải xanh được trình bày ở hình 2 và 3. Hàm lượng nitrat trong cải xanh ở tất cả các nghiệm thức đều nằm trong giới hạn cho phép của Liên minh châu Âu (EU) [26] về mức tối đa đối với nitrat trong thực phẩm và giới hạn tối đa theo FAO/WHO (≤ 500 mg/kg rau tươi). Đối với rau muống ở các nghiệm thức có sử dụng từ 25% phân vô cơ trở lên đều có hàm lượng nitrat vượt giới hạn tối đa theo FAO/WHO (≤ 300 mg/kg rau tươi) [14, 27]. Hàm lượng nitrat trong rau sử dụng phân vô cơ thấp hơn trong khảo sát của Nguyễn Minh Trí (2013) [14] cả với cải xanh và rau muống, nhưng tương đương với hàm lượng nitrat trong cải xanh theo nghiên cứu của Santamaria (2006) [2] và cao hơn hàm lượng nitrat trong rau muống tại nghiên cứu của Phạm Quốc Nguyên (2014) [28].

Hình 2. Hàm lượng NO_3^- trong rau muống qua các vụ.



Các cột cùng màu hoặc khác màu có cùng ký tự (a, b, c, d, e, f, g) theo sau không khác biệt có ý nghĩa qua phép thử Duncan.



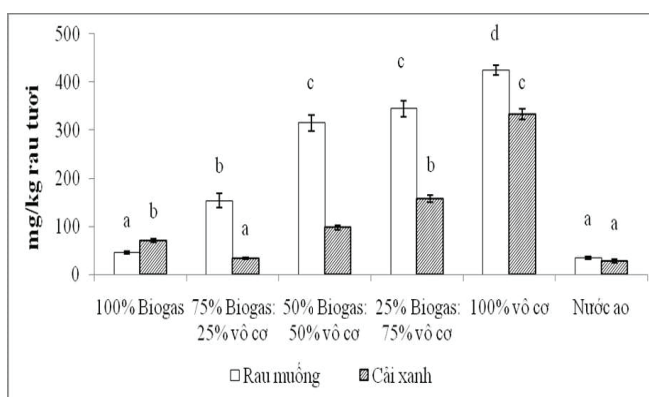
Hình 3. Hàm lượng NO_3^- trong cải xanh qua các vụ.

Các cột cùng màu hoặc khác màu có cùng ký tự (a, b, c, d, e) theo sau không khác biệt có ý nghĩa qua phép thử Duncan.

Kết quả phân tích cho thấy không có sự khác biệt về hàm lượng nitrat trong 2 loại rau nghiên cứu ở cùng một nghiệm thức qua 3 vụ canh tác. Hàm lượng nitrat ở các nghiệm thức tưới nước thải biogas đối với rau muống dao động trong khoảng 46,4-345,3 mg/kg rau tươi, cải xanh là 34,9-158 mg/kg rau tươi và đều thấp hơn các nghiệm thức sử dụng hoàn toàn phân vô cơ, nhưng cao hơn các nghiệm thức chỉ tưới bằng nước ao. Phân vô cơ chứa các dạng đạm cây có thể hút trực tiếp mà không cần qua quá trình phân giải, trong khi đó khi sử dụng nước thải biogas để tưới cho rau có thể do chất hữu cơ trong biogas có nhiều thành phần cần có thời gian phân hủy và giải phóng nên cây trồng hấp thụ một cách từ từ. Bón phân dạng NO_3^- làm tích lũy NO_3^- trong rau cao hơn dạng đạm NH_4^+ [29], nước thải biogas (bảng 5) lại có hàm lượng NH_4^+ chiếm tỷ lệ cao hơn so với NO_3^- . Ngoài ra, dạng NO_3^- lại rất dễ bị rửa trôi. Theo bảng 3 thì lượng nước biogas tưới cho các nghiệm thức lại khá nhiều nên có thể làm cho một phần NO_3^- ở các nghiệm thức có tưới biogas có thể bị mất đi do bị rửa trôi. Những nguyên nhân này có thể dẫn đến nitrat tích lũy trong cây ở các nghiệm thức có sử dụng nước thải biogas thấp hơn.

Hàm lượng nitrat tích lũy trong rau có xu hướng càng giảm khi tăng lượng nước thải biogas tưới. Đối với cải xanh, hàm lượng nitrat tích lũy thấp nhất (32,1-37 mg/kg rau tươi) ở nghiệm thức sử dụng 75% biogas kết hợp với 25% phân vô cơ để tưới và ở nghiệm thức sử dụng hoàn toàn biogas để tưới đối với rau muống (39,4-52,6 mg/kg rau tươi), đồng thời các nghiệm thức này không có sự khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức chỉ tưới bằng nước ao. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hoàng Thị Thái Hòa (2009) [30] sử dụng nước thải biogas để tưới cải xanh cho hàm lượng nitrat tích lũy thấp và tăng dần khi lượng phân vô cơ tăng và theo Nguyễn Cẩm Long (2013) [31] thì hàm lượng nitrat trong cải xanh tăng lên tỷ lệ thuận với lượng đạm vô cơ sử dụng.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Lan Hương (2013) [15], hàm lượng nitrat tích lũy có sự biến động giữa các loài rau và phụ thuộc vào chu kỳ canh tác, những loài rau có chu kỳ canh tác dài ngày lớn hơn so với hàm lượng tích lũy trong các loài rau có chu kỳ canh tác ngắn ngày. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, mặc dù thời gian canh tác (tính từ lúc gieo đến khi thu hoạch) của cây cải xanh (45 ngày) dài hơn so với rau muống (30 ngày) nhưng trong cả 3 vụ hàm lượng nitrat trong cải xanh luôn thấp hơn rau muống ở cùng nghiệm thức tưới, ngoại trừ nghiệm thức tưới hoàn toàn bằng nước thải biogas và bằng nước ao (hình 4). Điều này có thể do nhu cầu và lượng đạm cung cấp cho cải xanh thấp hơn rất nhiều so với rau muống (bảng 1) và với mỗi loại cây trồng khác nhau thì khả năng hấp thụ đạm hữu cơ và vô cơ khác nhau.



Hình 4. Hàm lượng nitrat trung bình trong rau muống và cải xanh.

Các cột cùng màu hoặc khác màu có cùng ký tự (a, b, c, d) theo sau không khác biệt có ý nghĩa qua phép thử Duncan.

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy, việc sử dụng nước thải biogas hoặc kết hợp nước thải biogas và phân vô cơ sẽ hạn chế tích lũy nitrat trong rau. Tỷ lệ kết hợp nước thải biogas và phân vô cơ tốt nhất cho cây để đạt năng suất cao và có hàm lượng nitrat tích lũy thấp nhất là 75% nước thải biogas + 25% phân vô cơ cho cải xanh và sử dụng hoàn toàn nước thải biogas cho rau muống.

Kết luận và kiến nghị

Kết luận

Hàm lượng nitrat trong cải xanh ở các nghiệm thức nằm trong ngưỡng quy định của Liên minh châu Âu (EU) và FAO/WHO. Với lượng sử dụng từ 25% phân vô cơ trở lên cho rau muống thì hàm lượng nitrat trong rau sẽ vượt ngưỡng quy định của FAO/WHO.

Hàm lượng nitrat tích lũy trong cải xanh thấp hơn ở rau muống. Sự tích lũy nitrat ở rau muống và cải xanh không bị ảnh hưởng bởi số lượng vụ canh tác. Các nghiệm thức có sử dụng nước thải biogas đều có hàm lượng nitrat tích lũy thấp hơn so với việc sử dụng hoàn toàn phân vô cơ và hàm lượng nitrat tích lũy có xu hướng càng giảm khi tăng tỷ lệ nước thải biogas sử dụng.

Sử dụng 75% nước thải biogas + 25% phân vô cơ cho cải xanh và 100% nước thải biogas cho rau muống có hàm lượng nitrat tích lũy trong rau thấp nhất và năng suất rau sau 3 vụ không có sự khác biệt với việc sử dụng hoàn toàn phân vô cơ.

Kiến nghị

Cần nghiên cứu ảnh hưởng của chất thải biogas đến chỉ tiêu vi sinh trên rau và sự tích lũy nitrat trên các loại rau ăn lá khác với các liều lượng sử dụng khác nhau, nhằm có những khuyến cáo hợp lý cho người sản xuất và sử dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trần Thị Ba (2010), *Kỹ thuật trồng cải xanh*, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.
- [2] P. Santamaria (2006), "Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation", *J. Sci. Food Agric.*, **86**, pp.10-17.
- [3] F. Savino, S. Maccario, C. Guidi, E. Castagno, D. Farinasso, F. Cresi (2006), "Methemoglobinemia caused by the ingestion of courgette soup given in order to resolve constipation in two formula-fed infants", *Ann. Nutr. Metab.*, **50**, pp.368-371.
- [4] <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=1186&tid=258>, truy cập ngày 24/8/2017.
- [5] M.H. Ward, Briseis A. Kilfoy, Peter J. Weyer, Kristin E. Anderson, Aaron R. Folsom, and James R. Cerhand (2010), "Nitrate Intake and the Risk of Thyroid Cancer and Thyroid Disease", *Epidemiology*, **21(3)**, pp.389-395.
- [6] Ward H. Mary, Kilfoy Briseis, Sinha Rashmi, A.R. Hollenbeck, Schatzkin, Arthur Cross Amand (2011), "Ingestion of Nitrate and Nitrite and Risk of Stomach Cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study", *Epidemiology*, **22 (1)**, pp.107-108.
- [7] M. Correia, A. Barroso, M.F. Barroso, D. Soares, M.B.P.P. Oliveira, C. Delerue Matos (2010), "Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure", *Food Chem.*, **120**, pp.960-966.
- [8] D.N. Maynard, A.V. Barker, P.L. Minotti, N.H. Peck (1976), "Nitrate accumulation in vegetables", *Advances in Agronomy*, **28**, pp.71-118.
- [9] EFSA (2008), "Nitrate in vegetables scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain (Question No EFSA-Q-2006-071)", *The EFSA Journal*, **689**, pp.1-79.
- [10] D.J. Greenwood, J. Hunt (1986), "Effect of nitrogen fertilizer on the nitrate contents of field vegetables grown in Britain", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **37**, pp.373-383.
- [11] J. Alexander, D. Benford, A. Cockburn, J. Cravedi, E. Dogliotti, A.D. Domenico, M.L. Fernández Cruz, J. Fink Gremmels, P. Fürst, C. Galli, P. Grandjean, J. Gzyl, G. Heinemeyer, N. Johansson, A. Mutti, J. Schlatter, R. Leeuwe, C.V. Peteghem, P. Verger (2008), "Nitrate in vegetables Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain", *The EFSA Journal*, **689**, pp.1-79.
- [12] M.J. Roust, E. Lotfi, N. Shamsalam, F. Mousavi, L.S. Heshmati, and S. Ghasemyfard (2010), *Nitrate Situation in some vegetables and the necessity of crop production via organic farming*, Brisbane, Australia.
- [13] Nguyễn Minh Chung, Trần Khắc Thi, Nguyễn Khắc Thái Sơn, Hoàng Minh Châu, Nguyễn Thị An (2012), "Xác định loại dung dịch dinh dưỡng thích hợp để trồng thủy canh một số loại rau ăn lá", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **10(2)**, tr.37-42.
- [14] Nguyễn Minh Trí, Nguyễn Hạnh Trinh, Nguyễn Việt Thắng, Nguyễn Thị Hoàng Phương (2013), *Khảo sát tình hình sản xuất và dư lượng nitrat trên một số sản phẩm rau xanh vụ xuân - hè tại hợp tác xã Hương Long, thành phố Huế*, Hội nghị Khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5, Hà Nội.

- [15] Nguyễn Thị Lan Hương (2013), “Xác định mối tương quan giữa hàm lượng nitơ trong đất với hàm lượng nitrat tích lũy trong một số loại rau xanh”, *Tạp chí các Khoa học về Trái đất*, **35(4)**, tr.418-423.
- [16] Ngô Quang Vinh, Chu Trung Kiên (2010), *Nghiên cứu sử dụng nước xả của các công trình khí sinh học làm phân bón cho rau cải xanh và xả lách ở Đồng Nai*, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam.
- [17] Cao Kỳ Sơn, Trần Thị Mỹ Dung và ctv (2008), *Đánh giá chất lượng nước xả thải từ các công trình khí sinh học để bón cho cây trồng*, Báo cáo nghiên cứu khoa học và công nghệ, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.
- [18] Olusegun A. Ajayi, Sam S. Adefila (2012), “Methanol Production from Cow Dung”, *Journal of Environment and Earth Science* (Online).
- [19] Văn phòng Dự án khí sinh học Trung ương - Cục Chăn nuôi (2011), *Công nghệ khí sinh học quy mô hộ gia đình*, Tài liệu dùng để tập huấn cho kỹ thuật viên về khí sinh học.
- [20] Veronica Arthurson (2009), “Closing the Global Energy and Nutrient Cycles through Application of Biogas Residue to Agricultural Land - Potential Benefits and Drawbacks”, *Energies*, **2**, pp.226-242.
- [21] Aminul Haque ABM (2013), “Bio slurry Ultimate Choice of Biofertilizer”, *Open Access Scientific Reports*, <http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports738>.
- [22] Nguyễn Thị Trí (2010), *Kỹ thuật trồng rau muống*, Chi cục Bảo vệ thực vật TP Hồ Chí Minh.
- [23] Nguyen Vo Chau Ngan, F. Fricke (2015), “Application of co-anaerobic digester’s effluent for sustainable agriculture and aquaculture in the Mekong Delta”, *Vietnam, Environmental Technology*, **36(23)**, pp.2991-2999.
- [24] Bộ Tài nguyên và Môi trường (2015), *Thông tư số 65/2015/ BTNMT ngày 21/12/2015 về việc ban hành QCVN 08-2015/BTNMT - Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước mặt*.
- [25] Nguyễn Quang Khải (2009), *Công nghệ khí sinh học - Hướng dẫn xây dựng, vận hành bảo dưỡng và sử dụng toàn diện khí sinh học và bã thải*, Nxb Lao động - Xã hội.
- [26] EU (2011), “COMMISSION REGULATION (EU) No 1258/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for nitrates in foodstuffs (Text with EEA relevance)”, *Official Journal of the European Union*, **OJ L 320**, pp.15-17.
- [27] <http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/en/index.html>.
- [28] Phạm Quốc Nguyên, Nguyễn Văn Bé, Nguyễn Văn Công (2014), “Xác định số lượng, chất lượng bùn đáy ao nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmas*) và sử dụng trong canh tác rau”, *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **35**, tr.78-89.
- [29] Chuphan, Bengtsson, Bosun, Hymo (1967), “Nitrat accumulation in vegetable crops as influenced by soil fertility practies”, *Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull.*, **920**, p.43.
- [30] Hoàng Thị Thái Hòa (2009), *Nghiên cứu ảnh hưởng của sử dụng các loại phân bón đến hàm lượng nitrat trong đất và trong một số loại rau ăn lá chính trên đất phù sa huyện Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên - Huế*, Báo cáo tổng kết đề tài khoa học công nghệ cấp bộ, mã số B2009-DHH02-43, Trường Đại học Nông lâm Huế.
- [31] Nguyễn Cẩm Long, Nguyễn Minh Hiếu, Trần Đăng Hòa (2013), “Ảnh hưởng của mật độ trồng đến sinh trưởng, năng suất và hàm lượng nitrat đối với cải xanh (*Brasica juncea* L.) tại Quảng Bình”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **7**, tr.61-67.

Hiệu quả kinh tế của mô hình chăn nuôi giống vịt biển 15 - Đại Xuyên sinh sản

Lê Thị Mai Hoa*, Nguyễn Văn Duy, Vương Thị Lan Anh,
Mai Hương Thu, Nguyễn Văn Tuấn

Trung tâm Nghiên cứu vịt Đại Xuyên, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 2/7/2018; ngày chuyển phản biện 6/7/2018; ngày nhận phản biện 17/8/2018; ngày chấp nhận đăng 4/9/2018

Tóm tắt:

Vịt biển 15 - Đại Xuyên (gọi là vịt biển 15) được Trung tâm Nghiên cứu vịt Đại Xuyên triển khai mô hình chăn nuôi vịt biển sinh sản ở các tỉnh/thành phố Quảng Ninh, Hải Phòng, Ninh Bình cho kết quả rất tốt. Tỷ lệ nuôi sống của vịt >98%, khối lượng cơ thể 8 tuần tuổi đạt 1.905,22-1.950,02 g/con, ở 20 tuần tuổi khối lượng cơ thể đạt 2.583,18-2.648,53 g/con. Các chỉ tiêu về sinh sản của vịt biển 15 đều đạt cao: tuổi đẻ 21-22 tuần tuổi, khối lượng vào đẻ 2.591,12-2.648,31 g, tỷ lệ đẻ 67,51-68,31%, năng suất trứng/mái/52 tuần đẻ đạt 246,79-248,63 quả, tiêu tốn 3,37-3,51 kg thức ăn/10 quả trứng. Hiệu quả kinh tế nuôi vịt biển 15 sinh sản thu lãi >250.000 đồng/con. Chăn nuôi vịt biển 15 đem lại hiệu quả kinh tế cao cho người dân, góp phần phát triển kinh tế và giữ vững chủ quyền biển đảo ở nước ta.

Từ khóa: hiệu quả kinh tế, mô hình, vịt biển 15 - Đại Xuyên.

Chỉ số phân loại: 4.2

Đặt vấn đề

Việt Nam là nước nằm trong khu vực Đông Nam của châu Á, có bờ biển dài hơn 3.200 km (từ Quảng Ninh ở phía Đông Bắc đến Kiên Giang ở phía Tây Nam) và bao gồm 4.000 hòn đảo lớn nhỏ (<https://petrotimes.vn/khai-quat-ve-bien-cua-viet-nam-181305.html>) là điều kiện thuận lợi cho phát triển kinh tế (với diện tích ven biển như trên có nuôi được khoảng 500 triệu con vịt các loại). Vì vậy, đây là tiềm năng rất lớn để phát triển chăn nuôi vịt ở vùng ven biển và hải đảo. Trong những năm qua, công tác giống thủy cầm đã đạt được nhiều tiến bộ, công tác chọn lọc, lai tạo đã đưa ra được nhiều dòng, giống mới có năng suất và chất lượng cao, đem lại hiệu quả cao trong sản xuất. Vịt biển 15 là giống vịt có thể sống được trong môi trường nước ngọt, nước lợ và nước mặn. Vịt biển 15 có năng suất trứng đạt cao (247,56-248,25 quả/mái/52 tuần đẻ), khối lượng cơ thể khi nuôi vỗ béo đến 8 tuần tuổi đạt 2.199-2.296 g/con, tỷ lệ thịt xẻ đạt trên 69%, chất lượng thịt thơm ngon [1].

Từ những đặc tính ưu việt của giống vịt biển 15 và định hướng trong thời gian tới của chăn nuôi thủy cầm, Trung tâm Nghiên cứu vịt Đại Xuyên đã xây dựng mô hình chăn nuôi giống vịt biển 15 tại Quảng Ninh, Hải Phòng và Ninh Bình nhằm đánh giá hiệu quả kinh tế đối với chăn nuôi giống vịt biển này.

*Tác giả liên hệ: binhhoa114@gmail.com

Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vịt biển 15 sinh sản.

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2016 đến 12/2017, theo dõi 3 mô hình chăn nuôi vịt sinh sản tại 3 địa phương ở 2 vụ thay thế ban đầu là vụ xuân - hè và thu - đông (gọi tắt là vụ xuân - hè và thu - đông) cụ thể như sau: i) Công ty Cổ phần khai thác khoáng sản Thiên Thuận Trường, thị xã Cẩm Phả, huyện Cẩm Phả, tỉnh Quảng Ninh; ii) Gia đình ông Đoàn Văn Vươn, xã Vinh Quang, huyện Tiên Lãng, TP Hải Phòng; iii) Gia đình bà Lê Thị Lan, xã Văn Hải, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình.

Nội dung nghiên cứu

Đánh giá khả năng sinh sản, hiệu quả kinh tế của 3 mô hình chăn nuôi giống vịt biển 15 sinh sản tại Quảng Ninh, Hải Phòng và Ninh Bình với 2 vụ xuân - hè và thu - đông.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp bố trí thí nghiệm: thí nghiệm bố trí xây dựng 3 mô hình chăn nuôi vịt biển 15 sinh sản tại Quảng Ninh, Hải Phòng, Ninh Bình với số lượng mỗi mô hình nuôi sinh sản là 120 vịt trống và 600 vịt mái 1 ngày tuổi (bảng 1).

Effect of production and economic efficiency of duckling breeding model 15 - Dai Xuyen products

Thi Mai Hoa Le*, Van Duy Nguyen,
Thi Lan Anh Vuong, Huong Thu Mai, Van Tuan Nguyen
Daixuyen Duck Breeding and Research Centre, NIAS

Received 2 July 2018; accepted 4 September 2018

Abstract:

Sea Duck 15 - Dai Xuyen is also call Sea Duck 15 which the Dai Xuyen Duck Breeding and Research Center has implemented a demonstration farm to raise in Quang Ninh, Hai Phong and Ninh Binh provinces and got good results. The survival rate of duck was more than 98%; the body weight was from 1,905.22 to 1,950.02 g/duck at the age of 8 weeks, and from 2,583.18 to 2,648.53 g/duck at the age of 20 weeks. The maturity age was 21-22 weeks; the body weight at first laying was from 2,591.12-2,648.31 g/duck; the laying rate was 67.51-68.31%; the egg production/female/52 laying weeks was 246.79-248.63 eggs; FCR/10 eggs was 3.37-3.51 kg. The economic efficiency of the demonstration farm raising Sea Duck 15 reached over VND 250,000 per duck. Raising Sea Duck 15 - Dai Xuyen can bring a high economic efficiency for farmers, and contribute to the economic development and protection of the island in Vietnam.

Keywords: demonstration farm, economic efficiency, sea duck 15 - Dai Xuyen.

Classification number: 4.2

Bảng 1. Số lượng vịt nuôi thí nghiệm sinh sản.

Giai đoạn	Quảng Ninh		Hải Phòng		Ninh Bình	
Vịt con	60 trống + 300 mái	60 trống + 300 mái	60 trống + 300 mái	60 trống + 300 mái	60 trống + 300 mái	60 trống + 300 mái
Hậu bị	55 trống + 285 mái	55 trống + 285 mái	55 trống + 285 mái	55 trống + 285 mái	55 trống + 285 mái	55 trống + 285 mái
Sinh sản	50 trống + 250 mái	50 trống + 250 mái	50 trống + 250 mái	50 trống + 250 mái	50 trống + 250 mái	50 trống + 250 mái
Mùa vụ	Xuân - hè	Thu - đông	Xuân - hè	Thu - đông	Xuân - hè	Thu - đông

Chọn điểm xây dựng mô hình: chọn địa điểm phù hợp, có tính đại diện để nhân rộng, dễ dàng cho việc tổ chức các buổi gặp mặt, tập huấn tại mô hình, đồng thời địa điểm đó phải phù hợp với quy hoạch sử dụng đất ở địa phương. Khoảng cách từ trại chăn nuôi đến khu dân cư, các công trình xây dựng, nguồn nước, trại chăn nuôi khác theo quy định của Nhà nước đã được ban hành.

Các hộ tham gia mô hình phải đáp ứng các yêu cầu: i) Có đủ điều kiện về chuồng trại: chuồng trại cách xa nhà ở, có tường hoặc rào ngăn cách để hạn chế mầm bệnh xâm nhập, đảm bảo thông thoáng về mùa hè, ấm áp về mùa đông, có nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng phù hợp với từng giai đoạn tuổi, đảm bảo về diện tích ao bơi. Diện tích chuồng phù hợp với số lượng. Máng ăn, máng uống được sử dụng đủ số lượng và đúng chủng loại; ii) Cam kết đầu tư vốn (có khả năng đối ứng) cho mô hình phù hợp với yêu cầu kỹ thuật của dự án. Chưa nhận hỗ trợ bất kỳ nguồn kinh phí nào từ ngân sách nhà nước cho cùng một nội dung của mô hình. Tự nguyện tham gia dự án và cam kết tuân thủ quy trình kỹ thuật, các hướng dẫn, các quy định của dự án. Các hộ đã và đang nuôi vịt càng lâu năm càng tốt.

Tổ chức thực hiện mô hình và giám sát kiểm tra định kỳ.

Hỗ trợ kỹ thuật cho các hộ tham gia mô hình: thường xuyên theo dõi để giúp hộ tham gia mô hình làm được theo những nội dung đã hướng dẫn theo cách cầm tay chỉ việc và theo phương thức “nông dân chuyển giao cho nông dân”.

Phương pháp chăm sóc nuôi dưỡng: vịt sinh sản được nuôi theo quy trình nuôi vịt biển 15 của Trung tâm Nghiên cứu vịt Đại Xuyên trong điều kiện như nhau ở mỗi địa phương, vịt được nuôi riêng rẽ vào 2 vụ xuân - hè và thu - đông với phương thức nuôi nhốt có nước bơi lội trên nước mặn. Thức ăn được sử dụng trong mô hình là thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh với thành phần dinh dưỡng trong thức ăn, lượng thức ăn cho ăn theo bảng 2.

Bảng 2. Chế độ dinh dưỡng và chăm sóc vịt sinh sản.

Chỉ tiêu	Giai đoạn 1 ngày tuổi đến 8 tuần tuổi	Giai đoạn 9-20 tuần tuổi	Giai đoạn >20 tuần tuổi
Protein thô (%)	20-21	14-14,5	17-17,5
ME (kcal/kg)	2.850-2.900	2.850-2.900	2.650-2.700
Chế độ ăn	Hạn chế	Hạn chế	Tự do

Vịt biển 15 nuôi để sinh sản được cho ăn hạn chế theo định lượng trong bảng 3.

Bảng 3. Lượng thức ăn cho vịt biển 15.

Ngày tuổi	g/con/ngày	Ngày tuổi	g/con/ngày
1	4	18	72
2	8	19	76
3	12	20	80
4	16	21	84
5	20	22	88
6	24	23	92
7	28	24	96
8	32	25	100
9	36	26	104
10	40	27	108
11	44	28-56	112
12	48	57-70	120
13	52	71-84	128
14	56	85-98	136
15	60	99-112	144
16	64	113-126	152
17	68	127-133	160

Các chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ nuôi sống qua các tuần tuổi (%), khối lượng cơ thể qua các tuần tuổi (g) [2].

Một số chỉ tiêu về sinh sản: khối lượng cơ thể vịt khi vào đẻ, tuổi đẻ, năng suất trứng/mái/52 tuần đẻ, tiêu tốn thức ăn/10 quả trứng, khối lượng trứng, tỷ lệ phôi... [2].

Tiêu tốn thức ăn/kg tăng khối lượng (kg), giá bán/kg, chênh lệch thu - chi, các chỉ tiêu về hiệu quả kinh tế [3].

Phương pháp xử lý số liệu: số liệu thu được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học, sử dụng phần mềm Minitab 16 và Excel 2016.

Kết quả và thảo luận

Tỷ lệ nuôi sống của vịt biển

Kết quả theo dõi tỷ lệ nuôi sống của vịt biển 15 được trình bày tại bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ nuôi sống (TLNS) của vịt biển 15 ở 2 vụ xuân - hè và thu - đông.

Tuần tuổi	Quảng Ninh		Hải phòng		Ninh Bình	
	<i>n</i>	TLNS (%)	<i>n</i>	TLNS (%)	<i>n</i>	TLNS (%)
Vụ xuân - hè						
0	360	100,00	360	100,00	360	100,00
4	358	99,44	356	98,89	357	99,17
8	355	98,61	354	98,33	353	98,06
12	353	98,06	353	98,06	351	97,50
16	353	98,06	353	98,06	351	97,50
20	353	98,06	352	97,78	351	97,50
Trung bình 0-8		98,61		98,33		98,06
Trung bình 9-20		98,06		97,78		97,50
Vụ thu - đông						
0	360	100,00	360	100,00	360	100,00
4	356	98,89	359	99,72	355	98,61
8	356	98,89	356	98,89	354	98,33
12	355	98,61	353	98,06	352	97,78
16	353	98,06	352	97,78	352	97,78
20	352	97,78	350	97,22	352	97,78
Trung bình 0-8		98,89		98,89		98,33
Trung bình 9-20		97,78		97,22		97,78

Kết quả bảng 4 cho thấy, tỷ lệ nuôi sống của vịt biển 15 ở giai đoạn vịt con đều đạt cao trên 98,06%, giai đoạn vịt hậu bị tỷ lệ nuôi sống của vịt biển 15 ở vụ xuân - hè cao hơn vụ thu - đông. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi là cao hơn so với nghiên cứu trên vịt Đại Xuyên PT của Nguyễn Đức Trọng và cs (2011), Đặng Vũ Hòa (2014) [4, 5] có tỷ lệ nuôi sống giai đoạn 0-8 tuần tuổi đạt 97,78-98%. Tỷ lệ nuôi sống này là cao hơn hẳn các giống vịt khác của các hộ đã nuôi như vịt Bầu cánh trắng, Bầu Hà Lan... Điều này cho thấy, điều kiện chăm sóc nuôi dưỡng của các hộ là rất tốt, cùng với đó chất lượng con giống của Trung tâm thích nghi tốt với điều kiện môi trường vùng ven biển, có sức chống chịu bệnh tật cao với quy trình chăm sóc thú y an toàn dịch bệnh của Trung tâm Nghiên cứu vịt Đại Xuyên.

Khối lượng cơ thể của vịt biển

Kết quả bảng 5 cho thấy, nuôi đến 8 tuần tuổi khối lượng cơ thể vịt biển 15 đạt 1.905-1.950 g/con. Nuôi đến 20 tuần tuổi khối lượng cơ thể vịt biển 15 đã tăng lên 2.583-2.648 g/con. Khối lượng cơ thể vịt biển 15 nuôi ở vụ thu - đông là cao hơn so với vụ xuân - hè ở hầu hết các tuần tuổi.

Bảng 5. Khối lượng cơ thể của vịt biển 15 nuôi tại vụ xuân - hè và thu - đông (n=30).

Tuần tuổi	Quảng Ninh		Hải Phòng		Ninh Bình	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Vụ xuân - hè						
0	51,15	0,55	51,12	0,78	51,36	0,63
4	813,52	9,91	815,25	10,15	834,00	10,59
8	1.921,21	9,18	1.905,22	9,89	1.931,18	10,18
12	2.121,43	9,66	2.145,43	10,15	2.136,36	11,28
16	2.490,07	12,83	2.515,70	12,59	2.533,42	10,78
20	2.583,18	13,49	2.601,25	14,98	2.618,22	13,57
Vụ thu - đông						
0	52,26	0,73	51,26	0,87	52,63	0,93
4	858,15	8,59	857,26	10,32	821,5	10,65
8	1.940,30	10,69	1.936,40	10,98	1.950,02	10,21
12	2.211,71	11,35	2.245,35	11,83	2.202,18	11,59
16	2.567,62	12,47	2.589,74	12,15	2.515,24	12,63
20	2.648,53	13,19	2.631,23	13,07	2.610,32	13,89

Một số chỉ tiêu sinh sản của vịt biển 15 nuôi tại mô hình

Kết quả theo dõi một số chỉ tiêu sinh sản của vịt biển 15 được trình bày tại bảng 6.

Bảng 6. Một số chỉ tiêu sinh sản của vịt biển 15.

Chỉ tiêu	ĐVT	Quảng Ninh		Hải Phòng		Ninh Bình	
		Xuân - hè	Thu - đông	Xuân - hè	Thu - đông	Xuân - hè	Thu - đông
Tuổi đẻ	tuần	22	22	21	22	22	22
KL vịt vào đẻ	g	2.591,12	2.648,31	2.600,11	2.631,35	2.619,32	2.612,19
TL đẻ	%	68,31	66,83	68,05	67,15	67,51	67,92
NST/mái/52 tuần đẻ	quả	248,63	245,31	247,71	246,54	246,79	247,12
TTTA/10 quả trứng	kg	3,37	3,46	3,49	3,51	3,37	3,47
KL trứng	g	82,57	84,97	82,9	84,15	83,89	83,67
TL phôi	%	92,17	93,15	92,19	93,67	91,03	91,78
TL hao hụt (nuôi sinh sản)	%	2,67	2,30	2,33	2,50	1,67	2,70

Ghi chú: KL là khối lượng; NST là năng suất trứng; TTTA là tiêu tốn thức ăn; TL là tỷ lệ.

Kết quả bảng 6 cho thấy, tuổi đẻ của vịt biển 15 ở vụ thu - đông (22 tuần tuổi) là muộn hơn so với vịt nuôi ở vụ xuân hè (21-22 tuần tuổi), khối lượng vịt vào đẻ dao động trong khoảng 2.591-2.648 g, với tỷ lệ đẻ trung bình của đàn vịt nuôi vụ xuân - hè tại Ninh Bình, Hải Phòng, Quảng Ninh là 67,51-68,31%, tương ứng với năng suất trứng/mái/52 tuần đẻ của vịt biển 15 là 246,79-248,63 quả, tiêu tốn 3,37-3,49 kg thức ăn/10 quả trứng. Vịt nuôi ở vụ thu - đông có tỷ lệ đẻ trung bình 66,83-67,92%, năng suất trứng/mái/52 tuần đẻ là 245,31-247,12 quả, tiêu tốn 3,46-3,51 kg thức ăn/10 quả trứng. Theo Nguyễn Hồng Vĩ và cs (2011) [6], dòng vịt chuyên trứng Khaki Campbell được chọn lọc có tuổi vào đẻ là 142-143 ngày với khối lượng 1.409-1.430 g. Theo Nguyen Van Trong và cs (2014) [7], vịt mái Triết Giang nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu vịt Đại Xuyên và các tỉnh Đồng bằng Bắc Bộ có tuổi đẻ là 17 tuần và khối lượng vào đẻ từ 1.080,7 đến 1.084,7 g. Vịt biển 15 trong nghiên cứu của chúng tôi có tuổi vào đẻ là muộn hơn vịt Khaki Campbell, Triết Giang, nhưng khối lượng vào đẻ cao hơn.

Như vậy, vịt biển 15 nuôi vụ thu - đông có các chỉ tiêu về khối lượng cơ thể cao hơn vụ xuân - hè, năng suất trứng/mái thấp hơn vụ xuân - hè, tương ứng với tiêu tốn nhiều thức ăn hơn vịt nuôi ở vụ xuân - hè. Các chỉ tiêu về khối lượng trứng, tỷ lệ phôi của vịt biển 15 nuôi tại các mô hình đều đạt tiêu chuẩn chất lượng giống.

Hiệu quả kinh tế của 3 mô hình chăn nuôi vịt biển 15 sinh sản tại Quảng Ninh, Hải Phòng, Ninh Bình

Kết quả theo dõi sơ bộ về hiệu quả kinh tế của dự án được trình bày ở bảng 7, 8. Cụ thể: kết quả bảng 7 cho thấy, với mô hình vịt sinh sản ở vụ xuân - hè (số lượng 250 mái và 50 đực) khi lên sinh sản hạch toán hiệu quả kinh tế sơ bộ thu lãi đạt được 256.992-308.596 đồng/con (tính trên sản phẩm thu được là vịt con nuôi thương phẩm), đạt cao nhất tại mô hình chăn nuôi của Công ty Cổ phần khai thác khoáng sản Thiên Thuận Trường (Quảng Ninh). Các chỉ tiêu về hiệu quả kinh tế của vịt đạt cao, với lợi nhuận thu được là 75.812.639-90.110.110 đồng, giá trị lợi nhuận thu được/tổng chi phí tại Ninh Bình, Hải Phòng, Quảng Ninh đạt lần lượt là 0,145, 0,154 và 0,172.

Bảng 7. Hiệu quả kinh tế của mô hình nuôi vịt biển 15 sinh sản ở vụ xuân - hè.

Chi tiêu	ĐVT	Quảng Ninh	Hải Phòng	Ninh Bình
Số con đầu kỳ	con	360	360	360
Số con lên đẻ	con	300	300	300
Tỷ lệ nuôi sống	%	98,06	97,78	97,50
Số lượng cuối kỳ	con	292	293	295
Phần chi	đồng	522.941.977	522.847.650	523.292.035
Giá con giống	đồng	30.000	30.000	30.000
Tiền giống	đồng	10.800.000	10.800.000	10.800.000
Tiền thuốc thú y, thuốc sát trùng	đồng	68.036.000	68.269.000	68.735.000
Tổng khối lượng thức ăn	kg	29.577	29.678	29.694
Thức ăn (giai đoạn vịt con)	kg	1.707	1.711	1.725
Thức ăn (giai đoạn vịt hậu bị)	kg	4.210	4.237	4.259
Thức ăn (giai đoạn vịt sinh sản)	kg	23.660	23.730	23.710
Tiền thức ăn	đồng	266.195.952	267.102.000	267.246.000
Số công lao động	công	540	540	540
Tiền công lao động	đồng	70.800.000	70.140.000	69.160.000
Đệm lót (trấu, phoi bào)	đồng	4.896.000	4.800.000	4.850.000
Tiền điện, nước, vật rẻ dụng cụ	đồng	15.000.000	14.250.000	16.750.000
Khấu hao chuồng trại	đồng	58.000.000	59.000.000	57.000.000
Thuê ấp trứng	đồng	29.214.025	28.486.650	28.751.035
Phần thu	đồng	613.052.087	603.462.542	599.104.674
Số lượng vịt loại thải lúc chọn giống	con	48	47	48
Tổng khối lượng vịt loại thải chọn giống	kg	87,84	87,42	88,80
Giá bán vịt loại thải/kg	đồng	35.000	35.000	35.000
Tổng thu vịt loại thải	đồng	3.074.400	3.059.700	3.108.000
Tổng khối lượng vịt loại đàn	kg	759	776	773
Giá bán vịt loại đàn/kg	đồng	37.000	37.000	37.000
Tổng thu vịt loại đàn	đồng	28.090.400	28.728.650	28.597.300
Vịt con thương phẩm	con	44.761	43.975	43.646
Tổng thu từ bán vịt thương phẩm	đồng	581.887.287	571.674.192	567.399.374
Chênh lệch thu chi	đồng	90.110.110	80.614.892	75.812.639
Thu lãi/con	đồng	308.596	275.136	256.992
Các chỉ tiêu về hiệu quả kinh tế				
Giá trị sản xuất (GO)		613.052.087	603.462.542	599.104.674
Chi phí trung gian (IC)		394.141.977	393.707.650	397.132.035
Tổng chi phí (TC)		522.941.977	522.847.650	523.292.035
Giá trị gia tăng (VA)		218.910.110	209.754.892	201.972.639
Thu nhập hỗn hợp (MI)		160.910.110	150.754.892	144.972.639
Lợi nhuận (Pr)		90.110.110	80.614.892	75.812.639

Giá trị sản xuất/CP trung gian (GO/IC)	1,555	1,533	1,509
Giá trị gia tăng/CP trung gian (VA/IC)	0,555	0,533	0,509
Thu nhập hỗn hợp/CP trung gian (MI/IC)	0,408	0,383	0,365
Thu nhập hỗn hợp/Tổng CP (Lr/TC)	0,308	0,288	0,277
Thu nhập hỗn hợp/Lao động (MI/LD)	297,982	279,176	268,468
Lợi nhuận/TC (Pr/TC)	0,172	0,154	0,145

Ghi chú: CP là viết tắt của chi phí.

Kết quả bảng 8 cho thấy, hạch toán hiệu quả kinh tế nuôi vịt biển 15 sinh sản ở vụ thu - đông tại Công ty Cổ phần khai thác khoáng sản Thiên Thuận Trường (Quảng Ninh) là 269.027 đồng/con, cao hơn là hộ gia đình ông Đoàn Văn Vươn, Hải Phòng thu lãi 281.233 đồng, cao nhất là hộ nuôi gia đình bà Lê Thị Lan, tỉnh Ninh Bình đạt 318.223 đồng. Các chỉ tiêu về hiệu quả kinh tế của vịt đạt cao; lợi nhuận thu được là 78.555.942-92.921.080 đồng, giá trị lợi nhuận thu được/tổng chi phí tại Quảng Ninh, Hải Phòng, Ninh Bình đạt lần lượt là 0,15, 0,158 và 0,179.

Bảng 8. Hiệu quả kinh tế của mô hình nuôi vịt biển 15 sinh sản ở vụ thu - đông.

Chi tiêu	ĐVT	Quảng Ninh	Hải Phòng	Ninh Bình
Số con đầu kỳ	con	360	360	360
Số con lên đẻ	con	300	300	300
Tỷ lệ nuôi sống	%	97,78	97,22	97,78
Số lượng cuối kỳ	con	292	291	292
Phần chi	đồng	524.252.270	518.780.640	518.925.160
Giá con giống	đồng	30.000	30.000	30.000
Tiền giống	đồng	10.800.000	10.800.000	10.800.000
Tiền thuốc thú y, thuốc sát trùng	đồng	68.036.000	67.803.000	68.036.000
Tổng khối lượng thức ăn	kg	29.773	29.800	29.810
Khối lượng thức ăn (giai đoạn vịt con)	kg	1.780	1.792	1.798
Khối lượng thức ăn (giai đoạn vịt hậu bị)	kg	4.258	4.269	4.271
Khối lượng thức ăn (giai đoạn vịt sinh sản)	kg	23.735	23.739	23.741
Tiền thức ăn	đồng	267.957.000	268.200.000	26.8290.000
Công lao động	công	540	540	540
Tiền công lao động	đồng	70.800.000	70.140.000	69.160.000
Đệm lót (trấu, phoi bào)	đồng	4.958.000	4.890.000	4.790.000
Tiền điện, nước, vật rẻ	Đồng	16.500.000	15.380.000	15.890.000
Khấu hao chuồng trại	đồng	56.500.000	57.370.000	57.110.000
Thuê ấp trứng	đồng	28.701.270	28.598.640	29.160.160
Phần thu	đồng	602.808.212	600.619.549	611.846.240
SL vịt loại thải lúc chọn giống	con	42	39	36

Tổng khối lượng vịt loại thái chọn giống	kg	78	70	66
Giá bán vịt loại thái/kg	đồng	35.000	35.000	35.000
Tổng thu vịt loại thái	đồng	2.719.500	2.457.000	2.293.200
Tổng khối lượng vịt loại đàn	kg	768	771	777
Giá bán vịt loại đàn/kg	đồng	37.000	37.000	37.000
Tổng thu vịt loại đàn	đồng	28.414.520	28.532.550	28.738.640
Vịt con thương phẩm	con	43.975	43.818	44.678
Tổng thu từ bán vịt thương phẩm	đồng	571.674.192	569.629.999	580.814.400
Chênh lệch thu chi	đồng	78.555.942	81.838.909	92.921.080
Thu lãi/con	đồng	269.027	281.233	318.223
Các chỉ tiêu về hiệu quả kinh tế				
Giá trị sản xuất (GO)		602.808.212	600.619.549	611.846.240
Chi phí trung gian (IC)		396.952.270	391.270.640	392.655.160
Tổng chi phí (TC)		524.252.270	518.780.640	518.925.160
Giá trị gia tăng (VA)		205.855.942	209.348.909	219.191.080
Thu nhập hỗn hợp (MI)		149.355.942	151.978.909	162.081.080
Lợi nhuận (Pr)		78.555.942	81.838.909	92.921.080
Giá trị sản xuất/CP trung gian (GO/IC)		1,519	1,535	1,558
Giá trị gia tăng/CP trung gian (VA/IC)		0,519	0,535	0,558
Thu nhập hỗn hợp/CP trung gian (MI/IC)		0,376	0,388	0,413
Thu nhập hỗn hợp/Tổng CP (Lr/TC)		0,285	0,293	0,312
Thu nhập hỗn hợp/Lao động (MI/LD)		276,585	281,442	300,150
Lợi nhuận/Tổng CP (Pr/TC)		0,150	0,158	0,179

Như vậy, khi chăn nuôi biển vịt sinh sản sẽ mang lại lợi nhuận rất cao cho người nông dân ở các tỉnh ven biển, thu lãi từ 256.992 đến 318.223 đồng/con, đem lại hiệu quả kinh tế cao đối với người chăn nuôi hiện nay. Từ thực tế thực hiện mô hình cho thấy, giống vịt biển 15 sinh trưởng và phát triển rất phù hợp với điều kiện khí hậu tại các tỉnh ven biển ở nước ta, cho hiệu quả kinh tế cao, đem lại lợi nhuận cho người nông dân. Triển khai áp dụng giống vịt chịu nước mặn rộng rãi sẽ góp phần thúc đẩy phát triển kinh tế, tạo công ăn việc làm, an sinh xã hội cho người dân.

Kết luận

Mô hình chăn nuôi vịt biển 15 sinh sản tại Quảng Ninh, Hải Phòng, Ninh Bình ở 2 vụ xuân - hè và thu - đông có các chỉ tiêu về tỷ lệ nuôi sống đến 8 tuần tuổi đạt cao trên 98,06%, ở giai đoạn vịt hậu bị tỷ lệ nuôi sống đạt trên

97,22%. Khối lượng cơ thể vịt khi vào đẻ đạt 2.591,12-2.648,31 g/con, tỷ lệ đẻ trung bình đạt 66,83-68,31%, với năng suất trứng/mái/52 tuần đẻ 245,31-248,63 quả, tiêu tốn 3,37-3,51 kg thức ăn/10 quả trứng; chỉ tiêu về tỷ lệ phôi cao trên 91%, khối lượng trứng từ 82-85 g. Hạch toán hiệu quả kinh tế sơ bộ của mô hình chăn nuôi vịt biển 15 sinh sản thu lãi từ 256.992 đến 318.223 đồng/con.

Triển khai áp dụng rộng rãi chăn nuôi vịt chịu mặn góp phần thúc đẩy phát triển kinh tế vùng ven biển và hải đảo, tạo thêm việc làm và thu nhập cho người dân và phát triển an sinh xã hội, góp phần bảo vệ chủ quyền biển đảo.

Với những kết quả đạt được, đề nghị tiếp tục chuyển giao vịt biển 15 vào sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Văn Duy, Vương Thị Lan Anh, Mai Hương Thu, Đồng Thị Quyên và Đặng Thị Vui (2015), *Một số đặc điểm ngoại hình và khả năng sản xuất của vịt biển 15*, Báo cáo khoa học, Viện Chăn nuôi.
- [2] Bùi Hữu Đoàn, Nguyễn Thị Mai, Nguyễn Thanh Sơn, Nguyễn Huy Đạt (2011), *Một số chỉ tiêu dùng trong nghiên cứu gia cầm*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [3] Đỗ Kim Chung, Phạm Văn Đình, Trần Văn Đức, Quyền Đình Hà (1997), *Giáo trình Kinh tế nông nghiệp*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [4] Nguyễn Đức Trọng, Nguyễn Văn Duy, Vương Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Thúy Nghia, Lê Thị Mai Hoa, Đặng Vũ Hòa, Hoàng Văn Tiệp (2011), *Chọn lọc ổn định năng suất vịt Đại Xuyên PT*, Báo cáo khoa học, Viện Chăn nuôi.
- [5] Đặng Vũ Hòa (2014), *Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, khả năng sản xuất của vịt Đốm (Pát Lài) và con lai giữa vịt Đốm với vịt T14 (CV - Super M3)*, Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Viện Chăn nuôi.
- [6] Nguyễn Hồng Vĩ, Lê Thị Phiên, Hồ Khắc Oánh, Nguyễn Thị Thủy Nghia và Đồng Thị Quyên (2011), “Chọn lọc để ổn định năng suất của dòng vịt chuyên trứng Khaki Campbell (K1)”, *Tuyển tập các công trình nghiên cứu và chuyển giao tiến bộ kỹ thuật chăn nuôi vịt - ngan*, Viện Chăn nuôi.

[7] Nguyen Van Trong, Nguyen Van Duy, Hoang Van Tieu, Dang Thi Vui, Nguyen Thi Thuy Nghia, Pham Van Chung, Dong Thi Quyên (2014), “Characteristics and productivity of Trietgiang duck breed kept in Vietnam”, *Journal of Animal Sciences and Technology*, **46**, pp.55-62.

Nghiên cứu đa dạng di truyền của đoạn gen *matK* ở một số nguồn gen nhãn Việt Nam

Nguyễn Thị Ngọc Lan^{1*}, Nguyễn Thị Lan Hoa², Nguyễn Thị Thanh Thủy³, Lê Tuấn Nghĩa²

¹Viện Di truyền Nông nghiệp

²Trung tâm Tài nguyên Thực vật

³Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

Ngày nhận bài 18/9/2018; ngày gửi phản biện 20/9/2018; ngày nhận phản biện 12/11/2018; ngày chấp nhận đăng 15/11/2018

Tóm tắt:

Kết quả nghiên cứu đa dạng trình tự đoạn gen *matK* gồm 829 nucleotid của tập đoàn 31 mẫu giống nhãn Việt Nam đã xác định được đột biến dị hoán (T>G) tại vị trí 939 của gen ở 11 giống (N10 - Nhãn Bản Nguyên, N14 - Long Gia Sắn, N16 - Tiêu Vững Tàu, N17 - Tiêu Da Me, N19 - Nhãn Sài Gòn, N22 - Cơm Vàng Bánh Xe, N26 - Xuồng Cơm Ráo, N28 - Long Tiêu, N29 - Xuồng Cơm Vàng Bà Rịa, N30 - Xuồng Cơm Trắng và N32 - Nhãn Vững Tàu). Những đột biến này có ý nghĩa trong việc nhận dạng các mẫu giống nhãn của nước ta. Các trình tự này đã được đăng ký NCBI với số đăng ký lần lượt là: KR073235, KR073239, KR073240, KR073241, KR073243, KR073245, KR073249, KR073251, KR073252, KR073253 và KR073255. Kết quả nghiên cứu cây phả hệ theo phương pháp Neighbour Joining cho thấy, các trình tự của chi *Dimocarpus* được nhóm thành công và phân biệt rõ ràng với trình tự của chi *Litchi*, *Arytera*, *Sapindoidaea* và *Cupaniopsis* trong họ Sapindaceae. 11 trình tự nhãn (N10, N14, N16, N17, N19, N22, N26, N28, N29, N30, N32) được tách biệt rõ ràng với các trình tự của nhãn Việt Nam và các nguồn gen đại diện khác.

Từ khóa: ADN mã vạch, giải trình tự, *matK*, nhãn.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Cây nhãn thuộc chi *Dimocarpus*, họ Sapindaceae, bộ Sapindales, là loài cây ăn quả nhiệt đới có giá trị kinh tế cao. Ở nước ta, nhãn được trồng phổ biến và tập trung tại một số vùng, tạo thành các vùng chuyên canh với nhiều giống nhãn nổi tiếng như nhãn lồng Hương chi, nhãn Đường phèn (Hưng Yên), nhãn Cùi (Lào Cai), Nhãn Tiêu Da Bò (Bà Rịa - Vũng Tàu), nhãn Xuồng Cơm Vàng (Tiền Giang)... Các giống nhãn Việt Nam với hương vị thơm ngon đã nổi tiếng trên thế giới và trở thành một trong những mặt hàng xuất khẩu chủ lực của nước ta. Do vậy, công tác bảo tồn và sử dụng bền vững tài nguyên di truyền cây nhãn là vô cùng quan trọng và cấp bách. Việc lưu giữ nguồn gen không chỉ phục vụ cho việc chọn giống mà còn nhằm tìm hiểu mối quan hệ di truyền gần gũi hay đặc trưng của các nguồn gen. Cũng giống như nhiều loài thực vật khác, những tiêu chí kiểu hình không phù hợp để phân biệt được các giống nhãn và việc áp dụng chỉ thị phân tử nhằm xác định chính xác các giống là cách tiếp cận tốt hơn nhằm nâng cao hiệu quả quản lý và sử dụng nguồn gen cây nhãn [1]. Trong khi chỉ

thị SNP dựa trên trình tự ADN cho cây nhãn bắt đầu được quan tâm ứng dụng [2] thì các mã vạch ADN lại chưa được phát triển và phổ biến rộng rãi trong phân tích xác định các giống nhãn. Gần đây, Hiệp hội Mã vạch cho cuộc sống (The Consortium for the barcode of life-CBOL) đã thành lập nhóm nghiên cứu với đại diện của các đơn vị, tổ chức trong lĩnh vực phát triển mã vạch ADN thực vật nhằm đánh giá các đoạn gen/trình tự tiềm năng [3]. Trình tự gen *matK* có tỷ lệ tiến hóa cao nhất trong các gen nên có khả năng phân biệt cao [4]. Chính vì vậy, việc lựa chọn đoạn gen *matK* để tiến hành khuếch đại và xác định trình tự nucleotit là cơ sở khoa học cần thiết nhằm phục vụ cho việc nhận dạng các nguồn gen nhãn, từ đó góp phần nâng cao hiệu quả quản lý, bảo tồn và chọn tạo các nguồn gen quý.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: 31 mẫu giống nhãn được lưu giữ tại các vườn bảo tồn của các đơn vị nghiên cứu thuộc Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam (bảng 1).

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

Genetic diversity of *matK* gene in Vietnam's longan germplasm

Thi Ngoc Lan Nguyen^{1*}, Thi Lan Hoa Nguyen²,
Thi Thanh Thuy Nguyen³, Tuan Nghia La²

¹Agricultural Genetics Institute

²Plant Resources Center

³Ministry of Agriculture and Rural Development

Received 18 September 2018; accepted 15 November 2018

Abstract:

The genetic diversity survey on the *matK* gene segment of 829 nucleotides among 31 Vietnam's longan samples has identified transversion mutation (T>G) at the 939 downstream position of the sequences in 11 longan samples, which might be the molecular identification to distinguish Vietnam longan varieties with others. These *matK* nucleotide sequences have been registered with NCBI codes (KR073235- Ban Nguyen, KR073239- Long Gia San, KR073240- Tieu Vung Tau, KR073241- Tieu Da Me, KR073243- Nhan Sai Gon, KR073245- Com Vang Banh Xe, KR073249- Xuong Com Rao, KR073251- Long Tieu, KR073252- Xuong Com Vang Ba Ria, KR073253- Xuong Com Trang and KR073255- Nhan Vung Tau). The phylogenetic tree analysed by the Neighbour Joining method based on the 829 nucleotides of *matK* gene has exactly grouped all surveyed sequences. In addition, this analysis has also clearly separated the *Dimocarpus* and the *Litchi*, *Arytera*, *Sapindoidaea*, and *Cupaniopsis* in Sapindaceae. Eleven longan sequences (N10, N14, N16, N17, N19, N22, N26, N28, N29, N30, N32) have been distinguished with the Vietnam's longan and other reference sequences.

Keywords: *Dimocarpus longan*, DNA barcode, *matK*, sequencing.

Classification number: 4.6

Bảng 1. Danh sách các mẫu giống nhãn nghiên cứu.

ID ¹	ID ²	Tên giống	ID ¹	ID ²	Tên giống
GBVNML1.131	N1	Hương chi	GBVNML18.572	N18	Tiêu lá bầu
GBVNML1.140	N2	Nhãn lồng chín sớm	GBVNML18.578	N19	Nhãn Sài Gòn
GBVNML1.126	N3	Nhãn lồng Hưng Yên chín muộn	GBVNML18.577	N20	Tiêu lá dài
GBVNML1.132	N4	HTM1	GBVNML18.569	N21	Nhãn Cùi
GBVNML1.144	N5	HTM2	GBVNML18.574	N22	Cơm Vàng Bánh Xe
GBVNML1.146	N6	Nhãn lồng Hưng Yên chính vụ	GBVNML18.570	N23	Cùi diếc
GBVNML1.129	N7	Nhãn Trư Lương	GBVNML18.571	N24	Long Hưng Yên
GBVNML1.127	N8	Nhãn Đoàn Hùng 3	GBVNML18.565	N25	Thái Long Tiêu
GBVNML1.125	N9	Nhãn Mỹ Đức	GBVNML18.585	N26	Xuong Com Rao
GBVNML1.137	N10	Nhãn Bản Nguyên	GBVNML18.942	N27	Tiêu Da Bò
GBVNML1.138	N11	Nhãn Lập Trạch	GBVNML18.562	N28	Long Tiêu
GBVNML1.142	N12	Nhãn Việt Trì	GBVNML18.573	N29	Xuong Com Vang Ba Ria
GBVNML1.133	N13	Nhãn Phong Châu 5	GBVNML18.584	N30	Xuong Com Trang
GBVNML18.566	N14	Long Gia Sắn	GBVNML18.568	N31	Nhãn Đường phèn
GBVNML18.580	N16	Tiêu Vung Tàu	GBVNML18.579	N32	Nhãn Vung Tàu
GBVNML18.564	N17	Tiêu Da Me			

Ghi chú: ID¹: số đăng ký cơ quan mạng lưới, Ngân hàng gen cây trồng quốc gia (GBVNML), ID²: ký hiệu giống.

Bộ mỗi khuếch đại các vùng gen *matK* được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Danh sách mỗi khuếch đại vùng gen *matK*.

Gen	Mỗi	Trình tự 5'-3'	Tham khảo
<i>matK</i>	Kim3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTACGAG	[5]
	Kim1R	TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	

Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm của Bộ môn Đa dạng sinh học, Trung tâm Tài nguyên Thực vật (An Khánh - Hoài Đức - Hà Nội).

Phương pháp nghiên cứu

ADN tổng số được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp dùng công nghệ màng lọc silica và cột lọc của QUIAGEN Dnaeasy Plan Kit.

Phản ứng PCR khuếch đại gen và *matK* được thực hiện với thành phần: 14,34 µl H₂O deion, 2 µl 10x PCR buffer, 0,16 µl dNTP mix, 0,2 µl mỗi Kim1R/Kim1F, 0,1 µl Taq polymerase (Fusion taq) và 0,1 µl ADN tổng số; thể tích phản ứng PCR là 20 µl; điều kiện nhiệt: biến tính ở 94°C trong 4 phút, 1 chu trình; 94°C trong 40 giây, 52°C trong 35 giây, 72°C trong 1 phút, 35 chu trình; 72°C trong 10 giây,

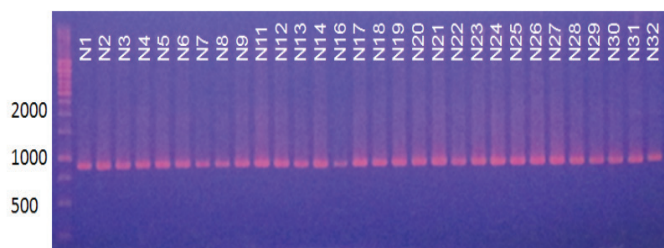
bảo quản tại 16°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong đệm TBE, nhuộm bằng EtBr. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng máy đo quang phổ nanodrop 2000. Những mẫu có nồng độ sản phẩm khoảng 100 ng/μl được dùng để giải trình tự.

Chu trình và phản ứng cho giải trình tự: mẫu được khuếch đại với từng môi, mỗi mẫu lặp lại 5 lần với thành phần như sau: 5,5 μl water nuclease-free, 1 μl Bigdie, 2 μl X5 buffer, 0,5 μl môi xuôi hoặc ngược và 1 μl PCR template; tổng thể tích 20 μl; ở điều kiện 96°C trong 1 phút, 1 chu trình; 96°C trong 10 giây, 50°C trong 5 giây, 60°C trong 4 phút, 25 chu trình; 72°C trong 2 phút; bảo quản tại 4°C. Sản phẩm được đưa vào hệ thống giải trình tự bằng máy ABI3700 của 1st base Seq. company (Singapore).

Trình tự của các mẫu thu được đã được xử lý, hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit 4.9, sắp xếp thẳng hàng trình tự bằng công cụ ClustalW và so sánh trên Ngân hàng gen bằng công cụ NCBI/BLAST được tích hợp trong phần mềm phân tích Geneious 7.0.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Kết quả tách chiết mẫu lá của 31 mẫu giống nhãn nghiên cứu cho thấy sự đồng đều về kích thước có chiều dài 800 bp (hình 1), ADN có độ tinh sạch cao và không còn ARN lẫn tạp, đủ tiêu chuẩn để thực hiện các bước khuếch đại để giải trình tự tiếp theo.



Hình 1. Khuếch đại vùng gen *matK* bằng cặp môi Kim3F/1R.

Kết quả kiểm tra tinh sạch mẫu sản phẩm PCR cho thấy, các mẫu đều có nồng độ cao >700 ng/μl và chất lượng đảm bảo. Sau khi tinh sạch và thôi gel, các mẫu này được kiểm tra định lượng lại bằng nanodrop 2000, kết quả cũng cho nồng độ đạt 100 ng/μl ở tất cả các mẫu với chỉ số tinh sạch đảm bảo cho giải trình tự.

Kết quả giải trình tự đoạn gen *matK* từ 31 mẫu giống nhãn thu được các trình tự với chiều dài biến thiên từ 677 bp (N10 - Nhãn Bản Nguyên) đến 829 bp (N8 - Nhãn Đoàn Hùng 3). Tiến hành căn chỉnh và so sánh với trình tự của toàn bộ hệ gen lục lạp (BLAST với dữ liệu trình tự NCBI), kết quả BLAST hit cho thấy 829 bp nucleotide của các mẫu giống nhãn nằm trong vùng cấu trúc gen của gen *matK*. Vì

vậy, các trình tự này đã được phân tích để tìm khung đọc ORF cho việc dịch mã codon với các axit amin tương ứng.

Kết quả phân tích so sánh các trình tự đoạn gen *matK* thu được từ 31 mẫu giống nhãn cho thấy, các trình tự của đoạn gen *matK* gần như hoàn toàn tương đồng. Tuy nhiên, có sự khác biệt ở 1 nucleotit với cả tập đoàn nhãn nghiên cứu tại vị trí 939 T>G (vị trí của gen *matK*, tham chiếu từ trình tự có số đăng ký NCBI AY724286.1). 11 nguồn gen có sự khác biệt là N10 - Nhãn Bản Nguyên, N14 - Long Gia Sắn, N16 - Tiêu Vừng Tàu, N17 - Tiêu Da Me, N19 - Nhãn Sài Gòn, N22 - Cơm Vàng Bánh Xe, N26 - Xuồng Cơm Ráo, N28 - Long Tiêu, N29 - Xuồng Cơm Vàng Bà Rịa, N30 - Xuồng Cơm Trắng, N32 - Nhãn Vừng Tàu (hình 2).



Hình 2. So sánh trình tự gen *matK* của nguồn gen nhãn nghiên cứu.

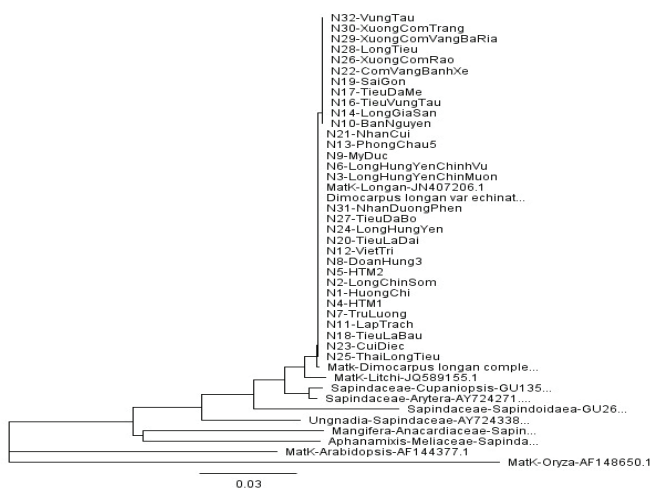
Tiến hành BLAST các trình tự này với ngân hàng dữ liệu trình tự của NCBI và CBOLD, kết quả thu được như sau:

- Mức độ tương đồng của trình tự đoạn gen *matK* giữa các loài nhãn trong chi *Dimocarpus* biến thiên từ 99 lên đến 100%.

- Đột biến dị hoán (T>G) tại vị trí 934 của đoạn trình tự ở cả 11 giống nhãn khác biệt hoàn toàn với toàn bộ các đoạn trình tự trên ngân hàng gen, chỉ xuất hiện trên 11 giống nhãn của Việt Nam đến thời điểm đăng ký. Các trình tự này có mã số trên NCBI lần lượt là KR073235 (N10 - Nhãn Bản Nguyên), KR073239 (N14 - Long Gia Sắn), KR073240 (N16 - Tiêu Vừng Tàu), KR073241 (N17 - Tiêu Da Me), KR073243 (N19 - Nhãn Sài Gòn), KR073245 (N22 - Cơm Vàng Bánh Xe), KR073249 (N26 - Xuồng Cơm Ráo), KR073251 (N28 - Long Tiêu), KR073252 (N29 - Xuồng Cơm Vàng Bà Rịa), KR073253 (N30 - Xuồng Cơm Trắng)

và KR073255(N32 - Nhân Vững Tàu).

Các trình tự của đoạn gen *matK* gồm 829 nucleotid và một số trình tự tham chiếu từ NCBI tương ứng đại diện cho chi *Dimocarpus*, họ Sapindaceae, bộ Sapindales được sử dụng để phân tích tương quan di truyền giữa các mẫu giống trong tập đoàn nghiên cứu, bằng phương pháp lập sơ đồ hình cây NJ [6], với outgroup là trình tự của loài *Oryza sativa* - đại diện nhóm cây 1 lá mầm. Các trình tự tham chiếu được chọn với tiêu chí là các trình tự có tương đồng từ gần nhất đến xa nhất trong danh sách BLAST-hit. Các trình tự này có phân loại *Dimocarpus longan* var. *echinatus*, *Paullinia pinnata* - Sapindaceae, *Arytera*, *Cupaniopsis*, họ Sapindaceae và bộ Sapindales (hình 3).



Hình 3. Cây phân loại dựa trên đoạn gen *matK* của các mẫu giống nhãn nghiên cứu.

Từ hình 3 cho thấy, trình tự cây *Arabidopsis thaliana* được nhóm riêng tách biệt với các nhóm trình tự thuộc bộ Sapindales. Trong bộ Sapindales, các trình tự của họ Sapindaceae được tách biệt với các họ Anacardiaceae và họ Meliaceae. Trong họ Sapindaceae, các trình tự của chi *Dimocarpus* được nhóm thành công và phân biệt rõ ràng với chi *Litchi*, *Arytera*, *Sapindoidaea* và *Cupaniopsis*. 11 trình tự nhãn (N10, N14, N16, N17, N19, N22, N26, N28, N29, N30, N32) đứng tách biệt với các trình tự của nhãn Việt Nam và các nguồn gen đại diện khác. Như vậy, kết quả phân nhóm dựa vào đoạn 829 nucleotid này phù hợp với trình tự phân loại từ bộ, họ, chi theo khóa phân loại thông thường tham khảo từ NCBI. Kết quả này cho thấy đoạn gen *matK* có ý nghĩa trong phân loại đến mức nhận dạng chi.

Kết luận

Đánh giá đa dạng trình tự đoạn gen *matK* gồm 829 nucleotid của tập đoàn 31 mẫu giống nhãn nghiên cứu đã xác định được đột biến dị hoán (T>G) tại vị trí 939 của đoạn trình tự ở cả 11 giống nhãn: N10 - Nhân Bản Nguyên,

N14 - Long Gia Sắn, N16 - Tiêu Vững Tàu, N17 - Tiêu Da Me, N19 - Nhân Sài Gòn, N22 - Cơm Vàng Bánh Xe, N26 - Xuồng Cơm Ráo, N28 - Long Tiêu, N29 - Xuồng Cơm Vàng Bà Rịa, N30 - Xuồng Cơm Trắng, N32 - Nhân Vững Tàu. Các đột biến này khác biệt với toàn bộ các đoạn trình tự trên ngân hàng gen cho đến thời điểm đăng ký trên NCBI với mã số lần lượt là KR073235, KR073239, KR073240, KR073241, KR073243, KR073245, KR073249, KR073251, KR073252, KR073253 và KR073255.

Phân tích cây phả hệ cho thấy, trình tự của đoạn gen *matK* đã nhóm được các loài *Dimocarpus longan* với nhau và tách biệt chi *Dimocarpus* với các chi khác trong họ Sapindaceae, bộ Sapindales. Thông tin cả đoạn với 829 trình tự (từ 446 đến 1318 bp) đã không phân biệt chính xác các loài nhãn nghiên cứu và tham chiếu. Tuy nhiên, đoạn gen *matK* đã tách biệt được 11 giống nhãn có SNP đặc trưng của Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Công trình là kết quả của Đề tài Xây dựng tiêu bản ADN (DNA barcode) cho các giống cây trồng đặc hữu có giá trị kinh tế của Việt Nam thuộc Chương trình Công nghệ sinh học nông nghiệp và thủy sản. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Z.X. Lai, C.L. Chen, Z.G. Chen (2001), "Progress in biotechnology research in longan", *International Society for Horticultural Science (ISHS)*, **558**, pp.137-141, doi: 10.17660/ActaHortic.2001.558.18.
- [2] Boyi Wang, Hua-Wei Tan, Wanping Fang, Lyndel W. Meinhardt, Sue Mischke, Tracie Matsumoto and Dapeng Zhang (2015), "Developing single nucleotide polymorphism (SNP) markers from transcriptome sequences for identification of longan (*Dimocarpus longan*) germplasm", *Horticulture Research*, **2**, 14065, doi: 10.1038/hortres.2014.65.
- [3] CBOL Plant Working Group (2009), "A DNA barcode for land plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(31), pp.12794-12797, doi: 10.1073/pnas.0905845106.
- [4] K. Vijayan and C.H. Tsou (2010), "DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective", *Current Science*, **99**(11), pp.1530-1541.
- [5] W. John Kress and David L. Erickson (2012), "DNA barcodes: methods and protocols", *Methods in Molecular Biology*, **858**, doi: 10.1007/978-1-61779-591-6_11.
- [6] N. Saitou and M. Nei (1987), "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4), pp.406-425, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

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

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

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

Tên bài báo

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

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

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

Tóm tắt

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

Dẫn nhập/đặt vấn đề

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

Đối tượng và phương pháp

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

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

Kết quả

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

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

Bàn luận

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

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

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

Kết luận

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

Chú thích và tài liệu tham khảo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Các yêu cầu khác

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

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

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

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

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

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

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

3. Khoa học y - dược

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

4. Khoa học nông nghiệp

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

5. Khoa học xã hội và nhân văn

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

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 61 - Number 2 - February 2019

Đánh giá kết quả bước đầu phẫu thuật nội soi trong điều trị ung thư đại trực tràng.

Nguyễn Văn Hiếu, Lê Văn Quảng, Phạm Văn Bình, Trần Anh Cường, Hoàng Mạnh Thắng

Nhìn lại chỉ định phẫu thuật cắt chỉnh xương hàm mặt không chỉnh nha trước mô nhân 2 trường hợp lâm sàng.

Nguyễn Việt Anh, Vũ Trung Trực, Nguyễn Hồng Hà

Ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR phát hiện mất đoạn AZF ở bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng.

Lương Thị Lan Anh, Hoàng Thu Lan

Xây dựng công thức nhũ tương xịt họng chứa eucalyptol.

Lê Thị Ngọc Lan, Đỗ Thị Hồng Tươi, Phạm Đình Duy

Nghiên cứu tác dụng của dịch chiết cây Hạ khô thảo nam [*Blumea lacera* (Burn. f.) DC] trên chuột bị gây suy thận mạn bởi adenine.

Trịnh Khánh Linh, Trần Văn Cường, Hồ Anh Sơn

Đánh giá hàm lượng 20-hydroxycedysone các loài cây thuốc ở Vườn quốc gia Tam Đảo và vùng đệm.

Lê Xuân Đắc, Đặng Ngọc Huyền, Vũ Thị Loan, Trần Thị Thanh Hương, Nguyễn Vũ Anh, Nguyễn Đăng Hội, V.V. Volodin

Tuyển chọn giống lúa (*Oryza sativa* L.) chịu mặn sodic cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

Trần Thị Phương Thảo, Võ Công Thành, Quan Thị Ái Liên, Đái Phương Mai, Đặng Thị Ngọc Nhiên, Huỳnh Văn Toàn, Trần Ngọc Sơn, Nguyễn Hoài Thanh, Phạm Vũ Khương Duy, Phan Thị Anh Thơ

Chọn tạo giống ngô kiểu cây mới cho trồng mật độ cao.

Vũ Thị Bích Hạnh, Vũ Văn Liệt, Trần Thị Thanh Hà, Nguyễn Văn Hà, Dương Thị Loan, Hoàng Thị Thuý, Nguyễn Văn Việt

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy *in vitro* tới khả năng kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của chủng *Bacillus velezensis* YMD1.

Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Xuân Cảnh, Phùng Thị Lệ Quyên

Khảo sát sự tích lũy nitrat trong rau muống (*Ipomoea aquatica*) và cải xanh (*Brassica juncea* L.) khi tưới bằng nước thải từ hầm ủ biogas.

Nguyễn Lệ Phương, Nguyễn Võ Châu Ngân, Nguyễn Hữu Chiêm

Hiệu quả kinh tế của mô hình chăn nuôi giống vịt biển 15 - Đại Xuyên sinh sản.

Lê Thị Mai Hoa, Nguyễn Văn Duy, Vương Thị Lan Anh, Mai Hương Thu, Nguyễn Văn Tuấn

Nghiên cứu đa dạng di truyền của đoạn gen *matK* ở một số nguồn gen nhãn Việt Nam.

Nguyễn Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lan Hoa, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Lê Tuấn Nghĩa

1 Evaluating the initial results of laparoscopic surgery in the treatment of colorectal cancer.

Van Hieu Nguyen, Van Quang Le, Van Binh Pham, Anh Cuong Tran, Manh Thang Hoang

4 Orthognathic surgery without presurgical orthodontics: two clinical cases and literature review.

Viet Anh Nguyen, Trung Truc Vu, Hong Ha Nguyen

8 Application of Real-time PCR technique to detect AZF microdeletions in infertile men without sperm.

Thi Lan Anh Luong, Thu Lan Hoang

13 Formulation of throat spray emulsion containing eucalyptol.

Thi Ngoc Lan Le, Thi Hong Tuoi Do, Dinh Duy Pham

20 The effectiveness of *Blumea lacera* extract on chronic renal failure animal model induced by adenine.

Khanh Linh Trinh, Van Cuong Tran, Anh Son Ho

25 The evaluation on 20-hydroxycedysone content of medicinal plants in Tam Dao National Park and the buffer zone.

Xuan Dac Le, Ngoc Huyen Dang, Thi Loan Vu, Thi Thanh Huong Tran, Vu Anh Nguyen, Dang Hoi Nguyen, V.V. Volodin

30 Selecting rice (*Oryza sativa* L.) varieties with salinity tolerance to sodic soil conditions in the Mekong River Delta.

Thi Phuong Thao Tran, Cong Thanh Vo, Thi Ai Lien Quan, Phuong Mai Dai, Thi Ngoc Nien Dang, Van Toan Huynh, Ngoc Son Tran, Hoai Thanh Nguyen, Vu Khuong Duy Pham, Thi Anh Tho Phan

36 Erect-leaf maize breeding for high-density cultivation.

Thi Bich Hanh Vu, Van Liet Vu, Thi Thanh Ha Tran, Van Ha Nguyen, Thi Loan Duong, Thi Thuy Hoang, Van Viet Nguyen

42 Effect of *in vitro* culture conditions of the antagonistic bacterium (*Bacillus velezensis* YMD1) on its ability to protest *Neoscytalidium dimidiatum* fungus.

Van Giang Nguyen, Xuan Canh Nguyen, Thi Le Quyen Phung

47 Study on nitrate accumulation in water spinach (*Ipomoea aquatica*) and leaf mustard (*Brassica juncea* L.) fertilised by the biogas effluent.

Le Phuong Nguyen, Vo Chau Ngan Nguyen, Huu Chiem Nguyen

55 Effect of production and economic efficiency of duckling breeding model 15 - Dai Xuyen products.

Thi Mai Hoa Le, Van Duy Nguyen, Thi Lan Anh Vuong, Huong Thu Mai, Van Tuan Nguyen

61 Genetic diversity of *matK* gene in Vietnam's longan germplasm.

Thi Ngoc Lan Nguyen, Thi Lan Hoa Nguyen, Thi Thanh Thuy Nguyen, Tuan Nghia La