



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 62 - Số 9 - Tháng 9 năm 2020

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 Bui - 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

Nghiên cứu nồng độ kháng nguyên CA125 ở bệnh nhân ung thư bạch cầu

Trần Thị Phương Thảo¹, Bùi Kiều Trang², Hoàng Văn Tổng¹, Nguyễn Thị Xuân^{2*}

¹Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

²Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 8/5/2020; ngày chuyển phản biện 12/5/2020; ngày nhận phản biện 10/6/2020; ngày chấp nhận đăng 26/6/2020

Tóm tắt:

Kháng nguyên ung thư 125 (CA125) được biết đến và sử dụng với vai trò là một biomarker trong chẩn đoán một số bệnh ung thư. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích đánh giá mức độ biểu hiện CA125 ở những bệnh nhân mắc ung thư bạch cầu tại Việt Nam. 103 bệnh nhân được chẩn đoán mắc ung thư bạch cầu chưa được điều trị và 48 người khỏe mạnh đã tham gia nghiên cứu. Nồng độ của protein CA125 trong máu được phát hiện và định lượng bằng phương pháp ELISA. Kết quả cho thấy, những bệnh nhân bạch cầu lympho cấp có nồng độ CA125 tăng cao và có sự khác biệt với những người khỏe mạnh ($p < 0,05$). Nồng độ CA125 không có sự khác biệt ở những bệnh nhân bạch cầu lympho mạn tính, bạch cầu tủy cấp so với những người khỏe mạnh ($p > 0,05$). Những bệnh nhân bạch cầu tủy mạn có nồng độ CA125 thấp hơn so với người khỏe mạnh ($p = 0,05$). CA125 có thể là một marker tiềm năng đối với bệnh bạch cầu lympho cấp.

Từ khóa: bạch cầu lympho cấp, bạch cầu lympho mạn, bạch cầu tủy cấp, bạch cầu tủy mạn, CA125.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Bệnh bạch cầu là một dạng ung thư của các cơ quan tạo máu bao gồm tủy xương và hệ thống lympho. Tỷ lệ mắc ung thư bạch cầu chiếm khoảng 2% tổng các loại ung thư. Tỷ lệ mắc bệnh bạch cầu có liên quan đến giới tính và sắc tộc, nam có khả năng mắc bệnh cao hơn nữ và tỷ lệ mắc cao hơn ở nhóm người da trắng so với người thuộc các sắc tộc khác. Tại Việt Nam, ung thư bạch cầu có tỷ lệ tử vong đứng thứ 5 trong các loại ung thư và có khoảng 6144 ca mắc mới trong năm 2018 [1]. Trong tủy xương và trong máu ngoại biên của bệnh nhân ung thư bạch cầu cho thấy sự xuất hiện và tích tụ các tế bào bạch cầu bất thường. Điều này dẫn đến sụt giảm các tế bào tiểu cầu, hồng cầu, bạch cầu bình thường trong máu do không gian mạch bị chiếm giữ [2].

Ung thư bạch cầu có 4 dạng phổ biến: bạch cầu nguyên bào cấp tính (Acute lymphoblastic leukemia - ALL), bạch cầu huyết bào mạn tính (Chronic lymphocytic leukemia - CLL), bạch cầu tủy bào cấp tính (Acute myeloid leukemia - AML) và bạch cầu tủy bào mạn tính (Chronic myeloid leukemia - CML) [2]. Bệnh AML xảy ra chủ yếu trên bệnh nhân cao tuổi với tỷ lệ sống sót sau 5 năm chỉ 20% và có đặc điểm tồn tại nhiều tế bào non dòng tủy chưa trưởng thành thường được tìm thấy trong tủy xương và gần như không lưu thông trong vòng tuần hoàn [3]. Bệnh ALL là bệnh có sự tăng sinh đột biến các tế bào non dòng lympho ở trong máu và tủy xương, là loại ung thư thường gặp nhất ở trẻ em [4]. Bệnh

CML là bệnh có sự tăng sinh không kiểm soát của các tế bào tủy trong tất cả các giai đoạn biệt hóa [5]. Bệnh CLL là bệnh có sự tăng trưởng bất thường của các tế bào lympho dương tính với marker CD5 [6]. Trong thời kỳ phát triển ban đầu của bệnh, các tế bào bạch cầu bị ảnh hưởng, dẫn đến mất khả năng trưởng thành và hoạt động chức năng, gây ra bệnh bạch cầu cấp tính. Những bệnh nhân bị bệnh bạch cầu cấp có nguy cơ viêm nhiễm, chảy máu và thiếu máu rất cao, và hầu như phải được điều trị ngay lập tức. Đối với những bệnh nhân mắc bạch cầu mạn tính, bệnh nhân không cần điều trị ngay lập tức do những tế bào đã bước vào giai đoạn biệt hóa cuối cùng, không còn là những tế bào non. Một số trường hợp bệnh nhân bạch cầu mạn tính không cần phải tiến hành điều trị [2].

Kháng nguyên ung thư 125 (Cancer Antigen 125 - CA125) là phân tử glycoprotein nặng 220-kDa, được mã hóa bởi gen *MUC16* nằm trên NST 19p13.2. Phân tử này gồm 3 domain: domain trong màng, domain xuyên màng và domain ngoài màng [7]. CA125 được xác định như một marker quan trọng trong chẩn đoán ung thư buồng trứng với khoảng 50% phụ nữ mắc giai đoạn sớm và 80% mắc giai đoạn muộn có nồng độ CA125 trong máu cao [8]. Sàng lọc CA125 cũng giúp xác định đáp ứng của bệnh nhân đối với các liệu pháp điều trị bệnh. CA125 cũng biểu hiện ở những loại ung thư khác như ung thư vú, ung thư phổi, và ung thư tuyến giáp [9, 10]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới

*Tác giả liên hệ: Email: xuannt@igr.ac.vn

Cancer Antigen 125 concentration in different types of leukemia

Thi Phuong Thao Tran¹, Kieu Trang Bui²,
Van Tong Hoang¹, Thi Xuan Nguyen^{2*}

¹Institute of Biomedicine and Pharmacy,
Vietnam Military Medical University

²Institute of Genome Research,
Vietnam Academy of Science and Technology

Received 8 May 2020; accepted 26 June 2020

Abstract:

Cancer Antigen 125 (CA125) has been used as a biomarker for early diagnosis of several cancers. This study aims to determine concentration of CA125 in Vietnamese patients with leukemia. The blood samples of 103 untreated patients diagnosed with different types of leukemia and 33 healthy individuals were included for this study. Level of CA125 in the blood was measured by ELISA. The results showed that patients with acute lymphocytic leukemia had an increased CA125 level compared to the healthy controls ($p < 0.05$). CA125 level was not significantly different among patients with chronic lymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia, and healthy individuals ($p > 0.05$). Patients with chronic myeloid leukemia had a lower CA125 level than the healthy controls ($p = 0.05$). The results indicated that CA125 might be a potential marker for early diagnosis of acute lymphoblastic leukemia.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, CA125, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia.

Classification number: 3.1

đã chỉ ra mối liên hệ giữa CA125 với các bệnh ung thư bạch cầu [11-14]. Tuy nhiên, ở nước ta chưa có nghiên cứu nào về nồng độ của marker ung thư này trong các dạng khác nhau của bệnh bạch cầu. Nghiên cứu của chúng tôi nhằm mục đích đánh giá nồng độ của marker ung thư CA125 ở những bệnh nhân ung thư bạch cầu.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên các nhóm bệnh nhân ung thư bạch cầu và nhóm chứng là những người khỏe mạnh. Mẫu máu ngoại vi được thu thập từ 103 bệnh nhân ung thư bạch cầu chưa được điều trị (gồm: 28 bệnh nhân ALL, 24 bệnh nhân AML, 25 bệnh nhân CLL và 26 bệnh nhân CML) tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương và Bệnh viện Quân y 103. Đối tượng nghiên cứu được phân loại theo từng nhóm ung thư bạch cầu và được các bác sĩ chuyên môn kết luận dựa trên các kết quả lâm sàng và cận lâm sàng. Các mẫu máu ngoại vi trong nhóm đối chứng được thu thập từ 48 người khỏe mạnh, không có bệnh cấp hay mạn tính nào khác. Tất cả những bệnh nhân và người khỏe mạnh tham gia trong nghiên cứu này đều ký văn bản xác nhận đồng ý tham gia. Quy trình thu, bảo quản mẫu và thực hiện thí nghiệm được phê duyệt bởi Hội đồng Y đức của Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp đo nồng độ CA125 bằng ELISA

Mẫu máu ngoại vi của nhóm bệnh và nhóm đối chứng được thu 2 ml và tách huyết tương, sau đó được bảo quản tại -20°C cho đến khi thực hiện kỹ thuật ELISA. Để xác định nồng độ CA125 trong mẫu huyết tương, kit Mucin 16/CA125 Human ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific) được chúng tôi sử dụng và thực hiện quy trình thí nghiệm theo hướng dẫn cụ thể của kit.

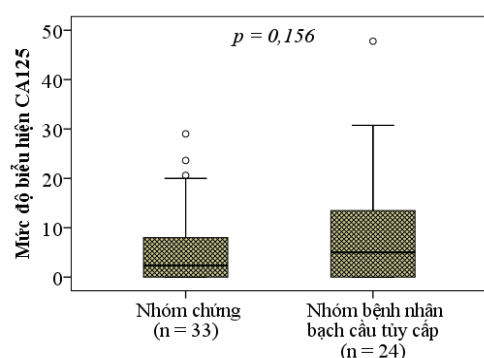
Phương pháp thống kê

Số liệu được nhập và quản lý bằng Excel 2010 và được phân tích bằng phần mềm SPSS v.19. Kiểm định sự khác biệt giữa các biến định lượng phân bố không chuẩn bằng phương pháp kiểm định Mann-Whitney U test. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong các phân tích so sánh khi giá trị $p < 0,05$.

Kết quả

Nồng độ CA125 ở bệnh nhân bạch cầu tủy cấp

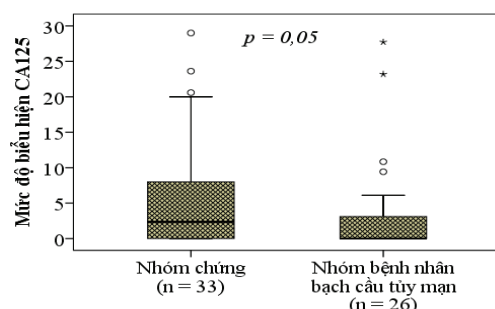
Nồng độ CA125 ở nhóm đối chứng có giá trị trung bình là 5,74 U/ml (0-29), trong đó ở 24 bệnh nhân nhóm bạch cầu tủy cấp, nồng độ CA125 trung bình là 9,722 U/ml (0-47,77). Mặc dù nồng độ trung bình ở nhóm bệnh nhân cao hơn nhóm chứng nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,156$) (hình 1).



Hình 1. Mức độ biểu hiện của CA125 trong nhóm chứng và bệnh nhân bạch cầu tủy cấp.

Nồng độ CA125 ở bệnh nhân bạch cầu tủy mạn

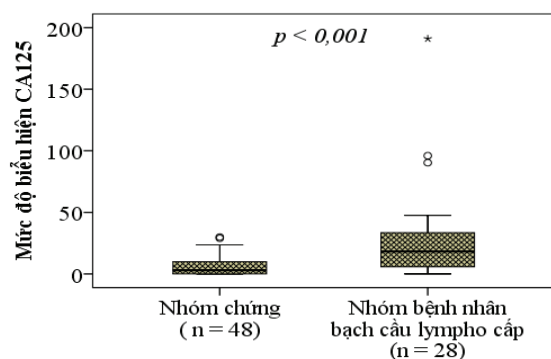
Nồng độ trung bình của CA125 trong các bệnh nhân thuộc nhóm bạch cầu tủy mạn là 3,25 U/ml (0-27,73). Kết quả phân tích cho thấy nồng độ CA125 cao hơn ở nhóm chứng với khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,05$) (hình 2).



Hình 2. Mức độ biểu hiện của CA125 trong nhóm chứng và bệnh nhân bạch cầu tủy mạn.

Mức độ biểu hiện của CA125 trong bệnh bạch cầu lympho cấp

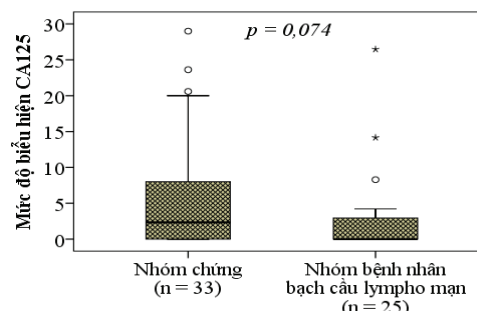
Nồng độ CA125 trung bình ở nhóm chứng là 6,61 U/ml (0-30), trong khi ở những người mắc bạch cầu lympho cấp tính là 29,16 U/ml (0-190,99). Kết quả phân tích cho thấy nồng độ CA125 ở người mắc bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với những người khỏe mạnh ($p<0,0001$) (hình 3).



Hình 3. Mức độ biểu hiện CA125 ở nhóm chứng và nhóm bệnh nhân bạch cầu lympho cấp.

Nồng độ CA125 ở bệnh nhân bạch cầu lympho mạn

Nồng độ trung bình của CA125 trong 25 bệnh nhân là 2,608 U/ml (0-26,46). Kết quả cho thấy rằng, mức độ CA125 ở nhóm chứng cao hơn so với bệnh nhân mắc lympho mạn nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p=0,074$) (hình 4).



Hình 4. Mức độ biểu hiện của CA125 trong nhóm chứng và bệnh nhân bạch cầu lympho mạn.

Bàn luận

Bệnh bạch cầu lympho cấp xảy ra thường xuyên ở trẻ em, trong khi các bệnh khác phổ biến hơn ở người lớn. Bệnh nhân sẽ tăng khả năng sống sót sau 5 năm nếu được phát hiện và điều trị kịp thời [15]. Vì vậy, nghiên cứu phát hiện các biomarker đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán, tiên lượng cũng như điều trị ở bệnh nhân ung thư bạch cầu. Hiện nay, các chỉ thị sinh học trong các bệnh huyết học đã và đang được nghiên cứu. Kháng nguyên CD44 có chức năng điều hòa sự hoạt động cũng như di trú của các tế bào lympho và các đại thực bào. CD44 được chứng minh tăng cao trong huyết thanh ở bệnh nhân mắc ung thư máu cấp tính [16]. Những bệnh nhân mắc bạch cầu lympho mạn tính lại có sự biểu hiện bất thường của Ox40, đây là marker có vai trò giúp các tế bào T luôn duy trì các đáp ứng miễn dịch. Ở những bệnh nhân này, nồng độ Ox40 trong huyết thanh cao hơn so với những người khỏe mạnh và không có bất cứ trường hợp nào âm tính [17].

CA125 là một marker sinh học quan trọng trong nhiều bệnh ung thư. Nhiều nghiên cứu gần đây trong các bệnh huyết học đã và đang chỉ ra vai trò của CA125. Nghiên cứu của Bairey và cộng sự về mức độ của CA125 trong huyết thanh ở những bệnh nhân bạch cầu lympho mạn cho thấy rằng, mức độ trung bình của CA125 trong huyết thanh của các bệnh nhân là 16,3 U/ml (giá trị bình thường <35 U/ml). Kết quả này chỉ ra rằng những bệnh nhân bạch cầu lympho mạn tính có nồng độ CA125 ở trong mức bình thường [15]. Một nghiên cứu khác trên 14 bệnh nhân bạch cầu lympho mạn cũng cho thấy nồng độ CA125 không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm khỏe mạnh [7]. Tương tự như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy biểu hiện của CA125 trong những bệnh nhân mắc CLL biểu hiện ở mức

bình thường và không có sự khác biệt so với những người khỏe mạnh.

Nghiên cứu đánh giá mức độ CA125 trên nhóm trẻ mắc bạch cầu lympho cấp tính và bệnh lymphoma nhận thấy ở những đứa trẻ mắc ung thư máu có nồng độ tăng cao hơn so với những đứa trẻ khỏe mạnh [12]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy nồng độ CA125 ở nhóm bị bệnh cao hơn so với những người không mắc bệnh, đồng thời có 6/25 bệnh nhân (24%) có CA125 ở mức cao >35 U/ml và có 5 bệnh nhân là nữ. Nghiên cứu của Camera và cộng sự chỉ ra rằng 3 trong số 19 trường hợp mắc ALL có biểu hiện CA125 tăng cao [13]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, kết quả cho thấy hầu hết các bệnh nhân có biểu hiện CA125 ở mức bình thường (<35 U/ml) và chỉ có duy nhất một bệnh nhân có mức biểu hiện CA125 cao hơn bình thường. Nghiên cứu của Dilek và cộng sự trên 12 bệnh nhân CML chỉ ra rằng không có bệnh nhân nào có biểu hiện tăng CA125 [14]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy rằng hầu hết các bệnh nhân không biểu hiện CA125, 6/26 trường hợp (23%) có biểu hiện CA125 nhưng ở mức bình thường, tuy nhiên có sự khác biệt giữa bệnh nhân và người khỏe mạnh.

Kết luận

Những bệnh nhân bạch cầu lympho cấp có nồng độ CA125 tăng cao so với những người khỏe mạnh, tuy nhiên nồng độ CA125 không khác biệt giữa nhóm bệnh nhân bạch cầu lympho mạn tính, bạch cầu tủy cấp so với nhóm người khỏe mạnh. Những bệnh nhân bạch cầu tủy mạn có nồng độ CA125 thấp hơn so với những người khỏe mạnh. Do đó, CA125 có thể là một marker tiềm năng đối với bệnh bạch cầu lympho cấp.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ Dự án KC.10.DA06/16-20 thuộc Chương trình KC.10/16-20 “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến phục vụ bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cộng đồng”. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F. Bray, et al. (2018), “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”, *CA Cancer J. Clin.*, **68(6)**, pp.394-424.
- [2] B.J.Bain (2013), *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd ed.

- [3] I. De Kouchkovsky, M. Abdul-Hay (2016), “Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update”, *Blood Cancer J.*, **6(7)**, pp.e441.
- [4] M. Onciu (2009), “Acute lymphoblastic leukemia”, *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, **23(4)**, pp.655-674.
- [5] N. Shanmuganathan, et al. (2017), “Treatment of chronic myeloid leukemia: assessing risk, monitoring response, and optimizing outcome”, *Leuk. Lymphoma*, **58(12)**, pp.2799-2810.
- [6] M. Hahn, et al. (2018), “Aberrant splicing of the tumor suppressor CYLD promotes the development of chronic lymphocytic leukemia via sustained NF-kappaB signaling”, *Leukemia*, **32(1)**, pp.72-82.
- [7] N. Scholler, N. Urban (2007), “CA125 in ovarian cancer”, *Biomark. Med.*, **1(4)**, pp.513-523.
- [8] A.W. Amitava Dasgupta (2014), *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*, pp.1-504.
- [9] R. Salgia, et al. (2001), “Role of serum tumor markers CA 125 and CEA in non-small cell lung cancer”, *Anticancer Res.*, **21(2B)**, pp.1241-1246.
- [10] D.P. Bender, et al. (2003), “Serum CA125 is an independent prognostic factor in cervical adenocarcinoma”, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **189(1)**, pp.113-117.
- [11] O. Bairey, M. Shaklai (2005), “Serum CA125 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia”, *Clin. Lab. Haematol.*, **27(1)**, pp.57-60.
- [12] D. Birgen, et al. (2005), “Serum CA125 levels in children with acute leukemia and lymphoma”, *Leuk. Lymphoma*, **46(8)**, pp.1177-1181.
- [13] A. Camera, et al. (2000), “Increased CA125 serum levels in patients with advanced acute leukemia with serosal involvement”, *Cancer*, **88(1)**, pp.75-78.
- [14] I. Dilek, et al. (2005), “CA125 levels in patients with non-Hodgkin lymphoma and other hematologic malignancies”, *Clin. Lab. Haematol.*, **27(1)**, pp.51-55.
- [15] A.S. Davis, et al. (2014), “Leukemia: an overview for primary care”, *Am. Fam. Physician.*, **89(9)**, pp.731-738.
- [16] Akira Yokota, Genichiro Ishii, Yoshiki Sugaya, Miki Nishimura, Yasushi Saito, Kenichi Harigaya (1999), “Potential use of serum CD44 as an indicator of tumour progression in acute leukemia”, *Hematol. Oncol.*, **17(4)**, pp.161-168.
- [17] L. Taylor, H. Schwarz (2001), “Identification of a soluble OX40 isoform: development of a specific and quantitative immunoassay”, *J. Immunol. Methods*, **255(1-2)**, pp.67-72.

Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong định danh loài bọ xít hút máu ở miền Trung Việt Nam

Hồ Viết Hiếu^{1,2*}, Nguyễn Thị Hà³, Lê Thành Đô^{2*}, Đoàn Đức Hùng⁴, Nguyễn Thị Mai¹,
Tạ Phương Mai¹, Phạm Anh Tuấn¹, Phạm Thị Khoa¹, Ngô Giang Liên⁵

¹Trung tâm Nghiên cứu kỹ sinh trùng - côn trùng, Viện Y - Sinh - Dược, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

²Viện Sáng kiến sức khỏe toàn cầu, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

³Trung tâm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu và phát triển công nghệ cao, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

⁴Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn

⁵Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 31/1/2020; ngày chuyển phản biện 3/2/2020; ngày nhận phản biện 26/2/2020; ngày chấp nhận đăng 28/2/2020

Tóm tắt:

Phương pháp phân loại hình thái là phương pháp truyền thống và thông dụng trong định danh loài. Tuy nhiên, phương pháp này thể hiện những hạn chế rõ rệt trong việc phân biệt các loài đồng hình và dưới loài. Khi đó, các kỹ thuật sinh học phân tử đóng một vai trò thiết yếu, giúp định danh loài và phân loại một cách chính xác. Trong nghiên cứu này, các tác giả trình bày phương pháp định danh loài bọ xít hút máu (BXHM) ở khu vực miền Trung Việt Nam sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả phân loại sinh học phân tử và hình thái đã cho thấy, loài BXHM ở khu vực miền Trung Việt Nam là *Triatoma rubrofasciata*.

Từ khóa: bọ xít hút máu, định danh sinh học phân tử, *Triatoma rubrofasciata*.

Chỉ số phân loại: 3.1

Tổng quan

Vào đầu thập niên 90 của thế kỷ trước, sinh học phân tử đã có bước phát triển vượt bậc nhờ sự phát hiện và biểu hiện thành công ADN Polymerase chịu nhiệt trong phòng thí nghiệm từ loài *Thermus aquaticus* sống trong các suối nước nóng [1]. Việc khuếch đại và giải trình tự các đoạn gen mong muốn đã cung cấp một lượng thông tin di truyền khổng lồ của nhiều loài khác nhau. Bên cạnh đó, các trình tự gen còn được sử dụng vào nhiều lĩnh vực khác nhau như nghiên cứu chức năng của gen, nghiên cứu cơ chế phân tử của các bệnh di truyền, sinh tổng hợp các sản phẩm thiết yếu, định loài và xây dựng cây phân loại... Trong quá trình giải trình tự, nghiên cứu thông tin di truyền của các loài, các nhà nghiên cứu đã phát hiện nhiều trình tự có tính ổn định rất cao giữa các cá thể trong loài nhưng lại có sự khác biệt giữa các loài với nhau, và chúng có liên quan đến nguồn gốc phát sinh, tính gần gũi giữa các loài [2, 3]. Đó là những trình tự đặc trưng loài. Ở những trình tự đó, người ta thấy rằng hai loài có gốc chung càng cổ xưa bao nhiêu thì sự khác biệt càng lớn bấy nhiêu, và ngược lại [2, 3]. Ví dụ, những trình

tự đặc trưng ở loài người chúng ta giống với trình tự đó ở các loài linh trưởng hơn là ở các loài chó hay mèo. Sử dụng những trình tự này (trong kỹ thuật ADN barcoding), các nhà khoa học có thể khẳng định chắc chắn một cá thể bất kỳ nào đó thuộc loài nào nếu như trình tự của loài đó đã được công bố, và đồng thời phát hiện ra nhiều loài được định danh theo hình thái trước đây thực ra bao gồm các loài (đồng hình) khác nhau [4-6]. Như vậy, các trình tự đặc trưng loài cho phép xác định và phân loại cá thể một cách chính xác.

Thông thường, trong phân loại học sẽ sử dụng nhiều hơn một trình tự đặc trưng loài để làm tăng độ chính xác về mức độ gần gũi giữa các loài. Một vài trình tự đặc trưng loài thường được dùng trong phân loại sinh học phân tử bao gồm các ITS (Internal transcribed spacer, ADN nhân) hay COII (Cytochrome c oxidase subunit 2, ADN ty thể) và Cyto-B (Cytochrome oxidase b, ADN ty thể). Cyto-B là một gen ty thể mã hóa cho protein tham gia vào quá trình phosphoryl hóa oxy hóa trong ty thể [7]. Gen Cyto-B khá lớn (với khoảng 1.140 nucleotide) sẽ khó khăn khi nhân toàn bộ trình tự gen này và có thể tạo ra sai sót [7]. Trong trường

*Tác giả liên hệ: Email: hoviethieu@duytan.edu.vn; lethanhdo1@duytan.edu.vn

Application of molecular biology techniques in identification of kissing bugs species in Central Vietnam

Viet Hieu Ho^{1,2*}, Thi Ha Nguyen³, Thanh Do Le^{2*},
Duc Hung Doan⁴, Thi Mai Nguyen¹, Phuong Mai Ta¹,
Anh Tuan Pham¹, Thi Khoa Pham¹, Giang Lien Ngo⁵

¹Department of Medical Microbiology and Parasitology,

Faculty of Medicine, Duy Tan University, Da Nang

²Institute for Global Health Innovations, Duy Tan University, Da Nang

³Institute for Research and Development, Duy Tan University, Da Nang

⁴Institute of Malariology Parasitology and Entomology Quy Nhon

⁵Department of Cell Biology, University of Science,

Vietnam National University, Hanoi

Received 31 January 2020; accepted 28 February 2020

Abstract:

The morphological taxonomy method is a traditional and very popular method in species identification. However, this method shows obvious limitations in distinguishing homomorphic species. In those cases, molecular biology techniques play an essential role in helping to identify species and then classify them precisely. In this study, the authors presented a method to identify kissing bugs species in Central region of Vietnam using molecular biology techniques. The molecular and morphological taxonomy results have both showed that kissing bugs species in Central region of Vietnam was *Triatoma rubrofasciata*.

Keywords: kissing bugs, molecular biology identification, *Triatoma rubrofasciata*.

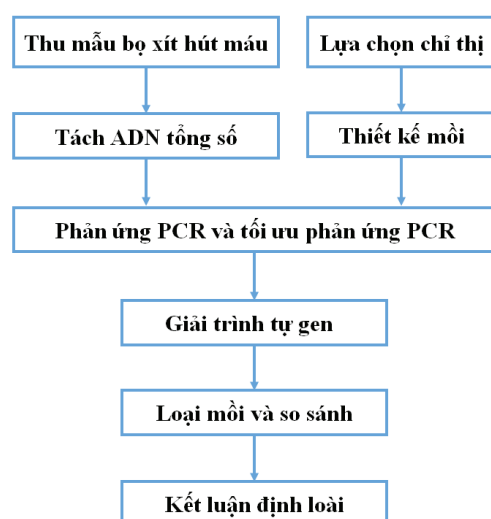
Classification number: 3.1

hợp này, các nhà khoa học có thể sử dụng các cặp mồi khác nhau nhân lên những đoạn được coi là đặc trưng loài có độ dài khác nhau (thông thường có kích thước khoảng 400-600 nucleotide). Những đoạn này sau đó được giải trình tự và so sánh với các dữ liệu trình tự trong các công bố trước đó. COII là một gen ty thể khác, mã hóa cho một protein của phức hệ Cytochrome oxidase trong ty thể. Trình tự của gen này chứa khoảng 680 nucleotide. Các đoạn có độ dài khác nhau trong trình tự của nó cũng đã được sử dụng cho định loài và xây dựng cây phân loại [8-10].

Với độ nhạy và tính đặc hiệu cao, cùng với giá thành hợp lý và thao tác đơn giản, kỹ thuật sinh học phân tử đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong phân loại và tiến hoá của các loài, trong đó có BXHM. Schuh và cs (1995), Monteiro và cs (2001) [11, 12] - những nhà nghiên cứu tiên phong trong phân loại BXHM sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử - đã xây dựng cây phát sinh chủng loại của 4 giống BXHM quan trọng trong truyền bệnh Chagas và Trypanosomiasis, bao gồm: *Triatoma*, *Rhodnius*, *Dipetalogaster* và *Psammolestes* với 17 loài bọ xít đã được giải trình tự gen. Trong nghiên cứu của mình, Lyman và cs (1999) [13] cũng mô tả chi tiết chủng loại phát sinh của 3 giống *Triatoma*, *Panstrongylus* và *Rhodnius* dựa trên trình tự gen Cyto-B. Sau đó, Liu và cs (2017) [14] cũng đã giải trình tự gen này ở loài *T. rubrofasciata* thu thập được ở Quảng Châu, Trung Quốc. Ở Việt Nam, Trương Xuân Lam [15] đã giải trình tự một phần gen COII và gen Cyto-B để định danh và phân loại 7 mẫu BXHM thu được quanh khu vực Hà Nội. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày phương pháp khuếch đại và giải trình tự hai gen ty thể, Cyto-B và COII, trong định loại đối tượng nghiên cứu.

Phương pháp sinh học phân tử trong phân loại BXHM

Các bước phân tích định danh loài sử dụng phương pháp sinh học phân tử được tóm lược và sơ đồ hóa như hình 1. Một cách giản lược, quy trình sử dụng các trình tự đặc trưng loài để định danh, phân loại và xây dựng cây phân loại bao gồm 4 bước [7]. Bước 1: lựa chọn những đoạn ADN giống nhau nhất ở nhóm loài nghi ngờ mẫu thuộc vào để thiết kế mồi. Bước 2: tách chiết ADN từ mẫu thu thập và thực hiện phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR). Bước 3: giải trình tự và loại bỏ trình tự của các mồi để có được đoạn trình tự đem so sánh. Bước 4: so sánh trình tự thu được với các trình tự khác lấy về từ ngân hàng trình tự đã được công bố trước đây để định danh cá thể mẫu thuộc loài nào và xây dựng cây phân loại.



Hình 1. Quy trình định loài BXHM bằng phương pháp sinh học phân tử.

Tách ADN tổng số

ADN của bộ xét được phân lập bằng cách sử dụng bộ kit Anapure Tissue ADN mini Kit (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội). Mẫu mô từ các bộ phận khác nhau: chân trước cùng mô ngực đi kèm, phần đầu bộ xét, và chân sau cùng mô bụng đi kèm được sử dụng để phân lập ADN. Các mẫu mô được cho vào các ống eppendorf 2 ml chứa bi sắt đã được làm lạnh trước. Cho 100 μ l đệm phân hủy mô vào ống chứa mẫu và đưa lên giá phá mẫu của hệ thống Tissue Lysis LT (QIAGEN, Mỹ). Mẫu được phá ở tần số 30 Hz trong 40 giây. Sau khi phá, các mẫu được cân bằng với đệm phân hủy mô và ly tâm ở 3.000 v/ph trong 2 phút, dịch nổi được chuyển sang một ống eppendorf mới. Để tiếp tục thủy phân các tế bào, 200 μ l đệm phân hủy mô và 40 μ l proteinase K được thêm vào dịch nổi, trộn đều và ủ ở 60°C trong 2h. Mẫu sau khi ủ được ly tâm 8.000 v/ph trong 1 phút và loại bỏ cạn. Thêm 600 μ l đệm bám cột và 200 μ l Isopropanol vào dịch mẫu và trộn đều bằng cách đảo ống xuôi - ngược 10 lần. Chuyển dung dịch mẫu lên cột tách ADN và ly tâm 8.000 v/ph trong 1 phút. Sau khi loại dịch qua cột, 600 μ l đệm rửa 1 vào cột, ly tâm 8.000 v/ph trong 1 phút và loại dịch qua cột. ADN trên cột được rửa thêm một lần với 600 μ l đệm rửa 2, ly tâm 8.000 v/ph trong 1 phút. Sau khi loại đệm rửa 2, cột tiếp tục được ly tâm 11.000 v/ph trong 1 phút để loại bỏ hoàn toàn dịch trên màng. Cột được chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml vô trùng mới; 50 μ l đệm rửa giải ADN (đã được làm ấm trước ở 45°C) vào chính giữa màng của cột, để cột đứng yên 3 phút ở nhiệt độ phòng trước khi ly tâm 11.000 v/ph trong 1 phút. Dịch qua cột chứa ADN trong ống eppendorf được thu lại và sử dụng trong các bước tiếp theo.

Sau khi phân tách, nồng độ của ADN được xác định bằng cách sử dụng hệ thống Nano Drop 2000 (Thermo scientific, Mỹ). ADN tổng số cũng đồng thời được điện di kiểm tra trên gel agarose để hiển thị nồng độ tương đối và độ toàn vẹn của ADN hệ gen thu được.

Thiết kế mồi

Hai gen Cyto-B và COII, mang các trình tự bảo thủ đặc trưng loài, được lựa chọn theo các công bố trước đây để định danh mẫu nghiên cứu bằng phương pháp sinh học phân tử. Hai cặp mồi phổ quát trong bảng 1 được lựa chọn và sử dụng để nhân những đoạn ADN có mang những khác biệt giữa các loài trong phân họ BXHM theo một số nghiên cứu trước [16-18]. Cụ thể, cặp mồi được dùng để khuếch đại gen Cyto-B được tham khảo từ nghiên cứu của Justi và cs [18]. Trong nghiên cứu đó, tác giả đã ghép cặp một mồi xuôi trong một nghiên cứu của Monteiro và cs [16] với mồi ngược trong một nghiên cứu khác, tạo nên cặp mồi để nhân lên đoạn Cyto-B và sử dụng trình tự được nhân lên để xây dựng cây phân loại cho phân họ BXHM. Cặp mồi cho COII được tham khảo từ công bố của Patterson và Gaunt năm 2010 [17], cũng là cặp mồi đã được Justi và cs [18] sử dụng cho việc xây dựng cây phân loại của phân họ BXHM.

Bảng 1. Trình tự mồi Cyto-B và COII.

Tên mồi	Trình tự
Cyto-B F	5'-GGACGATGGATATTATTATGGATC-3'
Cyto-B R	5'-ATTACTCCTCCTAGYTTATTAGGAATT-3'
COII F	5'-ATGATTTTAAGCTTCATTATATAAAGAT-3'
COII R	5'-GTCTGAATATCATATCTTCAATATCA-3'

Tối ưu hóa phản ứng chuỗi trùng hợp

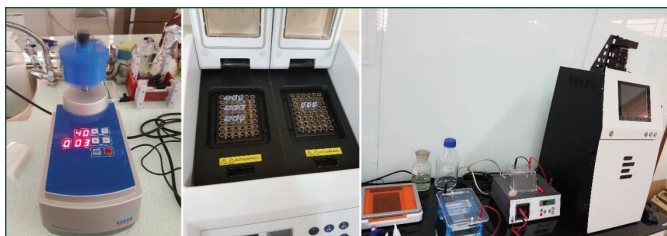
PCR nhằm khuếch đại một trình tự ADN nhất định cần được tối ưu để thu được 1 băng đặc hiệu (thể hiện trên kết quả điện di sản phẩm PCR). Quá trình tối ưu hóa được chú trọng vào nồng độ đầu vào của ADN khuôn, nồng độ mồi, nhiệt độ gắn mồi, và số chu kỳ của phản ứng. Nhiệt độ gắn mồi được tối ưu bằng cách sử dụng dải nhiệt độ gắn mồi trong khoảng từ T_m-8 đến T_m-3 (T_m : nhiệt độ nóng chảy của mồi), với mỗi bước nhiệt độ là $\pm 1^\circ\text{C}$. Nhiệt độ gắn mồi mà ở đó sản phẩm PCR được tạo ra đặc hiệu và hiệu quả nhất sẽ được lựa chọn. Giữ nguyên nhiệt độ gắn mồi đã chọn, tiếp tục tối ưu lượng ADN khuôn đầu vào bằng cách thực hiện phản ứng PCR với 3 nồng độ DNA tương ứng 125 ng, 250 ng và 375 ng. Tương tự, điều kiện phản ứng nào cho lượng sản phẩm lớn nhất (băng rõ nhất) với tính đặc hiệu cao nhất (một băng duy nhất) sẽ được lựa chọn. Tiếp theo, dựa vào mức độ đậm nhạt của băng sản phẩm thu được để tăng hoặc giảm số chu kỳ để thu được lượng sản phẩm phù hợp với yêu cầu cho những thử nghiệm tiếp theo. Số lượng

chu kỳ thường dao động từ 30 đến 40 chu kỳ, tùy tính hiệu quả và đặc hiệu của phản ứng PCR.

Các điều kiện đã tối ưu được đưa ra trong phần kết quả cùng với trình tự đoạn gen và kết quả phân tích so sánh.

Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Sau khi kết thúc phản ứng PCR, 3 μ l hỗn hợp sau phản ứng được trộn với 0,6 μ l đệm tra mẫu 6X (6X loading dye, Thermo scientific, Mỹ) có bổ sung thuốc nhuộm ADN redsafe (Intron, Hàn Quốc) và tra lên gel agarose 1,2%. Thang chuẩn ADN 100 bp (DNA marker, 100 bp, BM301) cũng đồng thời được tra lên 1 giếng riêng biệt để xác định kích thước tương đối của sản phẩm sau khi điện di. Các mẫu và thang chuẩn trên gel được phân tách trong đệm TBE 1X, dưới điện trường 100 vôn, trong 30 phút. Sau khi chạy điện di, các băng ADN được hiện dưới kích thích của ánh sáng UV và chụp hình sử dụng hệ thống Gel doc E-box (hình 2). Trong trường hợp phân tách ADN tổng số, các điều kiện điện di tương tự được áp dụng, ngoại trừ thang chuẩn 1 kb (DNA marker, 1 kb, M3084) được sử dụng thay cho thang 100 bp.



Hình 2. Kiểm tra sản phẩm PCR và ADN tổng số. Bên trái: phá mẫu trên máy Tissue Lysis LT; ở giữa: phản ứng PCR; bên phải: điện di và chụp sản phẩm PCR trên máy E-box.

Giải trình tự và loại bỏ trình tự môi

Sau khi thực hiện khuếch đại trình tự DNA đích, sản phẩm của phản ứng PCR được tinh sạch để loại bỏ môi, các nucleotide còn dư và giải trình tự (Công ty Phù Sa, TP Cần Thơ). Trình tự cặp môi được tìm kiếm và loại bỏ khỏi trình tự trong tệp TEXT của mỗi đoạn gen.

So sánh trình tự nhận được với các trình tự đã được công bố

Sau khi loại bỏ trình tự môi, các trình tự được so sánh với các trình tự đã công bố trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng cách sử dụng công cụ thuật toán cơ bản của NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Kết quả so sánh cho biết thông tin về đoạn gen, về loài mang đoạn gen được nhân lên thông qua các trình tự có mức độ tương đồng lớn nhất được lưu trên ngân hàng dữ liệu.

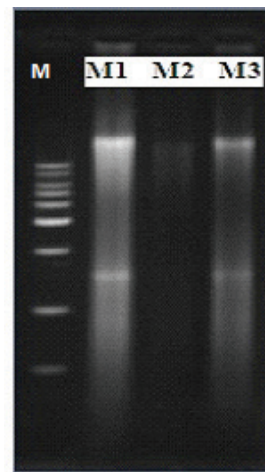
Để phân tích sâu hơn, các trình tự Cyto-B của các mẫu *T. rubrofasciata* đã được công bố trước đây và lưu trên ngân hàng dữ liệu NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), bao gồm trình tự Cyto-B của mẫu Hà Nội 1 (mã số: KR632555.1), của mẫu Hà Nội 2 (mã số: KR632556.1) và của mẫu từ Đài Loan (mã số: KP899111.1) được tải về và sử dụng để phân tích so sánh với trình tự thu được trong nghiên cứu này. Việc phân tích được thực hiện trên server CLUSTAL O (1.2.4) so sánh đa trình tự, miễn phí (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Kết quả và thảo luận

Nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu ADN

Kết quả ADN thu được từ các bộ phận khác nhau của bộ xít tương ứng là 136,6 ng/ μ l, 15 ng/ μ l và 100,3 ng/ μ l (hình 3) với chỉ số A260/A280 tương ứng là 2,0, 1,6 và 1,9. Mẫu M1 và M3 có tỷ lệ A260/A280 nằm trong khoảng tối ưu (1,8-2,0) trong khi tỷ lệ này ở mẫu M2 là 1,6, chứng tỏ ADN của mẫu M1 và M3 là tinh khiết, trong khi mẫu ADN M2 bị nhiễm protein.

So sánh về nồng độ và chất lượng ADN cùng với sự thuận tiện trong thao tác cho thấy, mẫu chân trước kèm mô ngực dễ dàng thao tác, cho nồng độ ADN tổng số cao, đảm bảo cho các thí nghiệm tiếp theo. Các mẫu ADN sau đó đã được phân lập từ chân trước kèm mô ngực của bộ xít để sử dụng cho việc nhân lên đoạn gen đặc trưng loài sử dụng PCR.

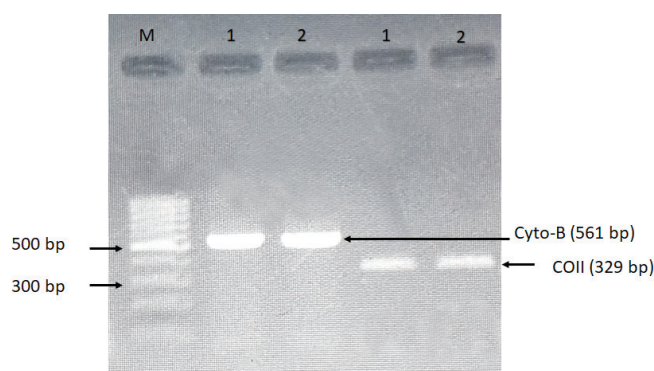


Hình 3. ADN tổng số được phân lập từ các phần khác nhau của bộ xít *T. rubrofasciata*. M: thang ADN chuẩn 1 kb; M1: tách từ chân và mô ngực bộ xít đi kèm; M2: tách từ đầu bộ xít; M3: tách từ chân sau và mô bụng bộ xít đi kèm.

Quy trình phản ứng PCR đã được tối ưu hóa theo thiết kế nêu trong phần phương pháp, mỗi phản ứng bao gồm 250 ng ADN tổng số, nồng độ mỗi môi 10 pmol/ μ l. Chu trình nhiệt của phản ứng sau khi tối ưu gồm các bước: 95°C trong

5 phút; 35 chu kỳ lặp lại 95°C - 1 phút, 55°C - 30 giây, 72°C - 45 giây và 72°C - 10 phút.

Chu trình PCR tối ưu như trên đã nhân lên các sản phẩm đặc hiệu (1 băng sản phẩm duy nhất có kích thước như dự kiến) với nồng độ cao (hình 4). Sản phẩm PCR được giải trình tự và so sánh với ngân hàng dữ liệu quốc tế về gen ở côn trùng.



Hình 4. Sản phẩm PCR với cặp mồi Cyto-B và COII. M: thang chuẩn ADN 100 bp; số 1 và 2 là sản phẩm PCR nhân lên từ ADN của 2 cá thể (số 1 và số 2) với hai cặp mồi tương ứng.

Trình tự Cyto-B của BXHM ở miền Trung Việt Nam

Trình tự đoạn gen cytochrome B của BXHM *T. rubrofasciata* tại miền Trung Việt Nam chứa 507 nucleotide được trình bày trong bảng 2, được gửi lưu trên genbank với số hiệu MN215889 (online ngày 15/3/2020). Trình tự này được so sánh với các trình tự của gen này ở các quần thể lân cận đã được công bố trước đây sử dụng server miễn phí CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

Bảng 2. Trình tự 507 bp của gen Cyto-B từ *T. rubrofasciata* tại miền Trung Việt Nam.

```
CATTGGGGTGATTTTATTATTCATAATTATAGGAACTGCATTTT
TAGGGTATGTCTTACCCTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGC
AACAGTTATTACTAAGTTGTTATCTGCTATCCCGTACTTAGGAAA
TGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGGATTCTCAGTAGATA
ACGCTACTTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCA
TTCATTATTGCAGCATTAGTATTAATCCATTACTCTTCTCCATC
AAACAGGATCTAATAATCCATTAGGATTAATAGAAATTTTGA
TAAATCCCATTTCACCCATATTTCTCTATTAAGACCTTATAGGA
GTATCAATAACCCCTTATTTCTTATCCTACTAAACCTTTGAGAAC
CTCGATTATTGGGAGACCCCTGAAAACCTTATCCCAGCCAACCC
ATTAGTTACCCCGTTTCATATCCAACAGAATGGTATTTCTATT
TGCATACGCAATTCTACGATC
```

Kết quả so sánh đa trình tự cho thấy, trình tự đoạn gen Cyto-B ở quần thể *T. rubrofasciata* tại miền Trung Việt Nam hoàn toàn trùng khớp với các trình tự từ các cá thể đã thu thập được ở Hà Nội (Việt Nam) và Đài Loan (hình 5).

KP899111.1: Taiwan. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=KP899111.1>
 KR632555.1: Clone 1 Hanoi. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=KR632555.1%3A>
 KR632556.1: Clone 2; Hanoi. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=KR632556.1>

Central.VN	CATTGGGGTGATTTTATTATTCATAATTATAGGAACTGCATTTT	60
KP899111.1	CATTGGGGTGATTTTATTATTCATAATTATAGGAACTGCATTTT	60
KR632555.1	-----TTTCAATATATAGGAACTGCATTTT	41
KR632556.1	-----TTTCAATATATAGGAACTGCATTTT	41
Central.VN	CTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGCAACAGTTATTACTAAGTTGTTATCTGCTATCCC	120
KP899111.1	CTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGCAACAGTTATTACTAAGTTGTTATCTGCTATCCC	120
KR632555.1	CTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGCAACAGTTATTACTAAGTTGTTATCTGCTATCCC	101
KR632556.1	CTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGCAACAGTTATTACTAAGTTGTTATCTGCTATCCC	101
Central.VN	GTACTTAGGAAATGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGATTCTCAGTAGATAACGCTAC	180
KP899111.1	GTACTTAGGAAATGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGATTCTCAGTAGATAACGCTAC	180
KR632555.1	GTACTTAGGAAATGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGATTCTCAGTAGATAACGCTAC	161
KR632556.1	GTACTTAGGAAATGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGATTCTCAGTAGATAACGCTAC	161
Central.VN	TTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCATTGATTGACAGCATTAGTATT	240
KP899111.1	TTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCATTGATTGACAGCATTAGTATT	240
KR632555.1	TTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCATTGATTGACAGCATTAGTATT	221
KR632556.1	TTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCATTGATTGACAGCATTAGTATT	221
Central.VN	AATCCATTACTCTTTTCCATCAACAGGATCTAATAATCCATTAGGATTAATAGAAA	300
KP899111.1	AATCCATTACTCTTTTCCATCAACAGGATCTAATAATCCATTAGGATTAATAGAAA	300
KR632555.1	AATCCATTACTCTTTTCCATCAACAGGATCTAATAATCCATTAGGATTAATAGAAA	281
KR632556.1	AATCCATTACTCTTTTCCATCAACAGGATCTAATAATCCATTAGGATTAATAGAAA	281
Central.VN	TTTTGATAAAATCCCATTTTACCCATATTTCTCTATTAAGACCTTATAGGAGTATCAAT	360
KP899111.1	TTTTGATAAAATCCCATTTTACCCATATTTCTCTATTAAGACCTTATAGGAGTATCAAT	360
KR632555.1	TTTTGATAAAATCCCATTTTACCCATATTTCTCTATTAAGACCTTATAGGAGTATCAAT	341
KR632556.1	TTTTGATAAAATCCCATTTTACCCATATTTCTCTATTAAGACCTTATAGGAGTATCAAT	341
Central.VN	AACCCCTTATATCTTTATCTCTACTAAACCTTTGAGAACCTCGATTATTTGGGAGACCTGA	420
KP899111.1	AACCCCTTATATCTTTATCTCTACTAAACCTTTGAGAACCTCGATTATTTGGGAGACCTGA	420
KR632555.1	AACCCCTTATATCTTTATCTCTACTAAACCTTTGAGAACCTCGATTATTTGGGAGACCTGA	401
KR632556.1	AACCCCTTATATCTTTATCTCTACTAAACCTTTGAGAACCTCGATTATTTGGGAGACCTGA	401
Central.VN	AAACTTTATCCAGCCAACCCATTAGTTACCCGGTTCATATCAACAGAGTATGTTATTT	480
KP899111.1	AAACTTTATCCAGCCAACCCATTAGTTACCCGGTTCATATCAACAGAGTATGTTATTT	480
KR632555.1	AAACTTTATCCAGCCAACCCATTAGTTACCCGGTTCATATCAACAGAGTATGTTATTT	461
KR632556.1	AAACTTTATCCAGCCAACCCATTAGTTACCCGGTTCATATCAACAGAGTATGTTATTT	461
Central.VN	TCTATTTCATACGCAATTCTACGATC-----	507
KP899111.1	TCTATTTCATACGCAATTCTACGATCTATTCTTAATAAAGTAGGAGGGTAATTGCAAT	540
KR632555.1	TCTATTTCATACGCAATTCTACGATCTATTCTTAATAAAGTAGGAGGGTAATTGCAAT	521
KR632556.1	TCTATTTCATACGCAATTCTACGATCTATTCTTAATAAAGTAGGAGGGTAATTGCAAT	521

Hình 5. So sánh trình tự Cyto-B của *T. rubrofasciata* ở miền Trung Việt Nam với các trình tự của các quần thể loài này ở Hà Nội, Việt Nam (KR632555.1 và KR632556.1) và Đài Loan (KP899111.1).

Trình tự đoạn gen COII của BXHM ở miền Trung Việt Nam

Sau khi đã loại bỏ mồi, đoạn trình tự của COII được nhân lên có chiều dài 276 nucleotide, được trình bày trong bảng 3, được gửi lưu trên genbank với số hiệu MN215890 (online ngày 15/3/2020).

Bảng 3. Trình tự 276 bp của gen COII từ *T. rubrofasciata* tại miền Trung.

```
GCTAACTCCCCATTAATAGAACAACTTACATTTTCCATGACCACA
CCCTTATAATCTTAACAATAATCACTATTCTAGTAAGATATATAATA
GAACAATCTTCTTAAACAATAATCACTGAAATCTCTAGAAAG
ACAAACTATTGAACATAATTGAACTATTCTACAGCCCTCACTCTA
ATCTTTATCGTCTCTCCAAAGATTACAAATTCTATACTTAATAGATGA
ATTAAACAACCATTAATAACAATTAAATCTATTGGCCATCAA
```

Kết quả so sánh, tìm kiếm các trình tự tương đồng trên ngân hàng dữ liệu gen NCBI cho thấy, đoạn trình tự này hoàn toàn giống với một đoạn trong hệ gen ty thể của *T. rubrofasciata* được Dong và cs [19] công bố và đăng ký với mã số MH934953.1 vào tháng 9/2018 (hình 6).

Triatoma rubrofasciata mitochondrion, complete genome
Sequence ID: MH934953.1 Length: 17150 Number of Matches: 1

Range 1: 3030 to 3305		GenBank	Graphics	Next Match	Prev
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
510 bits(276)	8e-141	276/276(100%)	0/276(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GCTAACTCCCCATTAATAGAACAACTTACATTTTCCATGACCACCCCTTATAATCTTA	60			
Sbjct 3030		3089			
Query 61	ACAATAATCACTATTCTAGTAAAGATATATAAAGAACAACTTCTTTAAACAAATTAACC	120			
Sbjct 3090		3149			
Query 121	AATCGAAATCTTCTAGAAAGGACAACTATTGAACATAATTTGAACATTCTACAGCCCTC	180			
Sbjct 3150		3209			
Query 181	ACTCTAATCTTTATCGCTCTCCCAAGATTACAAATCTATACTTAATAGATGAATTAAC	240			
Sbjct 3210		3269			
Query 241	AAACCATTAAATAACAATTAAATCTATTGGCCATCAA	276			
Sbjct 3270		3305			

Hình 6. Lai đoạn trình tự COII của *T. rubrofasciata* ở miền Trung với các trình tự trên ngân hàng gen.

Quy trình PCR trong nghiên cứu này đã được tối ưu cho hai đoạn gen đặc trưng loài với sản phẩm PCR có thể giải trình tự trực tiếp. Đặc biệt, quy trình đã được tối ưu trong điều kiện sử dụng tối đa các nguyên vật liệu và dịch vụ của Việt Nam. Các kết quả sinh học phân tử đã khẳng định mẫu nghiên cứu của chúng tôi chính xác là loài BXHM *T. rubrofasciata*, đồng thời cung cấp dẫn liệu về gen ty thể của *T. rubrofasciata* ở Việt Nam. Đặc biệt, trình tự COII trong nghiên cứu cũng là đoạn trình tự đầu tiên của gen này được công bố cho loài *T. rubrofasciata* ở Việt Nam.

Kết luận

Phương pháp định danh bằng sinh học phân tử cho kết quả chính xác với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, giúp định danh chính xác các loài, đặc biệt là các loài gần, loài đồng hình, có ý nghĩa lớn trong phân loại học hiện nay. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, phương pháp định danh sinh học phân tử hoàn toàn có thể triển khai trong điều kiện phòng thí nghiệm đơn giản, sử dụng các hóa chất và dịch vụ nội địa phục vụ nghiên cứu định danh và phân loại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.A. Innis, K.B. Myambo, D.H. Gelfand, M.A. Brow (1988), "DNA sequencing with thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85**(24), pp.9436-9440.
- [2] B. Rannala, Z. Yang (2003), "Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci", *Genetics*, **164**, pp.1645-1656.
- [3] Z. Yang, B. Rannala (2010), "Bayesian species delimitation using multilocus sequence data", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, pp.9264-9269, DOI: 10.1073/pnas.0913022107.
- [4] M. Sutou, T. Kato, M. Ito (2011), "Recent discoveries of armyworms in Japan and their species identification using DNA barcoding", *Mol. Ecol. Resour.*, **11**, pp.992-1001, DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03040.x.
- [5] K. Candek, M. Kuntner (2015), "DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales",

Mol. Ecol. Resour., **15**, pp.268-277, DOI: 10.1111/1755-0998.12304.

[6] S. Hassold, et al. (2016), "DNA barcoding of Malagasy rosewoods: towards a molecular identification of CITES-listed *Dalbergia* species", *PLOS ONE*, **11**, DOI: 10.1371/journal.pone.0157881.

[7] A. Linacre, James Chun-I Lee (2005), "Species determination: the role and use of the cytochrome b gene", *Methods in Molecular Biology*, **297**, DOI: 10.1007/978-1-4939-3597-0_20.

[8] A. Chan, et al. (2014), "DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore", *Parasite Vector*, **7**, DOI: 10.1186/s13071-014-0569-4.

[9] J. Li, et al. (2015), "DNA barcoding of Murinae (Rodentia: Muridae) and Arvicolinae (Rodentia: Cricetidae) distributed in China", *Mol. Ecol. Resour.*, **15**, pp.153-167, DOI: 10.1111/1755-0998.12279.

[10] O. Hawlitschek, et al. (2016), "Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany", *Mol. Ecol. Resour.*, **16**, pp.242-253, DOI: 10.1111/1755-0998.12416.

[11] R.T. Schuh, J.A. Slater (1995), *True Bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera)*, Classification and Natural History, NCROL.

[12] F.A. Monteiro, A.A. Escalante, C.B. Beard (2001), "Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective", *Trends in Parasitology*, **17**(7), pp.344-347, DOI: 10.1590/S0001-37652005000300007.

[13] D.F. Lyman, F.A. Monteiro, A.A. Escalante, C. Cordon-Rosales, D.M. Wesson, J.P. Dujardin, C.B. Beard (1999), "Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, pp.377-386.

[14] Q. Liu, Y.H. Guo, Y. Zhang, Z.B. Zhou, L.L. Zhang, D. Zhu, X.N. Zhou (2017), "First records of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera, Reduviidae) in Foshan, Guangdong Province, Southern China", *Infect. Dis. Poverty*, **6**, DOI: 10.1186/s40249-017-0342-y.

[15] Trương Xuân Lam (2017), *Bọ xít hút máu tại Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.

[16] F.A. Monteiro, T.V. Barrett, S. Fitzpatrick, C. Cordon-Rosales, D. Feliciangeli, C.B. Beard (2003), "Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*", *Mol. Ecol.*, **12**, pp.997-1006, DOI: 10.1046/j.1365-294X.2003.01802.x.

[17] P.S. Patterson, M.W. Gaunt (2010), "Phylogenetic multilocus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America", *Mol. Phyl. Evol.*, **56**, pp.608-621, DOI: 10.1016/j.ympev.2010.04.038.

[18] S.A. Justi, C.A. Russo, J.R. Mallet, M.T. Obara, C. Galvão (2014), "Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)", *Parasites & Vectors*, **7**, pp.145-149.

[19] L. Dong, X. Ma, M. Wang, D. Zhu, Y. Feng, Y. Zhang, J. Wang (2018), "Complete mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma rubrofasciata*", *The Korean Journal of Parasitology*, **56**(5), DOI: 10.3347/kjp.2018.56.5.515.

Phân tích mối liên quan giữa bạch cầu tinh dịch và một số chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh

Đoàn Thị Kim Phượng^{1,2*}, Phan Văn Hưởng¹, Vũ Thị Hà^{1,2}, Nguyễn Hoài Bắc^{1,2}, Hoàng Thị Ngọc Lan¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 26/5/2020; ngày chuyển phản biện 29/5/2020; ngày nhận phản biện 22/6/2020; ngày chấp nhận đăng 26/6/2020

Tóm tắt:

Bạch cầu (BC) tăng cao trong tinh dịch có thể là nguyên nhân gây giảm số lượng và chất lượng của tinh trùng, cũng có thể liên quan tới các bệnh đường sinh dục như: nhiễm trùng đường sinh dục - tiết niệu, tắc ống dẫn tinh... Nghiên cứu này nhằm mục đích tìm mối liên quan giữa số lượng BC tinh dịch với số lượng, độ di động và hình thái tinh trùng ở nam giới vô sinh. 400 mẫu tinh dịch của những bệnh nhân nam trong độ tuổi 28-50 đã được xác định là vô sinh, đến khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, được phân tích tinh dịch đồ theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) 2000. Các mẫu có số lượng tế bào tròn ≥ 1 triệu/ml (tế bào tròn cao) được tiến hành nhuộm và đếm BC tinh dịch bằng phương pháp nhuộm peroxidase. Kết quả cho thấy, tỷ lệ mẫu có số tế bào tròn cao chiếm 26%; tỷ lệ mẫu có BC tinh dịch cao chiếm 6,25%. Mật độ tinh trùng trung bình trong nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao và nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp tương ứng là 90,48 triệu/ml và 71,16 triệu/ml. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp có trung bình tỷ lệ tinh trùng hình thái bình thường là 9,22%, cao hơn giá trị trung bình này là 7,44% ở nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp có trung bình tốc độ di động là 41,6 $\mu\text{m/s}$, cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (35,3 $\mu\text{m/s}$). Kết luận: số lượng BC trong tinh dịch tăng cao ≥ 1 triệu/ml có liên quan với giảm tốc độ di động trung bình và giảm tỷ lệ hình thái bình thường của tinh trùng. Số lượng BC trong tinh dịch không ảnh hưởng đến mật độ tinh trùng. Đây là một gợi ý cho mục đích tăng chất lượng tinh trùng thì cần giảm sự xuất hiện BC trong tinh dịch nam giới vô sinh.

Từ khóa: bạch cầu tinh dịch, tinh dịch đồ, vô sinh nam.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Tinh dịch đồ là một trong những xét nghiệm cơ bản nhất đánh giá chức năng sinh sản của nam giới trong độ tuổi sinh sản [1, 2]. Trong tinh dịch người, ngoài tinh trùng trưởng thành còn có các loại tế bào như tế bào bong, tinh trùng non, BC. Các tế bào này được gọi chung là các “tế bào tròn”, để phân biệt với các tinh trùng trưởng thành. Số lượng tế bào tròn trong tinh dịch bình thường cho phép < 1 triệu/ml [3]. Khi các tế bào này tăng quá mức cho phép, dù là BC hay tinh trùng non đều là một trong các nguyên nhân gây vô sinh ở nam giới. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, BC > 1 triệu/ml liên quan tới các bệnh đường sinh dục như: nhiễm trùng đường sinh dục - tiết niệu, tắc ống dẫn tinh, giãn tĩnh mạch thừng tinh, giảm chức năng tuyến sinh dục phụ. BC tăng cao còn liên quan đến giảm số lượng và chất lượng của tinh trùng do BC có thể sản xuất ra các sản phẩm chuyển hóa như ROS (reactive oxygen species) [4]. Các sản phẩm này làm tăng stress oxy hóa, gây tổn thương tế bào tinh

trùng, đặc biệt là DNA và màng tế bào [5]; tăng nguy cơ vô sinh, sảy thai, đẻ non và các bệnh lý di truyền [6]. Việc phân biệt các tế bào tròn nhiều quá mức trong tinh dịch là tế bào sinh tinh non hay BC có vai trò quan trọng trong chẩn đoán và quyết định điều trị [7]. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu: “Phân tích mối liên quan giữa BC tinh dịch và một số chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh” nhằm mục đích tìm mối liên quan giữa số lượng BC tinh dịch với số lượng, độ di động và hình thái tinh trùng ở nam giới vô sinh.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu là 400 mẫu tinh dịch của những bệnh nhân nam trong độ tuổi 28-50 đã được xác định là vô sinh, đến khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ tháng 8/2018 đến tháng 6/2019. Nam giới vô sinh đã rõ nguyên nhân không thuộc đối tượng nghiên cứu.

Nghiên cứu mô tả cắt ngang. Bệnh nhân được thu thập thông tin, lấy mẫu tinh dịch bằng phương pháp thủ dâm

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

Analysis of the relationship between leucospermia and seminal parameters in infertile men

Thi Kim Phuong Doan^{1,2*}, Van Huong Phan¹,
Thi Ha Vu^{1,2}, Hoai Bac Nguyen^{1,2}, Thi Ngoc Lan Hoang¹

¹Hanoi Medical University

²Hanoi Medical University Hospital

Received 26 May 2020; accepted 26 June 2020

Abstract:

Leucospermia may cause a decrease in the number and quality of sperm, which may also be related to genital tract diseases such as urogenital tract infections, vasectomy, etc. This study aims to find out a link between leucospermia and some semen parameters in infertile men. A total of 400 semen samples of infertility males aged from 28 to 50 were tested for semen parameters according to WHO 2000 standards. The samples with round cells ≥ 1 million/ml were stained and counted leucocytes in semen by the peroxidase staining method. The results showed that the percentage of samples with round cells ≥ 1 million/ml accounted for 26%, the proportion of samples with leucospermia accounted for 6.25%. The mean sperm densities in the group of leucospermia and the group of non-leucospermia were 90.48 million/ml and 71.16 million/ml, respectively. This difference was not statistically significant with $p > 0.05$. The group of non-leucospermia had an average normal morphological sperm count of 9.22%, higher significantly than this average value of 7.44% in the group of leucospermia. The group of non-leucospermia had mean sperm motility of 41.6 $\mu\text{m/s}$, significantly higher ($p < 0.05$) than the group of leucospermia (35.3 $\mu\text{m/s}$). Conclusions: an increased number of white blood cells in the semen ≥ 1 million/ml related to a reduction in the average rate of motility and reduced the normal morphological sperm ratio. Leucospermia did not affect sperm density. This is a suggestion for the improvement of sperm quality by reducing the number of white blood cells in the male infertility semen.

Keywords: leucospermia, male infertility, semen parameters.

Classification number: 3.2

(kiêng xuất tinh từ 2-7 ngày). Các mẫu tinh dịch được đánh giá số lượng tế bào tròn, độ pH tinh dịch, mật độ, tốc độ di động và hình thái tinh trùng theo tiêu chuẩn của WHO. Các mẫu có số lượng tế bào tròn ≥ 1 triệu/ml được tiến hành nhuộm BC tinh dịch bằng phương pháp nhuộm peroxidase (kit Baso diagnostics của Hãng Inc. Zhuhai, Đài Loan). Tế bào dương tính với peroxidase (tế bào/ml bắt màu nâu) là các tế bào BC. Đếm số lượng tế bào tròn bằng buồng đếm Makler. Tế bào tròn là những tế bào có hình tròn, bờ rõ, không có đầu, cổ, đuôi.

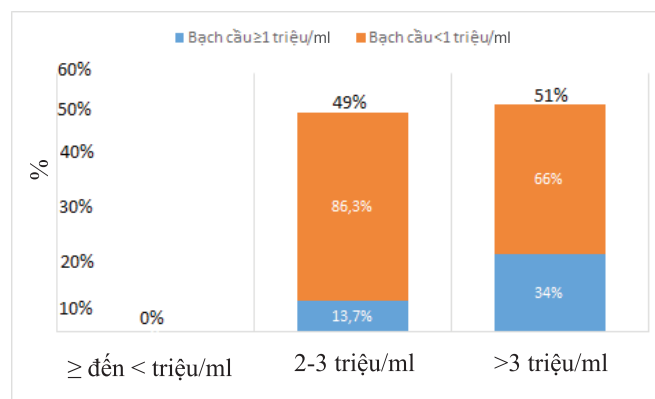
Đánh giá mật độ và độ di động tinh trùng bằng máy CASA (Computer - Aided Semen Analysis). Khả năng di động của tinh trùng được phân loại như sau: di động tiến tới nhanh (tốc độ di động $\geq 25 \mu\text{m/s}$) và tiến tới chậm (tốc độ di động từ 5-25 $\mu\text{m/s}$); di động không tiến tới hoặc di động tại chỗ (tốc độ di động từ 0-5 $\mu\text{m/s}$); không di động (IM - immotility): tất cả các trường hợp tinh trùng không di động, nằm yên tại chỗ. Đánh giá hình thái tinh trùng bằng kỹ thuật nhuộm Hematoxylin và Eosin sử dụng kính hiển vi độ phóng đại 400 lần và phân loại tinh trùng bình thường, tinh trùng bất thường đầu, cổ, đuôi và bất thường bào tương.

Quản lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và xử lý số liệu thu thập được trên phần mềm SPSS phiên bản 20.0. Bệnh nhân được giải thích rõ về mục đích của nghiên cứu và hoàn toàn tự nguyện tham gia nghiên cứu.

Kết quả

Tỷ lệ mẫu có BC tinh dịch cao trong quần thể nghiên cứu

Trong quần thể 400 nam giới vô sinh đến khám tại Phòng khám Nam khoa - Tiết niệu và Trung tâm Tư vấn di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, có 104 mẫu tinh dịch xuất hiện số lượng tế bào tròn ≥ 1 triệu/ml (tế bào tròn cao), chiếm 26%. Trong đó có 25 mẫu có số lượng BC ≥ 1 triệu/ml (tế bào BC cao), chiếm 6,25% tổng số mẫu tinh dịch của nam giới vô sinh; chiếm 24% tổng số mẫu có tế bào tròn cao.



Biểu đồ 1. Tỷ lệ xuất hiện BC cao ở các nhóm tinh dịch có số lượng tế bào tròn cao.

Trong 104 mẫu có tế bào tròn cao, nhóm có số lượng tế bào tròn trong khoảng 2-3 triệu/ml chiếm 49%, nhóm có số lượng tế bào tròn >3 triệu/ml chiếm 51%. Không có mẫu nào thuộc nhóm có số lượng tế bào tròn từ 1 đến <2 triệu/ml.

Trong nhóm tế bào tròn từ 2-3 triệu/ml và nhóm tế bào tròn >3 triệu/ml, tỷ lệ mẫu có BC cao tương ứng là 13,7 và 34%. Như vậy, tỷ lệ mẫu có BC cao tăng cao tương ứng với số lượng tế bào tròn cao trong mẫu tinh dịch (biểu đồ 1).

Mối liên quan giữa số lượng BC với mật độ tinh trùng

Mật độ tinh trùng trung bình trong nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (≥ 1 triệu/ml) và nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp (<1 triệu/ml) tương ứng là 90,48 triệu/ml và 71,16 triệu/ml (bảng 1). Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ ($p = 0,094$) theo kiểm định T-test, độ tin cậy 95%.

Bảng 1. Số lượng BC và trung bình mật độ tinh trùng.

Số lượng mẫu có BC cao/thấp	n=79 (<1 triệu/ml)	n=25 (≥ 1 triệu/ml)	P
Trung bình mật độ tinh trùng (triệu/ml)	71,16 $\pm$ 47,88	90,48 $\pm$ 55,75	0,094

Trong nhóm mật độ tinh trùng <15 triệu/ml, có 19% số trường hợp có BC <1 triệu/ml, 8% số trường hợp có BC ≥ 1 triệu/ml. Trong nhóm mật độ tinh trùng ≥ 15 triệu/ml, có 81% số trường hợp có BC <1 triệu/ml, 92% số trường hợp có BC ≥ 1 triệu/ml. Không có sự khác biệt với $p > 0,05$ ($p = 0,351$) theo kiểm định Fisher's Exact với độ tin cậy 95% (bảng 2).

Bảng 2. Số lượng BC trong tinh dịch và tình trạng thiểu tinh, vô tinh.

Số lượng BC Mật độ tinh trùng	BC <1 triệu/ml		BC ≥ 1 triệu/ml		Tổng		P
	n	%	n	%	n	%	
<15 triệu/ml (thiểu tinh, vô tinh)	15	19	2	8	17	16,3	0,351
≥ 15 triệu/ml	64	81	23	92	87	83,7	
Tổng	79	100	25	100	104	100	

Mối liên quan giữa số lượng BC với hình thái tinh trùng

Nhóm bệnh nhân số lượng BC thấp có trung bình tỷ lệ tinh trùng hình thái bình thường là 9,22%, cao hơn giá trị trung bình này là 7,44% ở nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (bảng 3). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ theo kiểm định T-test.

Trung bình tỷ lệ tinh trùng bất thường đầu, cổ, đuôi ở hai nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao và thấp là không khác biệt với $p > 0,05$ theo kiểm định T-test.

Bảng 3. Mối liên quan giữa số lượng BC trong tinh dịch với hình thái tinh trùng.

Số lượng mẫu có BC cao/thấp	n=79 (<1 triệu/ml)	n=25 (≥ 1 triệu/ml)	p
Trung bình tỷ lệ tinh trùng hình thái bình thường (%)	9,22 $\pm$ 3,97	7,44 $\pm$ 3,00	0,043
Trung bình tỷ lệ tinh trùng bất thường đầu (%)	58,33 $\pm$ 17,78	61,36 $\pm$ 8,22	0,413
Trung bình tỷ lệ tinh trùng bất thường cổ (%)	14,61 $\pm$ 7,27	15,16 $\pm$ 5,34	0,727
Trung bình tỷ lệ tinh trùng bất thường đuôi (%)	14,05 $\pm$ 9,60	13,96 $\pm$ 3,86	0,963

Mối liên quan giữa số lượng BC trong tinh dịch với độ di động tinh trùng

Nhóm bệnh nhân có số lượng BC trong tinh dịch thấp có trung bình tốc độ di động là 41,6 μ m/s, cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (35,3 μ m/s) (bảng 4).

Các mức độ di động nhanh, chậm, không tiến tới và không di động ở hai nhóm bệnh nhân có số lượng BC trong tinh dịch cao và thấp không có sự khác biệt với $p > 0,05$ theo kiểm định T-test.

Bảng 4. Mối liên quan giữa số lượng BC trong tinh dịch với độ di động tinh trùng.

Số lượng mẫu tinh dịch có BC cao/thấp	n=79 (<1 triệu/ml)	n=25 (≥ 1 triệu/ml)	P
Trung bình tốc độ di động (μ m/s)	41,6 $\pm$ 14,27	35,3 $\pm$ 9,59	0,042
Trung bình tỷ lệ di động nhanh (%)	36,39 $\pm$ 19,38	40,48 $\pm$ 16,30	0,343
Trung bình tỷ lệ di động chậm (%)	9,43 $\pm$ 4,47	8,16 $\pm$ 2,78	0,184
Trung bình tỷ lệ di động không tiến tới (%)	7,78 $\pm$ 5,75	7,72 $\pm$ 5,31	0,96
Trung bình tỷ lệ không di động (%)	39,94 $\pm$ 20,25	42,44 $\pm$ 17,04	0,578

Bàn luận

Trong 400 trường hợp vô sinh nam trong nghiên cứu, có 104 trường hợp có số lượng tế bào tròn trong tinh dịch cao (≥ 1 triệu/ml), tương đương với 24%. Tỷ lệ này lớn hơn so với 5,4% mẫu có tế bào tròn cao trong nghiên cứu trên 4810 mẫu tinh dịch của nam giới vô sinh của Gianpiero D. Palermo và cs (2016) [7]. Tỷ lệ số mẫu có BC cao trong tinh dịch (≥ 1 triệu/ml) chiếm 6,25% trong tổng số 400 trường hợp vô sinh nam đến làm xét nghiệm tinh dịch đồ, tỷ lệ này thấp hơn so với nghiên cứu của M. Punab và cs (2017) [8] (13,4%). Có sự khác nhau về tỷ lệ xuất hiện tế bào tròn cao và tỷ lệ xuất hiện BC cao trong nam giới vô sinh ở các nghiên cứu khác nhau có thể là do các nghiên cứu với cỡ mẫu khác nhau trên đối tượng nghiên cứu đến từ các chủng tộc khác nhau. Có 49% số mẫu có số lượng tế bào tròn trong khoảng 2-3 triệu/ml; 51% số mẫu có số lượng tế bào tròn >3 triệu/ml; không có trường hợp nào có số lượng tế bào tròn từ 1 đến <2 triệu/ml. Vì thế, các chỉ định xét nghiệm tìm BC

trong tinh dịch cần được chú ý không bỏ sót khi số lượng tế bào tròn trong tinh dịch ≥ 2 triệu/ml. Hầu hết các trường hợp có số lượng BC cao trong tinh dịch đều không có biểu hiện viêm nhiễm đường sinh dục - tiết niệu, lên đến 96%. Vì vậy, khi xuất hiện số lượng tế bào tròn cao trong tinh dịch, cần làm thêm những phương pháp tiếp theo để xác định tình trạng viêm nhiễm sinh dục - tiết niệu như: tìm BC trong tinh dịch, nuôi cấy vi khuẩn trong tinh dịch/dịch niệu đạo, PCR vi khuẩn chí hệ sinh dục - tiết niệu... Trong đó, phương pháp tìm BC trong tinh dịch có ưu điểm vượt trội về mặt thời gian, giá thành, dễ triển khai thực hiện.

Nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp có tỷ lệ tinh trùng hình thái bình thường là 9,22%, cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với giá trị này ở nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (7,44%). Điều này cho thấy, sự xuất hiện của số lượng BC cao trong tinh dịch ≥ 1 triệu/ml có tác động tiêu cực lên hình thái bình thường tinh trùng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của J.E. Lackner và cs (2010) [9] về mối liên quan giữa chất lượng tinh trùng và mật độ BC trong tinh dịch. Nghiên cứu của ông đưa ra kết luận rằng, tỷ lệ tinh trùng với hình thái bình thường ở các mẫu tinh dịch với nồng độ BC từ 0 đến 1×10^6 /ml cao hơn so với các mẫu có nồng độ BC $> 1 \times 10^6$ /ml. Nghiên cứu của J.E. Lackner và cs (2010) [9] cũng đưa ra kết luận: tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới ở các mẫu tinh dịch với nồng độ BC từ 0 đến 1×10^6 /ml cao hơn so với các mẫu có nồng độ BC $> 1 \times 10^6$ /ml. Nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy, tốc độ di động trung bình của tinh trùng ở các mẫu tinh dịch với nồng độ BC từ 0 đến 1×10^6 /ml cao hơn so với các mẫu có nồng độ BC $> 1 \times 10^6$ /ml. Việc tăng cao số lượng BC trong tinh dịch ≥ 1 triệu/ml làm giảm đáng kể tốc độ di động của tinh trùng. Khi tốc độ di động của tinh trùng thấp sẽ làm giảm khả năng gặp được trứng, ảnh hưởng đến khả năng thụ thai của tinh trùng với trứng, giảm tỷ lệ thụ thai thành công. Mật độ tinh trùng trung bình ở hai nhóm mẫu có số lượng BC cao và thấp lần lượt là 71,16 triệu/ml và 90,48 triệu/ml với sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Moubasher Alaa và cs (2018) [10] về tác động của tăng BC lên các thông số vận động của tinh trùng, DNA và tính toàn vẹn của nhiễm sắc thể.

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu được triển khai để làm sáng tỏ các chiến lược điều trị vô sinh ở nam giới có số lượng BC trong tinh dịch cao, nhưng tiêu chuẩn vàng về điều trị vẫn chưa rõ ràng. Cho đến gần đây, kháng sinh phổ rộng và các chất chống oxy hóa đã được sử dụng trong điều trị tình trạng tăng cao BC tinh dịch cho những trường hợp vô sinh nam để loại bỏ nhiễm trùng và làm giảm các gốc tự do oxy phản ứng được sản xuất bên trong ty thể của tế bào do viêm. Đánh giá hiện tại cho thấy, kháng sinh có thể cải thiện các thông số tinh trùng, giảm số lượng BC trong tinh dịch, tăng tỷ lệ điều trị khỏi viêm nhiễm do vi khuẩn và thậm chí tăng tỷ lệ mang thai, mặc dù một số báo cáo vẫn còn mâu thuẫn.

Không giống với viêm nhiễm ở nhiều cơ quan, bộ phận

khác, đối với viêm nhiễm sinh dục - tiết niệu, các triệu chứng lâm sàng khá nghèo nàn, và không có sự tương đồng rõ về mối liên quan giữa triệu chứng lâm sàng với tình trạng viêm nhiễm. Hầu hết các trường hợp có số lượng BC cao trong tinh dịch đều không gây biểu hiện viêm nhiễm sinh dục - tiết niệu. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc điều trị những nam giới vô sinh có số lượng BC cao bằng kháng sinh, kháng viêm, xuất tinh thường xuyên hay kết hợp những phương pháp trên đã cải thiện đáng kể các thông số tinh dịch và tỷ lệ mang thai. Vì vậy, việc chỉ định xét nghiệm tìm BC trong tinh dịch khi có số lượng tế bào tròn cao mặc dù không có biểu hiện viêm nhiễm sinh dục - tiết niệu là điều cần thiết, hỗ trợ cho việc điều trị vô sinh ở nam giới hiện nay. Như vậy, BC tăng cao trong tinh dịch nam giới vô sinh gợi ý liệu pháp điều trị giảm BC tinh dịch để tăng tốc độ di động và giảm hình thái bất thường của tinh trùng, làm tăng tỷ lệ thụ thai.

Kết luận

Nghiên cứu đã cho thấy, tỷ lệ BC cao trong tinh dịch của nam giới vô sinh là 6,25% (25 mẫu). Trong số các mẫu có tế bào tròn cao, mẫu có BC cao chiếm 24%. Số lượng BC trong tinh dịch không ảnh hưởng đến mật độ tinh trùng. Số lượng BC trong tinh dịch tăng cao ≥ 1 triệu/ml có liên quan đến giảm tốc độ di động trung bình và hình thái bình thường của tinh trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2010), *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 287pp.
- [2] WHO (2000), *WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis, and Management of the Infertile Male*, Cambridge University Press, pp.32-35.
- [3] E. Kessopoulou, M.J. Tomlinson, C.L. Barratt, et al. (1992), "Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes?", *J. Reprod. Fertil.*, **94**(2), pp.463-470.
- [4] R.J. Aitken, G.N. De Iulius, J.M. Finnie, et al. (2010), "Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria", *Hum. Reprod.*, **25**(10), pp.2415-2426.
- [5] A.T. Alahmar (2019), "Role of oxidative stress in male infertility: an updated review", *J. Hum. Reprod. Sci.*, **12**(1), pp.4-18.
- [6] E. Johansson, A. Campana, R. Luthi, et al. (2000), "Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study", *Hum. Reprod. Update*, **6**(4), pp.404-412.
- [7] Gianpiero D. Palermo, Queenie V. Neri, Tyler Cozzubbo, et al. (2016), "Shedding light on the nature of seminal round cells", *PLOS ONE*, **11**(3), DOI: 10.1371/journal.pone.0151640.
- [8] M. Punab, O. Poolamets, P. Paju, et al. (2017), "Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts", *Hum. Reprod.*, **32**(1), pp.18-31.
- [9] J.E. Lackner, A. Agarwal, R. Mahfouz, et al. (2010), "The association between leukocytes and sperm quality is concentration dependent" *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **8**(12), DOI: 10.1186/1477-7827-8-12.
- [10] Moubasher Alaa, Sayed Heba, Mosaad Eman, et al. (2018), "Impact of leukocytospermia on sperm dynamic motility parameters, DNA and chromosomal integrity", *Central European Journal of Urology*, **71**(4), pp.470-475.

Đánh giá mối liên quan giữa hình thái phôi nang với bất thường nhiễm sắc thể

Hoàng Minh Ngân¹, Nguyễn Đình Tảo², Nguyễn Trung Nam³, Triệu Tiên Sang^{2*}

¹Bệnh viện Đa khoa 16A Hà Đông

²Học viện Quân y

³Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST

Ngày nhận bài 24/3/2020; ngày chuyển phản biện 27/3/2020; ngày nhận phản biện 28/4/2020; ngày chấp nhận đăng 4/5/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu mối liên quan giữa hình thái phôi nang với bất thường nhiễm sắc thể (NST) được thực hiện theo phương pháp nghiên cứu hồi cứu, mô tả cắt ngang trên 953 phôi ngày 5 được làm sàng lọc NST tại Bệnh viện Đa khoa 16A Hà Đông từ tháng 2/2018 tới 5/2019 cho thấy, tỷ lệ bất thường NST rất lớn ở phôi nang (bất thường khảm chiếm 56,68%, bất thường số lượng NST là 36,65%, bất thường cấu trúc 6,67%). Số phôi bình thường chiếm đa số ở nhóm phôi phân loại hình thái tốt (69,1%). Tỷ lệ có 1, 2, 3 bất thường tăng dần ở nhóm phôi trung bình và xấu. Nguy cơ bất thường NST tăng lên khi độ giãn rộng (ĐGR) khoang phôi thấp và hình thái lá nuôi, hình thái nụ phôi (ICM) xấu. Với hình thái phôi ngày 5 xếp loại tốt, nguy cơ bất thường NST giảm ($p < 0,001$, $OR = 0,22$, $CI_{95\%} = 0,16-0,29$). Kết quả nghiên cứu cho thấy, có mối liên quan chặt chẽ giữa hình thái phôi nang với bất thường NST. ĐGR của phôi thấp, hình thái của lá nuôi, ICM và hình thái phôi nang xấu thì tỷ lệ bất thường NST tăng lên.

Từ khóa: bất thường nhiễm sắc thể, hình thái, phôi nang, sàng lọc di truyền, thụ tinh trong ống nghiệm.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Kỹ thuật hỗ trợ sinh sản được kết hợp với kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi ở những bệnh nhân có nguy cơ cao bất thường NST. Chẩn đoán rối loạn NST trước chuyển phôi giúp sàng lọc, đánh giá bất thường NST của phôi trước khi chuyển vào buồng tử cung người mẹ. Phương pháp này đã được ứng dụng trong lâm sàng cho kết quả cải thiện tỷ lệ thành công trong điều trị vô sinh và áp dụng đối với các bệnh nhân có nguy cơ cao bất thường NST, đặc biệt với những cặp vợ chồng có yếu tố nguy cơ như tuổi mẹ cao, chuyển phôi thất bại nhiều lần và sảy thai liên tiếp. Để cải thiện tỷ lệ thành công của kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (in vitro fertilization - IVF) và giảm tỷ lệ sảy thai, một số trường hợp nên cân nhắc sàng lọc rối loạn NST trước chuyển phôi (preimplantation genetic screening - PGS).

Ưu điểm của kỹ thuật PGS là không xâm lấn trên người mẹ, nhanh chóng, giảm chi phí cũng như tránh được các gánh nặng về tinh thần và có thể áp dụng cho tất cả các bệnh nhân. Gần đây, các kết quả nghiên cứu cho thấy, các cặp vợ chồng có phôi làm PGS thì tỷ lệ chuyển phôi, có thai tăng lên đáng kể [1]. Trên thế giới, đã có những nghiên cứu sử dụng các đặc điểm hình thái của phôi túi kết hợp với xét nghiệm sàng lọc di truyền của phôi nhằm lựa chọn được

phôi tiềm năng nhất để chuyển vào buồng tử cung người mẹ, tăng hiệu quả của chu kỳ IVF [2]. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về mối liên quan của hình thái đến sự rối loạn NST ở phôi nang. Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu mối liên quan giữa hình thái phôi nang với bất thường NST.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu: 953 phôi ngày 5 tạo ra bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn có kết hợp đánh giá hình thái phôi và tiến hành sinh thiết sàng lọc NST tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản - Bệnh viện Đa khoa 16A Hà Đông từ tháng 2/2018 tới 5/2019.

Tiêu chuẩn lựa chọn: các phôi có mức độ phát triển giãn rộng xoang phôi độ 3 trở lên, vì khi xoang phôi nang phát triển từ độ 3 trở lên sẽ có thêm những thông tin về 2 loại tế bào xuất hiện là tế bào lá nuôi (TE) và ICM theo Gardner (1999) [3].

Tiêu chuẩn loại trừ: các phôi không đủ điều kiện sinh thiết, phát triển ở giai đoạn sớm hoặc có dấu hiệu ngừng phát triển. Phôi của cặp bố mẹ hoặc người trong gia đình bố mẹ mắc các bệnh di truyền; phôi của cặp bố mẹ hiện mắc các bệnh nội khoa cấp tính hay mạn tính.

*Tác giả liên hệ: Email: trieusangk83@yahoo.com.vn

Evaluation of the relationship between morphological blastocyst and chromosome abnormality

Minh Ngan Hoang¹, Dinh Tao Nguyen²,
Trung Nam Nguyen³, Tien Sang Trieu^{2*}

¹16A Ha Dong General Hospital

²Vietnam Military Medical University

³Graduate University of Science and Technology, VAST

Received 24 March 2020; accepted 4 May 2020

Abstract:

Conducting research on the relationship between blastocyst's morphology and chromosome abnormality by retrospective and cross-sectional description studies in 953 embryos on day 5 analysed for preimplantation genetic screening (PGS) at assisted reproductive technology center, 16A Ha Dong General Hospital from February 2018 to May 2019 exhibited that the rates of mosaic, numerical abnormality and structural abnormality were 56.68%, 36.65%, and 6.67%, respectively. The number of normal blastocyst accounted for the majority in good morphological embryo group (69.1%). The incidence of 1, 2 or 3 chromosome abnormalities per embryo increased gradually in the medium and bad morphology embryos group. A higher proportion of chromosome abnormality was found in association with low expansion degree, ICM C and TE C. The top quality morphology of day 5 embryo was found in association with the decreasing risk of chromosome abnormality ($p < 0.001$, $OR = 0.22$, $CI_{95\%} = 0.16-0.29$). In conclusion, there was a significant relationship between morphological blastocyst and chromosome abnormality. The low expansion degree, TE C, ICM C, and poor quality morphological blastocyst associated with an increase in the rate of chromosome abnormality.

Keywords: blastocyst, chromosome abnormality, in vitro fertilisation, morphology, preimplantation genetic screening.

Classification number: 3.2

Phương pháp

Phương pháp nghiên cứu hồi cứu, mô tả cắt ngang. Các phôi được đánh giá chất lượng hình thái phôi dựa trên thống nhất tiêu chuẩn phân loại của tác giả Gardner (1999) [3] kết hợp với phương pháp của Majumdar và cs (2017) [1] (bảng 1). Hình thái lá nuôi và ICM chia thành 3 loại A, B, C căn cứ trên số lượng tế bào và cách sắp xếp của các tế bào.

Bảng 1. Đánh giá hình thái phôi nang theo tiêu chuẩn Gardner kết hợp tác giả Majumdar (2017) [1].

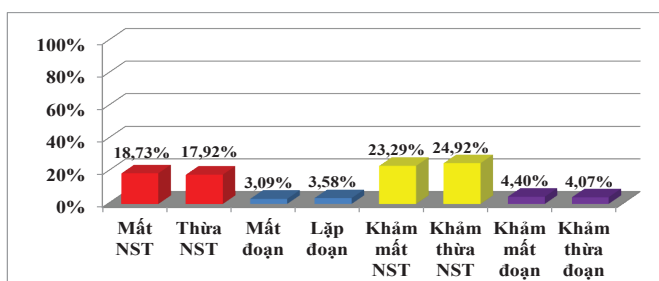
Xếp loại	Mô tả
Tốt	Phôi có mức ĐGR $\geq$ 3; phân loại ICM và TE là: AA, AB, BA
Trung bình	Phôi có mức ĐGR $\geq$ 3; phân loại ICM và TE là: BB, CA
Xấu	Phôi có mức ĐGR $<$ 3; hoặc ĐGR $\geq$ 3, nhưng phân loại ICM và TE là: AC, BC, CB, CC

Các phôi được sinh thiết, rửa tế bào và sàng lọc: lấy 1 cụm TE từ phôi nuôi cấy ngày 5 bằng kim sinh thiết, sau đó đánh số thứ tự cẩn thận, rửa cụm tế bào thật sạch, cho mẫu vào ống PCR. Các mẫu được phân tích bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới NGS sử dụng bộ kit VERIEQ trên máy MiseQ. Các số liệu về hình ảnh phôi nuôi cấy ngày 5 được thu thập bằng cách chụp ảnh qua kính hiển vi đảo ngược vi thao tác Carl zeiss (Đức). Dữ liệu được quản lý và xử lý bằng các phương pháp thống kê y học, sử dụng phần mềm SPSS 20.0.

Kết quả và bàn luận

Tỷ lệ các loại bất thường NST của phôi nang

Kết quả ở biểu đồ 1 cho thấy, trong 953 phôi sàng lọc có 614 phôi bất thường, tương ứng 64,43%. Điều này cho thấy tỷ lệ bất thường NST rất cao. Trong các phôi bất thường NST, tỷ lệ bất thường khảm là cao nhất (56,68%). Tiếp theo sau là tỷ lệ bất thường về số lượng NST (chiếm 36,65%). Trong đó tỷ lệ bất thường giữa nhóm mất và thừa NST tương đương nhau, lần lượt là 18,73 và 17,92%. Điều này tương tự với kết quả của Franasiak và cs (2014) [4] khi nghiên cứu trên 15.169 phôi, nhóm tác giả chỉ ra rằng tỷ lệ trisomy/monosomy xấp xỉ 1 và tăng tối thiểu theo tuổi. Các bất thường thừa và mất NST là phổ biến và gần như chiếm tỷ lệ tương đương nhau. Nhóm bất thường cấu trúc NST trong nghiên cứu của chúng tôi chiếm tỷ lệ thấp nhất (6,67%).



Biểu đồ 1. Tỷ lệ các loại bất thường NST của phôi nang (bất thường số lượng là 36,65%, bất thường cấu trúc 6,67%, bất thường khảm 56,68%).

Mối liên quan giữa hình thái phôi nang với bất thường NST.

Bảng 2. Mối liên quan giữa hình thái phôi nang với bất thường NST.

ĐGR	Bình thường	Bất thường NST	Tổng	OR (CI95%)	p
Độ 5	364 (68,70%)	166 (31,30%)	530	0,32 (0,25-0,42)	
Độ 4	153 (44,60%)	190 (55,40%)	343	2,14 (1,64-2,80)	
Độ 3	22 (28,60%)	55 (71,40%)	80	3,83 (2,30-6,37)	
TE A	303 (72,30%)	116 (27,70%)	419	0,30 (0,23-0,40)	
TE B	214 (49,90%)	215 (50,10%)	429	1,64 (1,27-2,13)	<0,001
TE C	22 (21,00%)	83 (79,00%)	105	5,89 (3,61-9,62)	
ICM A	415 (68,70%)	189 (31,30%)	604	0,25 (0,19-0,33)	
ICM B	104 (39,10%)	162 (60,90%)	266	2,69 (2,01-3,60)	
ICM C	20 (24,10%)	63 (75,90%)	83	4,66 (2,77-7,84)	
Tổng	539 (56,60%)	414 (43,40%)	953		

Mức ĐGR của xoang phôi thể hiện tốc độ phát triển của phôi, đồng nghĩa với việc phôi phát triển càng nhanh thì khả năng có bất thường NST càng thấp. Điều này thể hiện rõ trong kết quả của chúng tôi. Những phôi có ĐGR loại 3 (phân loại thấp nhất ghi nhận trong nghiên cứu của chúng tôi) nguy cơ bất thường NST tăng (OR=3,83; CI95%=2,3-6,37, $p<0,001$) so với nhóm còn lại. Trong khi đó, phôi có ĐGR xoang phôi loại 5, nguy cơ bất thường NST giảm đáng kể (OR=0,32; CI95%=0,25-0,42; $p<0,001$) so với nhóm còn lại (bảng 2). Điều này cũng được đề cập trong nghiên cứu của Wang và cs (2018) [5] trên 1.559 phôi. Theo nhóm tác giả này, ĐGR xoang phôi liên quan đáng kể với bất thường NST: với ĐGR xoang phôi độ 1, 2 cho kết quả chuẩn bội là 31,2%; độ 3, 4 cho kết quả chuẩn bội là 32,2% và độ 5, 6 cho kết quả chuẩn bội là 48,8%.

TE cũng là một yếu tố để đánh giá hình thái phôi nang. Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng, phôi với TE

bình thường (TE loại A) nguy cơ bất thường NST giảm (OR=0,30; CI95%=0,23-0,40, $p<0,001$). Những phôi chứa TE C có nguy cơ mang bất thường NST lên đến 5,89 lần (CI95%=3,61-9,62, $p<0,001$). Năm 2017, Majumdar và cs xác định được tỷ lệ lệch bội tăng khi chất lượng TE giảm dần. Phôi với TE loại A, tỷ lệ lệch bội là 26,4%; tỷ lệ này ở TE loại B và C lần lượt là 49 và 56,7% [1]. Kết quả này tương tự nghiên cứu của chúng tôi. Tuy nhiên, với chất lượng lá nuôi loại C thì tỷ lệ bất thường trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn hẳn (79%), với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Sự chênh lệch tỷ lệ này có thể do chúng tôi xét cả 2 loại bất thường số lượng và cấu trúc, trong khi Majumdar và cs chỉ xét yếu tố bất thường số lượng.

Điều này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Zhao và cs (2018) [6] khi đánh giá vai trò độc lập của từng yếu tố ảnh hưởng đến việc tiên lượng tỷ lệ có thai cho thấy vai trò quan trọng của TE. Các phôi nang biểu hiện TE loại A cho tỷ lệ mang thai và sống lâm sàng cao hơn đáng kể so với phôi có TE loại C (62,4 so với 35,7% và 49,7 so với 27,4%).

ICM của phôi cũng có mối liên quan tới bất thường NST. Ở phôi có ICM xếp loại xấu nhất (ICM C) nguy cơ bất thường NST tăng rõ rệt (OR=4,66; CI95%=2,77-7,84, $p<0,001$). Ngược lại, phôi có ICM tốt (ICM A) nguy cơ bất thường NST giảm đáng kể (OR=0,25; CI95%=0,19-0,33, $p<0,001$). Kết quả của chúng tôi cũng tương tự với nghiên cứu của Phan Thị Khánh Vy (2015) [7], tác giả đã chứng minh tỷ lệ lệch bội NST tăng khi chất lượng của ICM giảm ($p<0,05$) và nghiên cứu của Majumdar và cs (2017) [1], nhóm tác giả khi khảo sát trên 151 phôi nang đã xác định được tỷ lệ lệch bội cũng tăng khi chất lượng ICM giảm từ loại A xuống loại C ($p<0,001$).

Hiện nay còn nhiều tranh cãi về vai trò quan trọng của lá nuôi hay nụ phôi trong việc xem xét đánh giá lựa chọn phôi để chuyển.

Năm 2013, De Paepe và cs [8], trong nghiên cứu được công bố trên Tạp chí Human Reproduction đã phần nào giải thích vai trò quan trọng của lá nuôi ở giai đoạn phát triển sớm của phôi nang. Nhóm tác giả này nhận thấy, khi nuôi cấy độc lập phôi nang chỉ có lá nuôi (đã tách bỏ các ICM), các tế bào này sẽ tiếp tục biệt hóa để hình thành khối ICM mới. Vai trò của TE cũng được khẳng định trong nghiên cứu của Honnma và cs (2012) [9] trên 1.087 chu kỳ rã đông và chuyển phôi nuôi cấy ngày 5 sau rã đông. Các tác giả này khẳng định lại vai trò quan trọng của lá nuôi chứ không phải nụ phôi trong việc xem xét đánh giá lựa chọn phôi để chuyển. Còn trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng, tỷ

lệ phôi bình thường ở nhóm phôi TE tốt tương tự với nhóm phôi ICM tốt ($p>0,5$).

Mối liên quan giữa hình thái phôi nang với bất thường NST nói chung và từng loại bất thường về số lượng, cấu trúc và bất thường khảm

Bảng 3. Mối liên quan giữa hình thái phôi nang với các loại bất thường NST.

Loại bất thường	Bất thường NST		Số lượng		Cấu trúc		Khảm	
	n (%)	OR (CI95%)	n (%)	OR (CI95%)	n (%)	OR (CI95%)	n (%)	OR (CI95%)
Hình thái								
Tốt	193 (30,9%)	0,22 ^c (0,16-0,29)	78 (12,5%)	0,30 ^c (0,22-0,42)	14 (2,2%)	0,32 ^b (0,16-0,63)	116 (18,6%)	0,44 ^c (0,32-0,60)
Trung bình	114 (60,6%)	2,39 ^c (1,72-3,31)	49 (26,1%)	1,66 ^c (1,14-2,42)	10 (5,3%)	1,60 ^b (0,76-3,37)	64 (34%)	1,89 ^c (1,34-2,68)
Xấu	107 (76,4%)	5,34 ^c (3,53-8,10)	56 (40%)	3,60 ^c (2,44-5,31)	12 (8,6%)	3,08 ^b (0,50-6,32)	48 (34,3%)	1,84 ^c (1,25-2,70)

Ghi chú: a: $>0,05$; b: $=0,001$; c: $<0,001$.

Theo nghiên cứu của chúng tôi, phôi có phân loại hình thái xấu có nguy cơ bất thường NST cao gấp 5,34 lần ($CI95\%=3,53-8,10$), trong khi ở phôi tốt chỉ là 0,22 lần ($CI95\%=0,16-0,29$) (bảng 3). Kết quả này cho thấy, việc lựa chọn phôi loại tốt được ưu tiên cao trong giảm tỷ lệ bất thường NST khi không tiến hành sàng lọc hoặc nếu sàng lọc thì giảm được số lượng phôi cần sàng lọc. Khi đi sâu vào từng loại bất thường, hình thái phôi xấu làm tăng nguy cơ của tất cả các loại bất thường.

Xét bất thường về số lượng NST, tỷ lệ bất thường ở nhóm phôi tốt là thấp nhất (12,5%), tăng lên ở nhóm phôi trung bình (26,1%) và cao nhất ở nhóm phôi xấu (40%). Xét bất thường cấu trúc NST, nhìn chung tỷ lệ loại bất thường cấu trúc NST thấp hơn so với các loại còn lại. Cụ thể, tỷ lệ bất thường ở nhóm phôi tốt là thấp nhất (2,2%), tăng dần ở nhóm phôi trung bình (5,3%) và cao nhất ở nhóm phôi xấu (8,6%). Xét tỷ lệ bất thường khảm ở nhóm hình thái phôi tốt chiếm tỷ lệ 18,6%, tăng dần ở nhóm phôi trung bình (34%) và cao nhất ở nhóm phôi xấu (34,3%).

Nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra rằng, hình thái phôi xấu làm gia tăng nguy cơ bất thường số lượng, bất thường cấu trúc và bất thường khảm lần lượt là 3,6 ($CI95\%=2,44-5,31$), 3,08 ($CI95\%=0,50-6,32$) và 1,84 lần ($CI95\%=1,25-2,70$).

Trong khi đó, với hình thái phôi tốt, nguy cơ bất thường NST giảm trên tất cả các dạng bất thường. Phôi có hình thái tốt nguy cơ bất thường số lượng, bất thường cấu trúc và bất

thường khảm giảm so với nhóm phôi không tốt, lần lượt là $OR=0,30$ ($CI95\%=0,22-0,42$), 0,32 ($CI95\%=0,16-0,63$) và 0,44 ($CI95\%=0,32-0,60$).

Rubino và cs (2018) [10] sử dụng phương pháp NGS khi nghiên cứu tỷ lệ chuyển phôi trên 55 phôi khảm (tỷ lệ khảm $\leq 50\%$) thì có 33 phôi mang kiểu nhân bình thường và tạo thành em bé khỏe mạnh. Do đó, những phôi khảm không nhất thiết phải được loại trừ, tuy nhiên những phôi hoàn toàn chuẩn bội vẫn được ưu tiên chuyển hơn so với phôi khảm. Những bệnh nhân mang thai sau khi chuyển phôi khảm phải được xét nghiệm trước khi sinh với sự tư vấn thích hợp của bác sỹ. Khi xem xét đến hình thái của phôi nang với yếu tố bất thường NST, chúng tôi thấy rằng tỷ lệ bất thường NST tăng khi phôi nang có chất lượng hình thái xấu. Cụ thể, tỷ lệ lệch bội NST thấp ở phôi có chất lượng tốt (30,9%), tăng dần ở phôi có chất lượng trung bình (60,6%) và kém (76,4%). Điều này cũng tương tự như nghiên cứu của Majumdar và cs (2017) [1], nhóm tác giả xác định được tỷ lệ bất thường tăng dần từ 40,5 tới 50 và 73,2% ở nhóm phân loại phôi mang hình thái từ tốt tới xấu.

Mối liên quan giữa hình thái phôi nang với số lượng bất thường NST tính trên một phôi

Trong 1 phôi có bất thường NST có thể tồn tại nhiều dạng bất thường, chúng tôi phân loại 953 phôi trong nghiên cứu làm 4 loại dựa trên số lượng bất thường tính trên 1 phôi. Sau đó tiếp tục xét mối liên quan giữa hình thái phôi và số lượng bất thường NST tính trên 1 phôi. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Mối liên quan giữa hình thái phôi nang với số lượng bất thường NST tính trên 1 phôi.

Hình thái	Số lượng bất thường trên 1 phôi					Tổng	p
	0	1	2	3	4		
Tốt	432 69,1%	121 19,4%	58 9,3%	12 1,9%	2 0,3%	625	<0,001
Trung bình	74 39,4%	67 35,6%	40 21,3%	7 3,7%	0 0,0%	188	
Xấu	33 23,6%	55 39,3%	46 32,8%	6 4,3%	0 0,0%	140	
Tổng	539 56,6%	243 25,5%	144 15,1%	25 2,6%	2 0,2%	953	

Trong nhóm phôi hình thái tốt, số phôi bình thường chiếm đa số với 432 phôi, tương đương 69,1%; tỷ lệ phôi tốt có 1 bất thường NST là 19,4% và tỷ lệ phôi bất thường từ 2 NST trở lên chiếm 11,5%.

Trong nhóm phôi hình thái trung bình và xấu, tỷ lệ phôi

binh thường chỉ chiếm lần lượt là 39,4 và 23,6%, thấp hơn đáng kể so với nhóm phôi hình thái tốt. Đồng thời, tỷ lệ bất thường 1 NST của nhóm phôi hình thái trung bình và xấu cũng cao hơn nhóm phôi hình thái tốt, lần lượt là 35,6 và 39,3%. Tỷ lệ bất thường từ 2 NST trở lên trong nhóm phôi trung bình và xấu cao gấp 2,17 và 3,23 lần so với nhóm phôi tốt.

Xét trong tổng số 414 phôi bất thường thì tỷ lệ mang 1 bất thường NST là 58,7%, còn lại là bất thường phức tạp. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Liu và cs (2012) [11] khi phân tích trên 138 phôi nang lệch bội, nhóm tác giả đã chỉ ra rằng tỷ lệ phôi nang lệch bội 1 NST là 62,3% và lệch bội từ 2 NST trở lên là 37,7%. Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi thấp hơn nghiên cứu của Franasiak và cs (2014) [4] nghiên cứu trên 15.169 phôi nang sinh thiết, ghi nhận có 6.168 phôi lệch bội, trong đó 64% bất thường liên quan đến 1 NST.

Kết luận

Tỷ lệ bất thường NST rất lớn ở phôi nang, trong đó bất thường khảm chiếm 56,68%, bất thường số lượng là 36,65%, bất thường cấu trúc là 6,67%. Số phôi bình thường chiếm đa số ở nhóm phôi phân loại hình thái tốt (69,1%). Tỷ lệ có 1, 2, 3 bất thường tăng dần ở nhóm phôi trung bình và xấu.

- Nguy cơ mang bất thường NST giảm khi ĐGR khoảng phôi lớn - độ 5 (OR=0,32, CI95%=0,25-0,42, $p<0,001$), và tăng lên đối với ĐGR thấp - độ 3 (OR=3,83, CI95%=2,30-6,37, $p<0,001$).

- Nguy cơ bất thường NST tăng lên khi hình thái lá nuôi xấu (OR=5,89, CI95%=3,61-9,62, $p<0,001$).

- Nguy cơ bất thường NST tăng khi hình thái ICM xấu đi (OR=4,66, CI95%=2,77-7,84, $p<0,001$).

- Với hình thái phôi ngày 5 xếp loại tốt, nguy cơ bất thường NST giảm (OR=0,22; CI95%=0,16-0,29, $p<0,001$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G. Majumdar, et al. (2017), "Relationship between morphology, euploidy and implantation potential of cleavage and blastocyst stage embryos", *Journal of Human Reproductive Sciences*, **10**(1), pp.49-57.
- [2] Z. Yang, et al. (2012), "Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study", *Mol. Cytogenet.*, **5**(1), p.24.
- [3] D.K. Gardner, W.B. Schoolcraft (1999), "Culture and transfer of human blastocyst", *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, **11**(3), pp.307-311.
- [4] J.M. Franasiak, et al. (2014), "The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening", *Fertility and Sterility*, **101**(3), pp.656-663.
- [5] A. Wang, et al. (2018), "Euploidy in relation to blastocyst sex and morphology", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **35**(9), pp.1565-1572.
- [6] Y. Zhao, et al. (2018), "Overall blastocyst quality, trophoctoderm grade, and inner cell mass grade predict pregnancy outcome in euploid blastocyst transfer cycles", *Chinese Medical Journal*, **131**(11), pp.1261-1267.
- [7] Phan Thị Khánh Vy (2015), *Nghiên cứu một số yếu tố liên quan tới lệch bội NST của phôi người trước làm tổ*, Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [8] C. De Paepe, et al. (2013), "Human trophoctoderm cells are not yet committed", *Hum. Reprod.*, **28**(3), pp.740-749.
- [9] H. Honnma, et al. (2012), "Trophoctoderm morphology significantly affects the rates of ongoing pregnancy and miscarriage in frozen-thawed single-blastocyst transfer cycle in vitro fertilization", *Fertil. Steril.*, **98**(2), pp.361-367.
- [10] P. Rubino, et al. (2018), "Embryos classified as low-grade mosaic (<50%) after preimplantation genetic screening (PGS) by means of high resolution next-generation screening (hr-NGS), can have the same competence of producing healthy newborns as euploid embryos", *Fertility and Sterility*, **109**(3), p.46.
- [11] J. Liu, et al. (2012), "DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic", *Biology of Reproduction*, **87**(6), p.148.

Đánh giá áp lực cơ thắt hậu môn, ngưỡng cảm nhận trực tràng và phản xạ rặn ở những bệnh nhân có rối loạn về đại tiện

Đào Việt Hằng^{1, 2, 3*}, Lưu Thị Minh Huệ¹, Đào Văn Long^{1, 2, 3}

¹Viện Nghiên cứu và Đào tạo Tiêu hóa, Gan mật

²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

³Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 2/7/2020; ngày chuyển phản biện 6/7/2020; ngày nhận phản biện 3/8/2020; ngày chấp nhận đăng 18/8/2020

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá áp lực cơ thắt hậu môn, các ngưỡng cảm nhận trực tràng và phản xạ rặn bằng kỹ thuật đo áp lực hậu môn - trực tràng độ phân giải cao (HRAM) trên những bệnh nhân có các rối loạn về đại tiện. Đối tượng và phương pháp: nghiên cứu hồi cứu trên 73 đối tượng ≥ 18 tuổi có rối loạn thói quen, phản xạ đại tiện, rối loạn tính chất phân được tiến hành kỹ thuật HRAM từ tháng 7/2018 đến tháng 7/2019. Kết quả: đối tượng nghiên cứu bao gồm 28 nam và 45 nữ, tuổi trung bình là $46,2 \pm 15,5$. Các triệu chứng liên quan đến rối loạn thói quen đại tiện chiếm 74%, rối loạn tính chất phân chiếm 26%, són phân chiếm 9,6%. Áp lực cơ thắt hậu môn cả khi nghỉ cao hơn ở nam giới, và tương quan nghịch với tuổi. Không có sự khác biệt về các ngưỡng cảm nhận trực tràng giữa hai giới. 77,9% bệnh nhân có rối loạn đồng vận phản xạ rặn, trong đó phổ biến nhất là type I (45,6%). Không có sự khác biệt về các giá trị trên đo HRAM giữa hai nhóm có phản xạ rặn bình thường và rối loạn đồng vận. Kết luận: tuổi có liên quan đến áp lực cơ thắt hậu môn; rối loạn đồng vận phản xạ rặn có tỷ lệ cao, trong đó type I chiếm đa số.

Từ khóa: cơ thắt hậu môn, đo áp lực hậu môn - trực tràng độ phân giải cao (HRAM), rối loạn đại tiện.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Rối loạn thói quen đại tiện và tính chất phân là một trong những biểu hiện lâm sàng thường gặp của người bệnh đến khám tại chuyên khoa tiêu hóa, bao gồm các triệu chứng như táo bón, tiêu chảy, són phân, phân nhầy, phân sống... Các rối loạn này ở tần suất thường xuyên, kéo dài hoặc mức độ nặng có thể ảnh hưởng đến đời sống tâm sinh lý và chất lượng cuộc sống của người bệnh [1, 2]. Khi tiếp cận nhóm đối tượng này cần tìm các triệu chứng báo động và loại trừ tổn thương thực thể. Nội soi đại trực tràng toàn bộ là một trong những thăm dò phổ biến trong thực hành lâm sàng trên những bệnh nhân có rối loạn thói quen đại tiện, rối loạn phân dai dẳng. Bên cạnh đó, hiện nay trên thế giới ngày càng có nhiều phương pháp thăm dò chức năng hậu môn - trực tràng được phát triển và ứng dụng, như chụp X-quang baryt hay cộng hưởng từ động học quá trình tổng phân (defecography), test sủ bóng (balloon expulsive test), điện cơ vùng cơ thắt hậu môn hay đo áp lực hậu môn - trực tràng... HRAM là kỹ thuật đánh giá khả năng co bóp, phối hợp trong các phản xạ của nhóm cơ thắt hậu môn trong và ngoài cũng như các ngưỡng cảm nhận của vùng trực tràng thông qua catheter có các thụ cảm áp lực được đặt trực tiếp vào ống hậu môn. Một số nghiên cứu trước đây tại Việt Nam

đã áp dụng phương pháp đo truyền thống sử dụng catheter có 6 thụ thể áp lực để đánh giá một số rối loạn chức năng và bệnh lý thần kinh tại hậu môn - trực tràng trên đối tượng ở trẻ em. Tuy nhiên, hiện chưa có nghiên cứu nào sử dụng phương pháp đo HRAM trên đối tượng người trưởng thành có các triệu chứng rối loạn thói quen đại tiện và rối loạn phân kéo dài. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm đánh giá áp lực cơ thắt hậu môn, các ngưỡng cảm nhận trực tràng và phản xạ rặn bằng kỹ thuật HRAM trên những bệnh nhân có các rối loạn về thói quen đại tiện và tính chất phân.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu hồi cứu mô tả.

Đối tượng nghiên cứu

Có 73 bệnh nhân được thu tuyển vào nghiên cứu với các tiêu chuẩn lựa chọn: từ 18 tuổi trở lên; có các triệu chứng rối loạn thói quen đại tiện và tính chất phân bao gồm táo bón, tiêu chảy, phân sống, phân nhầy/nát, són phân và được tiến hành kỹ thuật HRAM từ tháng 7/2018 đến tháng 7/2019 tại Viện Nghiên cứu và Đào tạo Tiêu hóa, Gan mật. Nghiên cứu

* Tác giả liên hệ: Email: hangdao.fsh@gmail.com

Evaluating anal canal pressure, rectal sensations, and push maneuvers in patients with defecatory disorders

Viet Hang Dao^{1,2,3*}, Thi Minh Hue Luu³,
Van Long Dao^{1,2,3}

¹Institute of Gastroenterology and Hepatology

¹Hanoi Medical University

²Hanoi Medical University Hospital

Received 2 July 2020; accepted 18 August 2020

Abstract:

Objectives: to evaluate anal canal pressure, rectal sensation levels, and push maneuvers on high-resolution anorectal manometry (HRAM) in patients with defecation disorders. **Methods:** a retrospective study was conducted in 73 patients who were ≥ 18 years old, had bowel habit disorders, stool appearance changes, and performed HRAM from July 2018 to July 2019. **Results:** the study included 28 males and 45 females. The mean age was 46.2 ± 15.5 (years old). The proportions of patients having symptoms related to bowel habit disorders, stool appearance changes and fecal incontinence were 74, 26 and 9.6%, respectively. Men had higher anal canal resting and squeeze pressure. There was no significant difference in rectal sensation levels between the two genders. 77.9% of patients had dyssynergic defecation, mostly type I (45.6%). The HRAM values were not different between the two groups (normal pushing maneuver and dyssynergic defecation). **Conclusions:** age relates to anal sphincter pressure. There is a high proportion of patients having dyssynergic defecation, in which type I is predominant.

Keywords: anal canal sphincter, defecation disorders, high-resolution anorectal manometry (HRAM).

Classification number: 3.2

loại trừ các trường hợp bệnh nhân có khối u và/hoặc polyp vùng hậu môn - trực tràng, nứt kẽ hậu môn, bệnh nhân có các tổn thương đang chảy máu, trĩ nội độ IV, trĩ ngoại, trĩ đang có biến chứng kèm theo, các bệnh nhân giảm thính lực, có các rối loạn về tâm thần kinh, không hợp tác trong quá trình thực hiện kỹ thuật.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thu thập các thông tin về triệu chứng lâm sàng, kết quả nội soi đại trực tràng và kết quả đo HRAM của người bệnh.

Tiến hành kỹ thuật: kỹ thuật sử dụng hệ thống máy MMS với catheter bơm nước (water-perfused) 20 kênh. Quy trình kỹ thuật đo HRAM được thực hiện theo hướng dẫn của Hội Sinh lý hậu môn - trực tràng quốc tế (IAPWG) năm 2019 [3]. Các bước được tiến hành lần lượt như sau:

- 1) Đo áp lực hậu môn - trực tràng khi nghỉ trong 60 giây.
- 2) Đo áp lực hậu môn - trực tràng khi co thắt trong thời gian ngắn (5 giây).
- 3) Đo áp lực hậu môn - trực tràng khi co thắt dài trong thời gian dài (30 giây).
- 4) Đánh giá phản xạ ho: bệnh nhân thực hiện ho 2 lần; phản xạ ho bình thường khi có sự tăng cả áp lực ở trực tràng và ống hậu môn khi ho.
- 5) Đo áp lực hậu môn - trực tràng trong khi rặn: động tác rặn được thực hiện 3 lần. Các phân nhóm rối loạn đồng vận phản xạ rặn trên đo HRAM được xác định dựa theo phân loại của Rao và cs (2016) [1] bao gồm: type I: áp lực trực tràng tăng ≥ 40 mmHg kèm tăng áp lực ống hậu môn; type II: áp lực trực tràng tăng yếu < 40 mmHg kèm tăng áp lực ống hậu môn; type III: áp lực trực tràng tăng ≥ 40 mmHg kèm không giãn hoặc giãn kém ($\leq 20\%$); type IV: áp lực trực tràng tăng yếu < 40 mmHg kèm không giãn hoặc giãn kém ($\leq 20\%$).
- (6) Đo các ngưỡng cảm nhận trực tràng: các ngưỡng cảm nhận trực tràng được xác định bằng thể tích khí (tính bằng ml) bơm vào bóng trên catheter khi catheter đã được đặt và cố định trong ống hậu môn - trực tràng, tại đó bệnh nhân có các cảm nhận: bắt đầu có cảm giác, bắt đầu có nhu cầu đi đại tiện và cảm giác không thể nhịn được đại tiện, tương đương với các ngưỡng: ngưỡng cảm nhận đầu tiên (FS)- ngưỡng bắt đầu buồn đi ngoài (ND) - ngưỡng dung nạp tối đa (MTV).

Đánh giá phản xạ ức chế hậu môn - trực tràng (RAIR): phản xạ RAIR bình thường khi có sự giảm áp lực đột ngột

của trực tràng - ống hậu môn khi bóng catheter được bơm nhanh 60 ml khí.

Xử lý số liệu

Dữ liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm SPSS version 22.0. Các biến định tính được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ (phần trăm), các biến định lượng được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn hoặc trung vị (tứ phân vị). Sự khác biệt giữa hai nhóm độc lập kiểm định t-test, Mann-Whitney, kiểm định ANOVA và ANOVA Krustal-Wallis đối với 3 nhóm.

Kết quả

Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

73 bệnh nhân có đủ tiêu chuẩn lựa chọn. Tuổi trung bình là 46,2 $\pm$ 15,5, tỷ lệ nữ/nam là 45/28. Tỷ lệ nhóm bệnh nữ đã qua sinh đẻ là 84,4% tổng số bệnh nhân nữ. Các nhóm triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân bao gồm nhóm liên quan đến thay đổi thói quen đại tiện (táo bón đơn thuần, tiêu chảy đơn thuần và táo bón - tiêu chảy hỗn hợp), liên quan đến rối loạn phân (phân nát, phân nhầy, phân sống), và nhóm liên quan đến rối loạn phản xạ đi ngoài (són phân). Bệnh nhân có thể biểu hiện nhiều hơn một nhóm triệu chứng lâm sàng. Triệu chứng liên quan đến thay đổi thói quen đại tiện phổ biến nhất, gặp ở 74% bệnh nhân, các nhóm liên quan đến rối loạn phân và rối loạn phản xạ đi ngoài gặp lần lượt là 26% và 9,6% bệnh nhân.

Có 45 bệnh nhân ghi nhận được kết quả nội soi đại trực tràng. Bệnh nhân có thể có các tổn thương kết hợp của trĩ, polyp và viêm trên kết quả nội soi. Tỷ lệ bệnh nhân viêm đại - trực tràng, trĩ và polyp đại - trực tràng lần lượt là 35,5; 51,1 và 17,8%.

Đặc điểm trên đo HRAM

Nam giới có chiều dài ống hậu môn dài hơn nữ giới (2,93 $\pm$ 0,41 so với 2,59 $\pm$ 0,43 cm), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,002). Các giá trị áp lực cơ thắt hậu môn khi nghỉ, khi co thắt trong thời gian ngắn và dài ở nhóm bệnh nhân nam đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm bệnh nhân nữ (p<0,05). Kết quả này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm nữ đã sinh đẻ và nữ chưa sinh đẻ (p>0,05). Các ngưỡng cảm nhận trực tràng không có sự khác biệt giữa giới tính và tiền sử sinh đẻ (bảng 1).

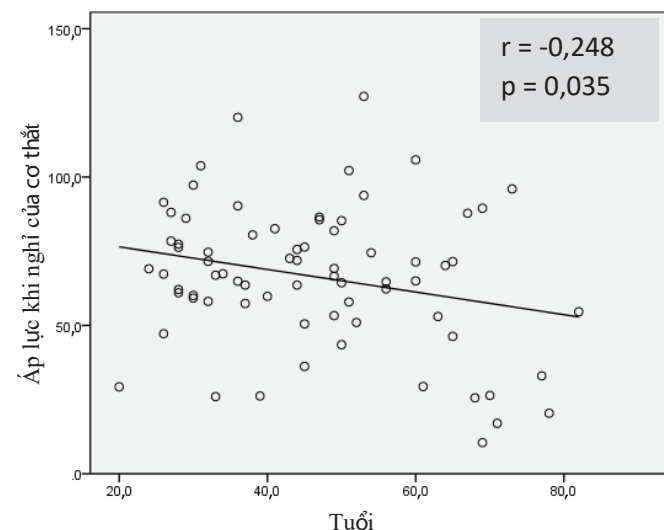
Khi phân tích phản xạ ức chế hậu môn - trực tràng (RAIR) và phản xạ ho, 100% bệnh nhân không có RAIR bình thường, 1 bệnh nhân được ghi nhận có phản xạ ho bất thường.

Bảng 1. Đặc điểm HRAM theo giới tính và tiền sử sinh đẻ.

	Tổng (n=73)	Nữ		Nam (n=28)	p	
		Nữ chưa sinh (n=7)	Nữ đã sinh (n=38)			
Chiều dài ống hậu môn (cm)	2,72 $\pm$ 0,45	2,35 $\pm$ 0,39	2,64 $\pm$ 0,43	2,59 $\pm$ 0,43	2,93 $\pm$ 0,41	0,016 0,002
Áp lực nghỉ của CTHM (mmHg)	66,5 $\pm$ 23,8	58,5 $\pm$ 23,0	61,2 $\pm$ 23,8	60,8 $\pm$ 23,5	75,7 $\pm$ 21,7	0,781 0,008
Áp lực của CTHM khi co thắt ngắn (mmHg)	151,7 $\pm$ 49,8	128,6 $\pm$ 55,5	143,0 $\pm$ 40,1	140,8 $\pm$ 42,4	169,1 $\pm$ 53,4	0,413 0,017
Áp lực của CTHM khi co thắt dài (mmHg)	144,1 $\pm$ 55,6	120,5 $\pm$ 62,4	126,7 $\pm$ 47,4	125,7 $\pm$ 49,2	173,7 $\pm$ 53,2	0,762 0,000
Thời gian duy trì co thắt CTHM (giây)	30,9 (22,6-32,3)	26,7 (21-29)	31 (19-32)	30 (20-32)	31,4 (28-32)	0,347 0,103
Thế tích bắt đầu cảm nhận - FS (ml)	30 (30-42,5)	30 (20-50)	30 (30-40)	30 (27,5-40)	30 (30-48,75)	0,818 0,275
Thế tích bắt đầu buồn đi ngoài - ND (ml)	80 (60-95)	60 (45-90)	72,5 (60-90)	70 (60-90)	85 (60-117,5)	0,489 0,055
Thế tích dung nạp tối đa - MTV (ml)	120 (100-172,5)	120 (80-150)	120 (100-170)	120 (100-165)	140 (112-180)	0,613 0,140

CTHM: cơ thắt hậu môn. Các giá trị được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn hoặc trung vị (khoảng tứ phân vị). (*) so sánh giữa nhóm nữ chưa sinh và nhóm nữ đã sinh, (**) so sánh giữa nhóm nam và nữ.

Khi phân tích tương quan cho thấy, giá trị tuổi và giá trị áp lực cơ thắt hậu môn khi nghỉ có mối tương quan nghịch (hệ số tương quan Pearson r=-0,248, với p=0,035<0,05 có ý nghĩa thống kê) (hình 1).



Hình 1. Biểu diễn tương quan giữa tuổi và áp lực cơ thắt hậu môn khi nghỉ.

Bảng 2 mô tả một số đặc điểm đo HRAM ở một số nhóm triệu chứng lâm sàng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về các giá trị áp lực cơ thắt hậu môn khi co thắt giữa nhóm có triệu chứng táo bón đơn thuần và tiêu chảy đơn thuần. MTV cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm táo bón đơn thuần so với tiêu chảy đơn thuần ($p=0,029$). Tỷ lệ rối loạn đồng vận phản xạ rặn ở hai nhóm táo bón - tiêu chảy đơn thuần cũng không có sự khác biệt ($p=0,106$).

Các giá trị áp lực cơ thắt hậu môn và ngưỡng cảm nhận trực tràng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm có són phân ($n=7$) và nhóm không có són phân ($n=66$). Tỷ lệ rối loạn đồng vận phản xạ rặn cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm này ($p=0,119$).

Bảng 2. Đặc điểm đo HRAM ở một số nhóm triệu chứng lâm sàng.

Đặc điểm đo HRAM	Táo bón đơn thuần ($n=24$)	Tiêu chảy đơn thuần ($n=13$)	p	Són phân ($n=7$)	Không són phân ($n=66$)	p
Áp lực CTHM khi nghỉ (mmHg)	55,9 $\pm$ 23,4	73,0 $\pm$ 24,3	0,043	55,5 $\pm$ 27,0	67,7 $\pm$ 23,4	0,202
Áp lực của CTHM khi co thắt ngắn (mmHg)	137,8 $\pm$ 46,4	164,1 $\pm$ 55,8	0,134	148,9 $\pm$ 75,4	152,0 $\pm$ 47,2	0,878
Áp lực của CTHM khi co thắt dài (mmHg)	128,7 $\pm$ 55,6	148,4 $\pm$ 69,5	0,361	138,0 $\pm$ 71,7	144,8 $\pm$ 54,3	0,761
FS (ml)	35 (30-48,75)	30 (30-45)	0,769	30 (20-60)	30 (30-40)	0,884
ND (ml)	82,5 (60-97,5)	80 (50-112,5)	0,949	80 (50-120)	80 (60-90)	0,887
MTV (ml)	155 (120-180)	120 (100-165)	0,029	115 (80-140)	122,5 (107,5-176,3)	0,225
Tỷ lệ rối loạn đồng vận (%)	83,3	53,8	0,106	57,1	74,2	0,119

Trong phản xạ rặn, 68 bệnh nhân được ghi nhận thực hiện chính xác trong 3 lần, kết quả cho thấy 22,1% ($n=15$) bệnh nhân có kết quả bình thường, 77,9% ($n=53$) bệnh nhân ghi nhận có rối loạn đồng vận. Rối loạn đồng vận phản xạ rặn gặp chủ yếu là type I ($n=31$, chiếm 45,6%), type II ($n=8$), III ($n=13$) và IV ($n=1$) lần lượt chiếm 11,8; 19,1 và 1,4%. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về chiều dài ống hậu môn, áp lực cơ thắt hậu môn và các ngưỡng cảm nhận trực tràng (ngoại trừ ngưỡng bắt đầu cảm nhận) giữa nhóm có phản xạ rặn bình thường và nhóm có rối loạn đồng vận ($p>0,05$) (bảng 3).

Bảng 3. Đặc điểm HRAM ở nhóm phản xạ rặn bình thường và nhóm rối loạn đồng vận.

Đặc điểm đo HRAM	Bình thường ($n=15$)	Rối loạn đồng vận ($n=53$)	p
Chiều dài ống hậu môn (cm)	2,65 $\pm$ 0,37	2,74 $\pm$ 0,48	0,490
Áp lực CTHM khi nghỉ (mmHg)	65,7 $\pm$ 23,8	66,4 $\pm$ 24,0	0,917
Áp lực của CTHM khi co thắt trong thời gian ngắn (mmHg)	165,0 $\pm$ 49,9	146,6 $\pm$ 50,1	0,214
Áp lực của CTHM khi co thắt trong thời gian dài (mmHg)	150,6 $\pm$ 66,9	140,0 $\pm$ 53,4	0,522
Thời gian duy trì co thắt của CTHM (giây)	30,5 (21-32)	30,5 (21-32)	0,478
FS (ml)	30 (20-40)	30 (30-47,5)	0,049
ND (ml)	60 (50-90)	80 (60-100)	0,076
MTV (ml)	120 (110-180)	120 (105-172,5)	0,761

Bàn luận

Nghiên cứu đã được tiến hành trên nhóm đối tượng 73 bệnh nhân có các triệu chứng rối loạn về thói quen đại tiện và tính chất phân bằng kỹ thuật HRAM, trong đó có 45 nữ và 28 nam, tuổi trung bình là 46,2 $\pm$ 15,5.

Đặc điểm triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân đến khám chủ yếu về các rối loạn thói quen đại tiện (74%), trong đó triệu chứng táo bón đơn thuần chiếm ưu thế ($n=24$), són phân gặp ở 9,6%. Trong một số nghiên cứu sử dụng các bộ câu hỏi đánh giá tại cộng đồng ở một số khu vực tại Úc, Mỹ, châu Âu, tỷ lệ có triệu chứng táo bón mạn tính gặp ở 11-18%, són phân gặp ở 7-15% [4, 5]. Trong nghiên cứu của Whitehead và cs (2009), tỷ lệ chung của són phân gia tăng theo độ tuổi, khoảng 2,6% ở độ tuổi 20-28 đến 15,3% ở người cao tuổi (>70 tuổi)... Mặc dù, triệu chứng són phân có nhiều tác động tiêu cực đến chất lượng cuộc sống và đời sống tinh thần (sự xấu hổ, cô lập với xã hội, mất khả năng lao động...) của người bệnh, nhưng tình trạng rối loạn này ít được người bệnh thông báo với nhân viên y tế [2], dẫn đến việc tiếp cận chẩn đoán và điều trị còn hạn chế. HRAM là một công cụ hữu ích để thăm dò trước khi chỉ định liệu pháp biofeedback (phản hồi sinh học) điều trị són phân chức năng. Một nghiên cứu tổng quan cho thấy, khoảng 2/3 bệnh nhân giảm được tần suất són phân và khoảng 50% bệnh nhân hết biểu hiện són phân sau biofeedback [6]. Tuy nhiên, dữ liệu về HRAM ở Việt Nam còn hạn chế, do đó phối hợp HRAM và biofeedback trong chẩn đoán và quản lý nhóm bệnh nhân có các rối loạn chức năng vùng hậu môn - trực tràng là một hướng nghiên cứu mới cần được tập trung phát triển trong tương lai.

Chiều dài ống hậu môn chức năng trung bình của nhóm bệnh nhân là 2,72 $\pm$ 0,45 (cm). Kết quả của chúng tôi có giá trị thấp hơn so với nghiên cứu của Y. Li và cs (2013) trên 110 đối tượng khỏe mạnh người Trung Quốc: 3,5 $\pm$ 0,1 cm

(nữ <50 tuổi) và $3,6 \pm 0,1$ cm (nữ >50 tuổi) [7]. Khi sử dụng giá trị tham chiếu các ngưỡng bình thường trong nghiên cứu của Carrington và cs (2014) [8] trên 115 đối tượng khỏe mạnh tại Anh, nghiên cứu có 16,7% bệnh nhân ($n=12$) có chiều dài ống hậu môn chức năng ngắn (giá trị tham chiếu: nữ <2,3 cm, nam <2,4 cm). Hiện nay, sự tương quan giữa chiều dài ống hậu môn chức năng và các triệu chứng rối loạn hậu môn - trực tràng còn chưa rõ ràng. Nghiên cứu của Vollebregt và cs (2019) [9] chỉ ra chiều dài ống hậu môn ngắn gặp ở 20% bệnh nhân nữ và 13% bệnh nhân nam có rối loạn són phân, có liên quan với tuổi cao, trương lực và áp lực cơ thắt hậu môn yếu.

Các giá trị áp lực cơ thắt hậu môn khi nghỉ, khi co thắt trong thời gian ngắn và dài đều có giá trị cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nam giới. Điều này phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước của Carrington và cs (2014); Lee và cs (2014) [8, 10]. Sự khác biệt về áp lực cơ thắt hậu môn giữa hai giới được giải thích do sự khác nhau về khối lượng cơ, lực co bóp của cơ thắt hậu môn, sự tổn thương của thần kinh thẹn trong quá trình chuyển dạ ở nữ giới, cũng như sự khác biệt về chỉ số khối cơ thể (BMI) giữa nam và nữ [10]. Nghiên cứu của Carrington cũng chỉ ra áp lực của cơ thắt hậu môn khi co thắt của phụ nữ đã sinh thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm nữ chưa sinh đẻ. Trong nghiên cứu của chúng tôi không có sự khác biệt giữa hai nhóm, có thể do số lượng nhóm nữ chưa sinh đẻ trong nghiên cứu còn ít ($n=7$). Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra mối tương quan nghịch giữa tuổi và các giá trị áp lực của cơ thắt hậu môn khi nghỉ và khi co thắt [7, 11, 12]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy mối tương quan nghịch giữa tuổi và áp lực cơ thắt hậu môn khi nghỉ ($r=-0,248$, $p=0,035$). Khi phân tích tương quan giữa tuổi và áp lực cơ thắt hậu môn khi nghỉ ở riêng giới nam và nữ cho kết quả không có sự tương quan ở cả hai giới với $r=-0,365$ ($p=0,056$) và $r=-0,092$ ($p=0,051$), [11]. Áp lực khi nghỉ của cơ thắt hậu môn giảm theo tuổi được giải thích do quá trình thoái hóa cơ trơn, thay thế bằng mô xơ mỡ, sự sắp xếp các sợi cơ lỏng lẻo hơn [13]. Áp lực cơ thắt hậu môn khi nghỉ thấp gặp tỷ lệ cao hơn ở nhóm có triệu chứng són phân trong các nghiên cứu trước đây [14], tuy nhiên không có sự khác biệt giữa nhóm có triệu chứng són phân và không có són phân trong nghiên cứu của chúng tôi. Sự khác biệt này có thể do số lượng bệnh nhân són phân trong nghiên cứu này còn thấp ($n=7$).

Các ngưỡng cảm nhận trực tràng (FS, ND, MTV) của các đối tượng nghiên cứu có giá trị trung vị lần lượt là 30, 70 và 120 (ml) ở nữ, và 30, 85 và 140 (ml) ở nam, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai giới. Ngưỡng dung nạp tối đa ở nhóm có triệu chứng táo bón đơn thuần (155 ml) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêu chảy

đơn thuần (120 ml). Một số nghiên cứu đã ghi nhận sự tăng ngưỡng cảm nhận trực tràng gặp tỷ lệ cao ở nhóm bệnh nhân có táo bón mạn tính (16-68%), và nhóm hội chứng ruột kích thích táo bón ưu thế (17%) [15, 16].

Trong 68 bệnh nhân được đánh giá phản xạ rặn trên đo HRAM, 77,9% bệnh nhân được ghi nhận có rối loạn đồng vận phản xạ rặn, trong đó type I chiếm tỷ lệ 45,6%. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ các triệu chứng lâm sàng, chiều dài ống hậu môn, các giá trị áp lực cơ thắt hậu môn và các ngưỡng cảm nhận trực tràng giữa hai nhóm phản xạ rặn bình thường và nhóm có rối loạn đồng vận. Trong nghiên cứu trước đây của T. Yu và cs (2017) [17], Y. Zhao và cs (2019) [12], type I cũng là rối loạn đồng vận thường gặp nhất. Tỷ lệ cao bệnh nhân có rối loạn đồng vận trên đo HRAM trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Videlock và cs (2013) [18], Y. Zhao và cs (2019) [12], với tỷ lệ rối loạn đồng vận ở đối tượng táo bón mạn tính là 47,7-73,2%, tỷ lệ này trong nghiên cứu của Grossi và cs (2016) [19] ở đối tượng táo bón chức năng là 93,7% và ở nhóm chứng khỏe mạnh là 86,1%. Mặc dù HRAM là phương pháp rất hữu ích trong việc dễ dàng quan sát và phân loại được các phân nhóm rối loạn đồng vận phản xạ rặn khác nhau, tuy nhiên trong một nghiên cứu áp dụng kỹ thuật HRAM trên nhóm đối tượng có táo bón chức năng và nhóm chứng khỏe mạnh thì tỷ lệ rối loạn đồng vận chung giữa hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê [19]. Do đó, để tiếp cận và đánh giá sự phối hợp hậu môn - trực tràng trong phản xạ rặn hiệu quả, việc kết hợp HRAM với các kỹ thuật thăm dò chẩn đoán khác là rất cần thiết.

Kết luận

Tuổi và giới có mối liên quan với áp lực cơ thắt hậu môn. Ngưỡng cảm nhận dung nạp tối đa ở trực tràng cao hơn ở nhóm táo bón đơn thuần so với tiêu chảy đơn thuần. Rối loạn đồng vận phản xạ rặn type I gặp phổ biến nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.S. Rao, T. Patcharatrakul (2016), "Diagnosis and treatment of dyssynergic defecation", *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, **22**(3), pp.423-435.
- [2] W.E. Whitehead, L. Borrud, P.S. Goode, et al. (2009), "Fecal incontinence in US adults: epidemiology and risk factors", *Gastroenterology*, **137**(2), pp.512-517.
- [3] E.V. Carrington, H. Heinrich, C.H. Knowles, et al. (2020), "The international anorectal physiology working group (IAPWG) recommendations: standardized testing protocol and the London classification for disorders of anorectal function", *Neurogastroenterol Motil.*, **32**(1), DOI: 10.1111/nmo.13679.
- [4] A.E. Bharucha, A.R. Zinsmeister, G.R. Locke, et al. (2005),

“Prevalence and burden of fecal incontinence: a population-based study in women”, *Gastroenterology*, **129**(1), pp.42-49.

[5] N.C. Soares, A.C. Ford (2011), “Prevalence of, and risk factors for, chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and meta-analysis”, *The American Journal of Gastroenterology*, **106**(9), pp.1582-1591.

[6] G. Chiarioni, B. Ferri, A. Morelli, et al. (2005), “Bio-feedback treatment of fecal incontinence: where are we, and where are we going?”, *World Journal of Gastroenterology*, **11**(31), pp.4771-4775.

[7] Y. Li, X. Yang, C. Xu, et al. (2013), “Normal values and pressure morphology for three-dimensional high-resolution anorectal manometry of asymptomatic adults: a study in 110 subjects”, *International Journal of Colorectal Disease*, **28**(8), pp.1161-1168.

[8] E.V. Carrington, A. Brokjaer, H. Craven, et al. (2014), “Traditional measures of normal anal sphincter function using high-resolution anorectal manometry (HRAM) in 115 healthy volunteers”, *Neurogastroenterology and Motility*, **26**(5), pp.625-635.

[9] P.F. Vollebregt, A.M.P. Rasijeff, D. Pares, et al. (2019), “Functional anal canal length measurement using high-resolution anorectal manometry to investigate anal sphincter dysfunction in patients with fecal incontinence or constipation”, *Neurogastroenterology and Motility*, **31**(3), DOI: 10.1111/nmo.13532.

[10] H.J. Lee, K.W. Jung, S. Han, et al. (2014), “Normal values for high-resolution anorectal manometry/topography in a healthy Korean population and the effects of gender and body mass index”, *Neurogastroenterology and Motility*, **26**(4), pp.529-537.

[11] F. Gundling, H. Seidl, N. Scalercio, et al. (2010), “Influence of gender and age on anorectal function: normal values from anorectal manometry in a large caucasian population”, *Digestion*, **81**(4),

pp.207-213.

[12] Y. Zhao, X. Ren, W. Qiao, et al. (2019), “High-resolution anorectal manometry in the diagnosis of functional defecation disorder in patients with functional constipation: a retrospective cohort study”, *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, **25**(2), pp.250-257.

[13] C.T. Speakman, C.H. Hoyle, M.A. Kamm, et al. (1995), “Abnormal internal anal sphincter fibrosis and elasticity in fecal incontinence”, *Dis. Colon Rectum.*, **38**(4), pp.407-410.

[14] S.S. Rao (2010), “Advances in diagnostic assessment of fecal incontinence and dyssynergic defecation”, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **8**(11), pp.910-919.

[15] R.E. Burgell, S.M. Scott (2012), “Rectal hyposensitivity”, *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, **18**(4), pp.373-384.

[16] T. Yu, D. Qian, Y. Zheng, et al. (2016), “Rectal hyposensitivity is associated with a defecatory disorder but not delayed colon transit time in a functional constipation population”, *Medicine*, **95**(19), DOI: 10.1097/MD.0000000000003667.

[17] T. Yu, X. Shen, M. Li, et al. (2017), “Efficacy and predictors for biofeedback therapeutic outcome in patients with dyssynergic defecation”, *Gastroenterology Research and Practice*, DOI: 10.1155/2017/1019652.

[18] E.J. Videlock, A. Lembo, F. Cremonini (2013), “Diagnostic testing for dyssynergic defecation in chronic constipation: meta-analysis”, *Neurogastroenterology and Motility*, **25**(6), pp.509-520.

[19] U. Grossi, E.V. Carrington, A.E. Bharucha, et al. (2016), “Diagnostic accuracy study of anorectal manometry for diagnosis of dyssynergic defecation”, *Gut.*, **65**(3), pp.447-455.

Đánh giá kháng nguyên tái tổ hợp hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1) trong chẩn đoán nhanh bệnh nhân nhiễm melioidosis (bệnh Whitmore) bằng kỹ thuật ELISA

Trần Thị Lệ Quyên¹, Nguyễn Thị Tình¹, Bùi Nguyễn Hải Linh¹, Đỗ Quốc Tuấn², Trần Anh Đào³, Phạm Thị Huyền⁴, Trịnh Hồ Tinh⁵, Quế Anh Trâm³, Hoàng Quang Trung⁴, Trịnh Thành Trung^{1*}

¹Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Bệnh viện Đa khoa tỉnh Bắc Giang

³Bệnh viện Đa khoa tỉnh Nghệ An

⁴Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh

⁵Bệnh viện Đa khoa tỉnh Bình Định

Ngày nhận bài 8/4/2020; ngày gửi phản biện 21/4/2020; ngày nhận phản biện 16/6/2020; ngày chấp nhận đăng 6/7/2020

Tóm tắt:

Melioidosis (hay còn gọi là bệnh Whitmore) là một loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) gây nên. Bệnh có biểu hiện lâm sàng đa dạng. Vì vậy, chẩn đoán khẳng định ca nhiễm bệnh phải dựa trên bằng chứng xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Tuy nhiên, độ nhạy của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy thường phụ thuộc vào nhiều yếu tố, dẫn đến nguy cơ bỏ sót ca bệnh trong quá trình xét nghiệm. Trong nghiên cứu này, các tác giả xác định gene BPSS1498 mã hóa hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1), tạo dòng và biểu hiện protein bằng tế bào *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Protein hcp1 có kích thước 18,7 kDa được tinh sạch. Western blot chứng minh hcp1 gắn kết đặc hiệu với kháng thể IgG của bệnh nhân nhiễm melioidosis. Phương pháp hcp1-ELISA được thiết lập và đánh giá trên 94 mẫu huyết thanh (32 mẫu từ nhóm bệnh nhân melioidosis, 32 mẫu từ nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và 30 mẫu từ nhóm người khỏe mạnh). Sử dụng giá trị cut-off là 0,595, kỹ thuật hcp1-ELISA đạt độ nhạy 93,7% và độ đặc hiệu 98,4%. Kết quả nghiên cứu này mở ra hướng chẩn đoán mới trong xét nghiệm sàng lọc bệnh nhân nhiễm melioidosis tại Việt Nam, trên đối tượng bệnh nhân sốt kéo dài chưa rõ nguyên nhân do những hạn chế khi nuôi cấy vi khuẩn *B. pseudomallei* từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

Từ khóa: *Burkholderia pseudomallei*, ELISA, hcp1 protein, kháng nguyên protein tái tổ hợp, melioidosis, Whitmore.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Melioidosis (hay còn gọi là bệnh Whitmore) là một loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do vi khuẩn Gram âm *B. pseudomallei* sống ở trong đất gây nên. Melioidosis có bệnh cảnh lâm sàng đa dạng, có thể diễn tiến ở thể mạn tính, cấp tính và tới cấp tính kèm viêm phổi, nhiễm khuẩn huyết, sốc nhiễm khuẩn huyết và tử vong với tỷ lệ cao (>40%) nếu bệnh nhân không được chẩn đoán sớm và điều trị đúng kháng sinh theo phác đồ khuyến cáo [1]. Người có nguy cơ nhiễm bệnh cao là người có hoạt động thường ngày tiếp xúc với đất và nước nhiễm khuẩn, có độ tuổi trong khoảng từ 40 đến 70 tuổi (mặc dù bệnh vẫn gặp ở trẻ sơ sinh, trẻ em và người trưởng thành), người có các bệnh nền như tiểu đường, bệnh phổi và thận mạn tính, người nghiện rượu hoặc người thường xuyên sử dụng corticoid [1-3].

Con đường lây truyền chính của bệnh là tiếp xúc trực tiếp vết thương hở với đất và nước nhiễm vi khuẩn. Ngoài ra, bệnh có thể lây truyền qua con đường ăn uống khi ăn

thực phẩm tươi sống và uống nước chưa đun sôi nhiễm vi khuẩn. Bệnh cũng có thể lây truyền qua con đường hô hấp khi hít phải các hạt bụi hoặc hạt sol khí tạo ra trước cơn mưa lớn. Vì vậy, tỷ lệ nhiễm melioidosis thường tăng cao vào mùa mưa [1, 2].

Do dấu hiệu và triệu chứng lâm sàng đa dạng, có thể nhầm lẫn với các bệnh truyền nhiễm khác nên chẩn đoán melioidosis phải phụ thuộc chính vào xét nghiệm nuôi cấy và định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Tuy nhiên, xét nghiệm vi sinh có một số hạn chế nhất định là: (i) thời gian nuôi cấy và trả kết quả của xét nghiệm kéo dài từ 3-5 ngày; (ii) nhiều cán bộ xét nghiệm vi sinh chưa có kỹ năng nhận diện khuẩn lạc *B. pseudomallei* mọc trên môi trường nuôi cấy; (iii) nhiều mẫu bệnh phẩm tập nhiễm như đờm, ngoáy họng và nước tiểu cần phải sử dụng môi trường chọn lọc để nuôi cấy tăng sinh và làm giàu vi khuẩn *B. pseudomallei* trước khi phân lập; (iv) các phương pháp định danh sinh hóa API 20NE hoặc máy định

*Tác giả liên hệ: Email: tttrung@vnu.edu.vn

Evaluation of recombinant hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1) for rapid diagnosis of melioidosis (Whitmore's disease) using ELISA assay

Thi Le Quyen Tran¹, Thi Tinh Nguyen¹,
 Nguyen Hai Linh Bui¹, Quoc Tuan Do², Anh Dao Tran³,
 Thi Huyen Pham⁴, Ho Tinh Trinh⁵, Anh Tram Que³,
 Quang Trung Hoang⁴, Thanh Trung Trinh^{1*}

¹Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

²Bac Giang Provincial General Hospital

³Nghe An Provincial General Hospital

⁴Ha Tinh Provincial General Hospital

⁵Binh Dinh Provincial General Hospital

Received 8 April 2020; accepted 6 July 2020

Abstract:

Melioidosis (also called Whitmore's disease) is a fatal infectious disease caused by a Gram-negative soil-dwelling bacterium *Burkholderia pseudomallei*. Due to the diverse clinical manifestations, final diagnosis of the disease mostly relies on the examination of bacterial culture. However, the sensitivity of the culture method depends on various factors, leading to the misdiagnosis of the disease in the clinical setting. In this study, the authors amplified BPSS1498 gene coding hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1), cloned and expressed the recombinant protein using *E. coli* BL21(DE3) pLysS. The recombinant hcp1 protein antigen with 18.7 kDa was then purified and demonstrated a highly specific binding with human IgG of the culture-confirmed patient with melioidosis using Western blot. Hcp1-ELISA was established and evaluated on 94 sera collected from 32 culture-confirmed patients with melioidosis, 32 patients infected with other bacteria, and 30 healthy persons. Using a cut-off value of 0.595, hcp1-ELISA showed a sensitivity of 93.7% and a specificity of 98.4%. Those results lead to a potential application of hcp1-ELISA in the diagnosis of melioidosis in Vietnam, especially on the diagnosis of the disease in patients with fever of unknown origin due to the limitation of the routine culture methods.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, ELISA, hcp1 protein, melioidosis, recombinant protein antigen, Whitmore.

Classification number: 3.5

danh vi khuẩn tự động như Vitek 2 và Phoenix 100 trong các phòng xét nghiệm vi sinh thường định danh sai vi khuẩn *B. pseudomallei* thành những loài vi khuẩn khác [4]. Những hạn chế của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh có thể là nguyên nhân dẫn đến bỏ sót các ca nhiễm melioidosis. Bên cạnh đó, nghiên cứu trên bệnh nhân melioidosis [5] cho thấy, số lượng *B. pseudomallei* trong máu bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết là khá thấp, dao động trong khoảng từ 0,2-7,7 CFU/ml. Điều đó cũng ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh.

Một số kỹ thuật khác cũng đã được sử dụng để phát hiện trực tiếp căn nguyên *B. pseudomallei* từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng như kỹ thuật real-time PCR nhưng độ nhạy của phương pháp đối với mẫu máu thử nghiệm vẫn còn thấp [6]. Năm 2009, Felgner và cs [7] đã ứng dụng kỹ thuật microarray sàng lọc được 49 protein kháng nguyên có khả năng ứng dụng trong chẩn đoán huyết thanh bệnh nhân nhiễm melioidosis. Gần đây, một số nghiên cứu [8, 9] cũng đã tiến hành thử nghiệm các protein kháng nguyên trong chẩn đoán bệnh như 60 kDa molecular chaperone GroEL, hydroperoxide reductase, và hemolysin co-regulated protein (hcp1). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng, biểu hiện, tinh sạch và đánh giá khả năng ứng dụng protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1 bằng kỹ thuật ELISA để chẩn đoán bệnh nhân đã được xác định nhiễm melioidosis tại một số vùng của Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp

Mẫu huyết thanh

Từ 2018-2019, chúng tôi đã thu thập 94 mẫu huyết thanh tại 4 bệnh viện đa khoa tỉnh gồm Bắc Giang, Nghệ An, Hà Tĩnh và Bình Định. Các mẫu huyết thanh thu được bao gồm 32 mẫu từ nhóm bệnh nhân melioidosis [2], 32 mẫu từ nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn khác và 30 mẫu từ nhóm người khỏe mạnh. Huyết thanh của bệnh nhân nhiễm melioidosis được lấy sau khi có kết quả nuôi cấy vi sinh khẳng định phân lập được vi khuẩn *B. pseudomallei* từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng (sau 3 đến 10 ngày nhập viện). Huyết thanh của bệnh nhân nhiễm khuẩn khác được thu thập sau khi có kết quả định danh vi khuẩn bằng máy Phoenix hoặc máy Vitek 2 và các vi khuẩn được định danh là *Staphylococcus aureus* (n=6), *Escherichia coli* (n=9), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Enterococcus* spp. (n=2), *Acinetobacter* spp. (n=1), *Pseudomonas* spp. (n=4), *Streptococcus* spp. (n=3), và *Salmonella* spp. (n=1). Tỷ lệ giới tính nam/nữ của nhóm nhiễm melioidosis là 3,6; nhóm nhiễm khuẩn khác là 3,3; nhóm khỏe mạnh là 3,3. Độ tuổi trung bình của các nhóm lần lượt là 55±17, 54±17 và 47±20. Huyết thanh sau khi thu thập được bảo quản ở -20°C trước khi tiến hành thử nghiệm.

Tạo dòng và biểu hiện protein kháng nguyên hcp1

DNA vi khuẩn được tách chiết từ chủng *B. pseudomallei*

NA23 sử dụng chloroform: isoamyl alcohol. Chủng *B. pseudomallei* NA23 được phân lập từ bệnh nhân melioidosis nam 49 tuổi nhiễm khuẩn huyết kèm viêm phổi tại Nghệ An năm 2015. Trình tự kiểu gene của chủng vi khuẩn này được xác định là sequence type (ST) 46 và đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu multilocus sequence typing (MLST; <https://pubmlst.org/bpseudomallei/>). ST 46 là kiểu trình tự gene thường gặp trong lâm sàng và ngoài môi trường Việt Nam [3, 10]. Nồng độ và mức độ tinh sạch của DNA được kiểm tra trên máy NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PCR khuếch đại gene BPSS1498 mã hóa protein hcp1 được thực hiện trong phản ứng có tổng thể tích 25 μ l sử dụng Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) và cặp mồi đặc hiệu đã được mô tả trong nghiên cứu của Burtneck và cs (2011) [11] và được thiết kế phù hợp với trình tự nhận biết của enzyme giới hạn Esp3I. Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy Biometra Trio (Analytik Jena, Đức) với điều kiện phản ứng PCR là 95°C trong 30 giây; 35 chu kỳ 95°C trong 10 giây; 61°C trong 30 giây; 72°C trong 45 giây; 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR có kích thước 534 bp được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%, sau đó được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR purification (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trước khi đưa vào vector pPSG-IBA3 (IBA, Đức) và nhân dòng bằng chủng *Escherichia coli* DH5 α .

Plasmid pPSG-IBA3:BPSS1498 từ các dòng *E. coli* DH5 α màu trắng trên môi trường thạch LB chứa X-gal 20 mg/ml tiếp tục được tách chiết bằng chloroform: isoamyl alcohol trước khi biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Để biểu hiện protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1, các dòng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) pLysS mang plasmid pPSG-IBA3:BPSS1498 được nuôi cấy trên 20 ml môi trường LB lỏng chứa ampicillin 100 μ g/ml và 10 μ l chất cảm ứng IPTG 1 M (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Sau 4 giờ nuôi cấy ở 37°C và tốc độ lắc 160 vòng/phút, tế bào vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm 8000 vòng/phút trong 5 phút và được lưu giữ ở -20°C cho các bước thí nghiệm tiếp theo.

Tinh sạch protein kháng nguyên hcp1

Tế bào vi khuẩn biểu hiện protein tái tổ hợp được hòa vào đệm W chứa 6 M urea. Sau 3 giờ ủ ở nhiệt độ phòng, hỗn hợp tế bào được ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 30 phút. Phần huyền phù được tải lên cột Strep-tactin XT (IBA, Đức). Quy trình rửa và thu hồi protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1 được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kỹ thuật SDS-PAGE

Các phân đoạn tải mẫu, rửa cột và thu hồi protein tái

tổ hợp trên cột Strep-tactin XT, cùng thang chuẩn protein (PageRuler™ Unstained Protein Ladder 10 to 200 kDa, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) được điện di trên gel SDS-PAGE nồng độ polyacrylamide 15% (Sigma, Mỹ) ở hiệu điện thế 120 V và thời gian điện di 2 giờ. Bản gel sau khi điện di được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue 0,1% (Bio Basic, Canada) trong 30 phút, sau đó tẩy gel bằng dung dịch tẩy màu (methanol 40% và acetic acid 10%; Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trong 45 phút và thay dịch tẩy màu sau mỗi 15 phút.

Kỹ thuật western blot

Protein trên gel SDS-PAGE sau điện di được thấm lên màng polyvinylidene difluoride (PVDF, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) bằng máy chuyển màng (SD10, Cleaver Scientific, Anh) ở hiệu điện thế 30 V trong 1 giờ. Màng PVDF sau đó được ngâm với đệm PBS chứa 5% BSA và 0,05% Tween 20, rửa 3 lần với đệm PBS và ủ với kháng thể dê kháng kháng thể người IgG cộng hợp horseradish peroxidase (pha loãng trong đệm PBS 1:10000; Abcam, Mỹ). Sau khi rửa với đệm PBS, màng được ủ với dung dịch cơ chất TMB (Pierce™ 1-Step Ultra TMB, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) đến khi xuất hiện màu phản ứng.

Kỹ thuật ELISA

Protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1 ở các phân đoạn sạch được trộn đều và định lượng bằng phương pháp Bradford sử dụng chất chuẩn BSA (Bio Basic, Canada) với dãy pha loãng 10-80 μ g/ml trong đệm PBS. Lượng protein kháng nguyên tái tổ hợp hcp1 (1 μ g/giếng) được gắn lên đĩa ELISA và ủ ở 4°C qua đêm. Protein dư thừa được loại bỏ và rửa 3 lần với đệm PBS chứa 0,05% Tween 20 (Bio Basic, Canada). Sau khi ủ với đệm PBS chứa 1% BSA, huyết thanh thử nghiệm pha loãng với đệm PBS ở tỷ lệ 1:4000 được tra vào các giếng ELISA. Sau khi rửa đĩa 3 lần, mỗi giếng được bổ sung 100 μ l kháng thể dê kháng kháng thể người IgG cộng hợp horseradish peroxidase (pha loãng trong đệm PBS 1:10000; Abcam, Mỹ) và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi đổ bỏ dịch dư thừa và rửa đĩa 3 lần, các giếng tiếp tục được ủ 30 phút trong tối ở nhiệt độ phòng với 100 μ l dung dịch cơ chất OPD (100 ml dung dịch O-phenylenediamine dihydrochloride 0,016% (Sigma, Mỹ) chứa 16 μ l H₂O₂ 30% (Merck, Đức)). Phản ứng enzyme-cơ chất được dừng bằng 50 μ l dung dịch H₂SO₄ 2 M (Merck, Đức). Cường độ màu tạo thành được đo ở bước sóng 490 nm trên máy 800 TS Microplate Reader (BioTek, Mỹ).

Kết quả

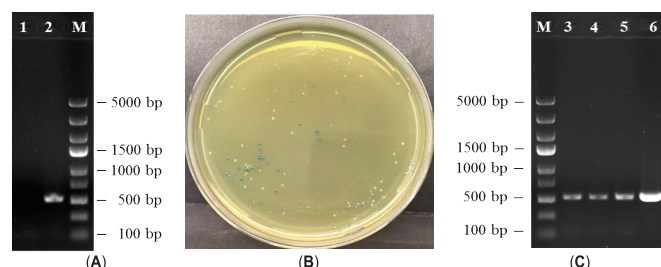
PCR gene BPSS1498 mã hóa protein hcp1

DNA khuôn của chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* NA23 được sử dụng để khuếch đại gene BPSS1498 với cặp mồi

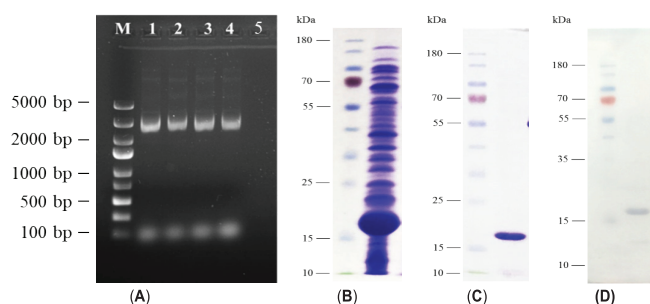
được thiết kế để đảm bảo phản ứng PCR nhân đặc hiệu gene đích và có trình tự để enzyme giới hạn Esp3I nhận diện. Sản phẩm PCR có kích thước 534 bp (bao gồm 507 bp gene *hcp1* và phần dư 27 bp tại 2 đầu 5' của primers để enzyme giới hạn nhận diện) được trình bày tại hình 1A.

Tạo dòng và lựa chọn chủng biểu hiện protein kháng nguyên *hcp1*

Sản phẩm PCR gene BPSS1498 được tinh sạch và xử lý với enzyme giới hạn Esp3I. Sau khi gắn vào vector pPSG-IBA3, plasmid được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Các khuẩn lạc *E. coli* DH5 α mang plasmid pPSG-IBA3 chứa gene BPSS1498 có màu trắng trên môi trường LB có X-gal được lựa chọn (hình 1B). *E. coli* DH5 α /pPSG-IBA3::BPSS1498 tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường LB dịch thể có bổ sung ampicillin nhằm phục vụ cho việc tách chiết plasmid pPSG-IBA3:BPSS1498 (hình 2A) và biến nạp vào dòng tế bào biểu hiện *E. coli* BL21(DE3) pLysS.



Hình 1. Kết quả PCR và tạo dòng. (A) Giếng 1 là đối chứng âm, giếng 2 là sản phẩm PCR gene BPSS1498 khuếch đại từ DNA khuôn của chủng *B. pseudomallei* NA23. (B) Tạo dòng vi khuẩn *E. coli* DH5 α màu trắng mang plasmid pPSG-IBA3 chứa gene BPSS1498. (C) Kết quả PCR gene BPSS1498 khuếch đại trực tiếp từ các khuẩn lạc *E. coli* DH5 α màu trắng.

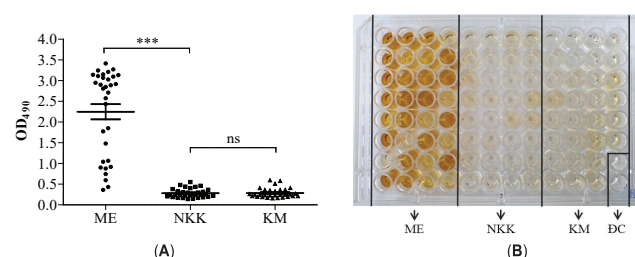


Hình 2. Kết quả tách plasmid pPSG-IBA3:BPSS1498 (A), biểu hiện protein *hcp1* sử dụng *E. coli* BL21(DE3) pLysS (B), tinh sạch protein *hcp1* (C) và chạy western blot protein *hcp1* với huyết thanh bệnh nhân nhiễm melioidosis (D).

Chẩn đoán melioidosis bằng kỹ thuật *hcp1*-ELISA

ELISA được triển khai trên các mẫu huyết thanh thử nghiệm. Giá trị trung bình OD₄₉₀ của nhóm bệnh nhân melioidosis là 2,249 $\pm$ 1,038 (dao động từ 0,363-3,414), của nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác là 0,283 $\pm$ 0,106

(dao động từ 0,142-0,550), của nhóm người khỏe mạnh là 0,286 $\pm$ 0,117 (dao động từ 0,157-0,595). Cường độ OD₄₉₀ của nhóm bệnh nhân melioidosis cao hơn cường độ OD₄₉₀ của nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và nhóm người khỏe mạnh lần lượt là 7,94 và 7,86. Phân tích thống kê cho thấy, giá trị OD₄₉₀ của nhóm bệnh nhân melioidosis cao hơn có ý nghĩa thống kê so với giá trị OD₄₉₀ của nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và nhóm người khỏe mạnh ($p < 0,001$); giá trị OD₄₉₀ của nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và nhóm người khỏe mạnh là tương đương nhau ($p > 0,05$) (hình 3A). Nếu lấy OD₄₉₀ cao nhất trong nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác và nhóm người khỏe mạnh làm giá trị cut-off (OD₄₉₀ = 0,595) thì chỉ có 2 trên tổng số 32 bệnh nhân melioidosis bị chẩn đoán nhầm (âm tính giả), 1 trên tổng số 62 người nhiễm khuẩn huyết khác và người khỏe mạnh bị chẩn đoán nhầm (dương tính giả). Vì vậy, phương pháp *hcp1*-ELISA có độ nhạy là 93,7% và độ đặc hiệu là 98,4%.



Hình 3. Đồ thị kết quả *hcp1*-ELISA (A) và hình ảnh đĩa *hcp1*-ELISA (B). Nhóm bệnh nhân melioidosis (ME), nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết khác (NKK) và nhóm người khỏe mạnh (KM).

Bàn luận

Melioidosis là bệnh truyền nhiễm phổ biến ở khu vực Đông Nam Á và vùng phía Bắc Australia. Tại Việt Nam, ca bệnh đầu tiên được phát hiện và mô tả năm 1925, sau đó, hàng trăm ca bệnh đã được phát hiện và công bố trên binh lính Pháp và Mỹ tham chiến tại Việt Nam. Năm 1969, melioidosis được liệt kê là 1 trong 6 bệnh truyền nhiễm gây tử vong cao mà binh lính Mỹ thường mắc phải trong chiến tranh Việt Nam [12]. Tuy nhiên, sau ngày miền Nam giải phóng, bệnh đã hoàn toàn bị lãng quên. Trong thời gian qua, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tiên phong hướng dẫn nhiều bệnh viện tuyến tỉnh phương pháp nuôi cấy xét nghiệm vi khuẩn *B. pseudomallei* trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Chỉ trong thời gian ngắn, hàng trăm ca melioidosis đã được phát hiện [2, 12] Theo dự báo, mỗi năm ở Việt Nam có khoảng 10430 ca nhiễm melioidosis và con số tử vong khoảng 4703 ca [13]. Tuy nhiên, số lượng ca bệnh phát hiện ở nước ta đang thấp hơn rất nhiều so với các nước láng giềng và so với con số dự đoán của các chuyên gia quốc tế. Số lượng thấp đó có thể do sự hạn chế về độ nhạy của

phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh dẫn đến bỏ sót ca bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển kỹ thuật chẩn đoán ELISA sử dụng protein hcp1 nhằm bổ sung thêm các phương pháp xét nghiệm melioidosis tại Việt Nam.

Genome của *B. pseudomallei* mã hóa hệ thống tiết loại 6 (type VI secretion systems; T6SSs), trong đó hcp proteins là những thành phần của hệ thống tiết loại 6 nằm trên bề mặt tế bào và thường tìm thấy trong dịch nuôi cấy vi khuẩn có hệ thống tiết này. Trong số 6 loại hcp thử nghiệm, chỉ duy nhất hcp1 có phản ứng với kháng thể của bệnh nhân nhiễm melioidosis khi thử bằng phương pháp western blot. Kết quả đó minh chứng hcp1 có khả năng biểu hiện *in vivo* và có khả năng kích thích tạo đáp ứng miễn dịch. Tuy nhiên, hcp1 không biểu hiện *in vitro* khi nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường dịch thể LB [11]. Điều đặc biệt là bệnh nhân nhiễm melioidosis không có kháng thể kháng các hcp proteins từ 2 tới 6. Hcp1 có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch để bảo vệ 50% chuột khi tiêm ở liều thử thách gấp 50 lần so với liều gây chết. Tuy nhiên, hcp proteins không được khuyến cáo cho chế tạo vaccine vì tính bảo vệ chuột tránh bệnh và tỷ lệ chuột chết là rất thấp khi lặp lại thử nghiệm. Vì vậy, nghiên cứu đã đề xuất hcp1 có thể ứng dụng trong chẩn đoán huyết thanh học [11]. Phân tích transcriptome cũng chỉ ra rằng, hcp1 biểu hiện mạnh trong quá trình xâm nhiễm đại thực bào U937 so với các gene khác trong hệ thống tiết loại 6 và cũng là protein duy nhất trong số 3 protein tái tổ hợp từ các gene BPSS0529, BPSS1498 và BPSS1499 lựa chọn có phản ứng dương tính với kháng thể của bệnh nhân melioidosis bằng kỹ thuật ELISA và western blot [14]. Nghiên cứu đánh giá phương pháp ELISA sử dụng các kháng nguyên O-polysaccharide (OPS), 6-deoxyheptancapsularpolysaccharide (CPS), whole-cell (WC) và culture filtrate (CF) trên huyết thanh của bệnh nhân Thái Lan nhiễm melioidosis thấy rằng, OPS-ELISA cho kết quả xét nghiệm tốt nhất [15]. Khi so sánh OPS-ELISA với hcp1-ELISA, Pumpuang và cs [9] đã kiểm chứng trên 141 mẫu huyết thanh thu thập ngay lúc bệnh nhân nhiễm melioidosis nhập viện, 188 người Thái Lan khỏe mạnh, 90 người Mỹ khỏe mạnh, 20 bệnh nhân lao phổi, 50 bệnh nhân sốt mò và 50 bệnh nhân nhiễm leptospirosis. Sử dụng giá trị cut-off tương ứng với độ đặc hiệu 95% thì độ nhạy của phương pháp ELISA hcp1 là 83%. Độ nhạy và độ đặc hiệu này tốt hơn so với phương pháp OPS-ELISA. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi sử dụng huyết thanh của người Việt Nam hoàn toàn tương đồng với các nghiên cứu trước đó. Kết quả minh chứng phương pháp hcp1-ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao, lần lượt là 93,7 và 98,4%.

Nghiên cứu theo dõi độ nhạy của phương pháp hcp1-ELISA tại các tuần 0, tuần 12 và tuần 52 cho thấy, độ nhạy

lần lượt là 81,5 (163/200), 82,3 (93/113) và 81,8% (90/110). So sánh hiệu giá kháng thể kháng hcp1 tại tuần 0 và tuần 12 không khác nhau nhiều nhưng có sự giảm đáng kể hiệu giá kháng thể ở tuần thứ 52 [9]. Điều đó cho thấy, hcp1-ELISA có khả năng chẩn đoán phân biệt người đã từng phơi nhiễm và người mới phơi nhiễm với vi khuẩn *B. pseudomallei*. Kết quả đó minh chứng tiềm năng sử dụng hcp1-ELISA như một phương pháp mới trong chẩn đoán huyết thanh bệnh nhân nhiễm melioidosis tại Việt Nam, đặc biệt ứng dụng trong chẩn đoán sàng lọc bệnh nhân nhiễm melioidosis trên các đối tượng bệnh nhân sốt kéo dài chưa rõ nguyên nhân, do sự hạn chế về độ nhạy của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh.

Kết luận

Gene BPSS1498 mã hóa protein hcp1 được phân lập, tạo dòng và biểu hiện bằng tế bào *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Phương pháp hcp1-ELISA được triển khai đánh giá trên 94 mẫu huyết thanh (32 mẫu từ nhóm bệnh nhân melioidosis, 32 mẫu từ nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn khác và 30 mẫu từ nhóm người khỏe mạnh). Sử dụng giá trị cut-off là 0,595, phương pháp hcp1-ELISA đạt độ nhạy là 93,7% và độ đặc hiệu là 98,4%. Kết quả đạt được tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đó trên thế giới. Phương pháp hcp1-ELISA được đề xuất ứng dụng trong chẩn đoán sàng lọc bệnh nhân nhiễm melioidosis tại Việt Nam, đặc biệt trên đối tượng bệnh nhân sốt kéo dài chưa rõ nguyên nhân do sự hạn chế của phương pháp xét nghiệm nuôi cấy vi sinh.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nhiệm vụ Quỹ gene “Nghiên cứu khai thác nguồn gene vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* và đánh giá đặc tính sinh học nhằm nâng cao hiệu quả chẩn đoán, dự phòng và điều trị” (mã số NVQG-2018/08) do Bộ Khoa học và Công nghệ tài trợ. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] W.J. Wiersinga, B.J. Currie, S.J. Peacock (2012), “Melioidosis”, *N. Engl. J. Med.*, **367**(11), pp.1035-1044.
- [2] T.T. Trinh, et al. (2018), “A simple laboratory algorithm for diagnosis of melioidosis in resource-constrained areas: a study from north-central Vietnam”, *Clin. Microbiol. Infect.*, **24**(1), pp.84 e1-84 e4.
- [3] D.M. Phuong, et al. (2008), “Clinical and microbiological features of melioidosis in northern Vietnam”, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **102**, Suppl. 1, pp.S30-S36.
- [4] A.R. Hoffmaster, et al. (2015), “Melioidosis diagnostic workshop, 2013”. *Emerg. Infect. Dis.*, **21**(2), DOI: 10.3201/eid2102.141045.

- [5] V. Wuthiekanun, et al. (2007), "Quantitation of *B. pseudomallei* in clinical samples", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **77**(5), pp.812-813.
- [6] E.M. Meumann, et al. (2009), "Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis", *J. Clin. Microbiol.*, **44**(8), pp.3028-3030.
- [7] P.L. Felgner, et al. (2009), "A *Burkholderia pseudomallei* protein microarray reveals serodiagnostic and cross-reactive antigens", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(32), pp.13499-13504.
- [8] C. Kohler, et al. (2016), "Rapid and sensitive multiplex detection of *Burkholderia pseudomallei* - specific antibodies in melioidosis patients based on a protein microarray approach", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **10**(7), DOI: 10.1371/journal.pntd.0004847.
- [9] A. Pumpuang, et al. (2017), "Comparison of O-polysaccharide and hemolysin co-regulated protein as target antigens for serodiagnosis of melioidosis", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **11**(3), DOI: 10.1371/journal.pntd.0005499.
- [10] T.T. Trinh, et al. (2019), "Erythritol as a single carbon source improves cultural isolation of *Burkholderia pseudomallei* from rice paddy soils", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **13**(10), DOI: 10.1371/journal.pntd.0007821.
- [11] M.N. Burtnick, et al. (2011), "The cluster 1 type VI secretion system is a major virulence determinant in *Burkholderia pseudomallei*", *Infect. Immun.*, **79**(4), pp.1512-1525.
- [12] T.T. Trinh, et al. (2018), "Melioidosis in Vietnam: recently improved recognition but still an uncertain disease burden after almost a century of reporting", *Trop. Med. Infect. Dis.*, **3**(2), DOI: 10.3390/tropicalmed3020039.
- [13] D. Limmathurotsakul, et al. (2016), "Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis", *Nat. Microbiol.*, **1**(1), DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
- [14] S. Chieng, R. Mohamed, S. Nathan (2015), "Transcriptome analysis of *Burkholderia pseudomallei* T6SS identifies Hcp1 as a potential serodiagnostic marker", *Microb. Pathog.*, **79**, pp.47-56.
- [15] V. Suttisunhakul, et al. (2016), "Development of rapid enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Burkholderia pseudomallei*", *J. Clin. Microbiol.*, **54**(5), pp.1259-1268.

Khảo nghiệm và hoàn thiện quy trình canh tác giống lúa thuần HD11 phục vụ mục tiêu phát triển lúa gạo quốc gia

Tạ Hồng Lĩnh¹, Dương Xuân Tú², Chu Đức Hà^{3*}, Trịnh Khắc Quang¹, Trần Đức Trung¹

¹Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam (VAAS)

²Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, VAAS

³Viện Di truyền Nông nghiệp, VAAS

Ngày nhận bài 10/1/2020; ngày chuyển phản biện 15/1/2020; ngày nhận phản biện 17/2/2020; ngày chấp nhận đăng 25/2/2020

Tóm tắt:

Cung ứng các giống lúa năng suất và chất lượng cho cơ cấu giống tại địa phương được xem là một trong những nhiệm vụ quan trọng của sản xuất lúa gạo hiện nay. Trong nghiên cứu này, giống lúa thuần HD11 đã được đưa vào khảo nghiệm sinh thái tại một số tỉnh phía Bắc. Kết quả thu được từ 7 điểm khảo nghiệm đại diện cho thấy, giống HD11 có năng suất thực thu khá cao (6,8-7,4 tấn/ha ở vụ xuân và 6,0-6,9 tấn/ha ở vụ mùa), thời vụ gieo trồng thích hợp là vụ mùa sớm với lượng phân bón khuyến cáo: 1 tấn phân hữu cơ vi sinh + 110 kg N + 100 kg P₂O₅ + 90 kg K₂O/ha, mật độ cấy 40 khóm/m². Cần chú ý chế độ sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hợp lý để hạn chế sự xuất hiện của các sâu bệnh hại chính trên đồng ruộng.

Từ khóa: canh tác, khảo nghiệm, lúa gạo, mật độ cấy, năng suất, phân đạm.

Chỉ số phân loại: 4.1

Mở đầu

Chọn tạo dòng/giống lúa gạo (*Oryza sativa*) năng suất và chất lượng được xem là một giải pháp cấp thiết nhằm bổ sung vào cơ cấu giống tại các vùng canh tác [1]. Hiện nay, một số giống lúa phổ biến tại các tỉnh phía Bắc, chủ yếu là Khang dân 18, Bắc thơm số 7 (BT7) và BC15 tỏ ra kém thích ứng với diễn biến phức tạp trên đồng ruộng, như bất lợi phi sinh học và sâu bệnh [2]. Thực tiễn này đã đặt ra câu hỏi và cũng định hướng cho phát triển sản phẩm lúa gạo quốc gia hướng đến sản xuất nông nghiệp bền vững [3].

Các thành tựu trong kỹ thuật sinh học phân tử (chọn dòng nhờ chỉ thị phân tử, chuyển gen, chỉnh sửa gen) kết hợp với phương pháp truyền thống (lai hữu tính, chọn dòng đột biến) đã được ghi nhận trong chọn tạo ra nhiều dòng/giống lúa mới [4]. Trong đó, đánh giá thời vụ, lượng phân bón và mật độ cấy được xem là những bước quan trọng nhằm hoàn thiện quy trình đưa giống ra sản xuất đại trà.

Trong nghiên cứu này, giống lúa thuần HD11, chọn tạo bằng phương pháp lai truyền thống đã được đánh giá trong điều kiện canh tác của một số tỉnh phía Bắc. Thời vụ gieo cấy, lượng phân bón cần thiết, mật độ cấy của giống lúa HD11 đã được xem xét tại 7 tiểu vùng sinh thái đại diện ở miền Bắc Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu này là cơ sở cho việc công nhận sản xuất thử đối với giống lúa HD11 và

tiếp theo là bổ sung vào cơ cấu giống lúa cho các tỉnh phía Bắc.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa thuần HD11 do Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm chọn tạo. Hai giống đối chứng là BT7 do Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm cung cấp và BT7 kháng bạc lá (BT7 KBL) của Học viện Nông nghiệp Việt Nam [5].

Phương pháp nghiên cứu

Khảo nghiệm sinh thái: các thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên 3 lần nhắc lại với quy mô từ 0,1 đến 2,0 ha/điểm khảo nghiệm cho mỗi vụ. Các quan sát và đánh giá trên đồng ruộng được tiến hành dựa theo mô tả trong “Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa - QCVN 01-55:2011/BNNPTNT” [6].

Theo dõi và đánh giá thời vụ gieo cấy: thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của thời vụ đến giống lúa HD11 được tiến hành với 3 công thức thời vụ tại 3 địa điểm khảo nghiệm. Diện tích ô thí nghiệm là 10 m², mật độ cấy là 40 khóm/m² với 2-3 dảnh/khóm. Lượng phân bón (tính trên 1 ha đồng ruộng) và quy trình chăm sóc chung cho giống lúa HD11

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

Results of testing and construction of cultivation for the inbred rice variety HD11 towards the development of the national rice production

Hong Linh Ta¹, Xuan Tu Duong², Duc Ha Chu^{3*},
Khac Quang Trinh¹, Duc Trung Tran¹

¹Vietnam Academy of Agricultural Sciences (VAAS)

²Field Crops Research Institute, VAAS

³Agricultural Genetics Institute, VAAS

Received 10 January 2020; accepted 25 February 2020

Abstract:

Introducing newly screened rice cultivars of high-yields and good quality to the local varieties structure has been considered as one of the important missions of rice production today. In this study, the inbred rice variety HD11 was evaluated and tested in different localities in the North of Vietnam. Results from 7 testing places indicated that the rice variety HD11 gave high yields (6.8-7.4 tons/ha in Spring season and 6.0-6.9 tons/ha in the Summer), properly cultivated in the early autumn season with recommended fertiliser amount of 1 ton of organic biological fertiliser + 110 kg N + 100 kg P₂O₅ + 90 kg K₂O per hectare and planting density of 40 hills/m². In addition, the suitable utilisation of insecticides and fungicides for controlling major pests and diseases in the fields was also remarkably focused.

Keywords: cultivation, nitrogen fertiliser, planting density, rice, testing, yields.

Classification number: 4.1

được áp dụng theo định mức chung của giống lúa BT7 cho các tỉnh phía Bắc.

Theo dõi và đánh giá mật độ cấy và mức phân đạm: thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của mật độ cấy và lượng phân đạm trong canh tác giống lúa HD11 tại các vùng sinh thái phía Bắc được bố trí theo kiểu ô chính, ô phụ với 3 lần nhắc lại. Ô chính là 4 mức phân bón (P1-P4), ô phụ là 3 công thức mật độ cấy (M1-M3) (bảng 1). Diện tích mỗi ô thí nghiệm (ô phụ) là 20 m². Quy trình chăm sóc được tiến hành tương tự như sản xuất lúa chất lượng (BT7) tại các tỉnh phía Bắc.

Bảng 1. Các công thức mật độ cấy và mức phân bón sử dụng trong nghiên cứu.

Mật độ cấy (khóm/m ²)	Công thức phân bón (tính theo 1 ha)
M1 30	P1 1 tấn phân hữu cơ vi sinh (HCVS) + 90 kg N + 100 kg P ₂ O ₅ + 90 kg K ₂ O
M2 40	P2 1 tấn phân HCVS + 100 kg N + 100 kg P ₂ O ₅ + 90 kg K ₂ O
M3 50	P3 1 tấn phân HCVS + 110 kg N + 100 kg P ₂ O ₅ + 90 kg K ₂ O
	P4 1 tấn phân HCVS + 120 kg N + 100 kg P ₂ O ₅ + 90 kg K ₂ O

Phân tích và xử lý số liệu: các chỉ tiêu theo dõi trên đồng ruộng được ghi nhận và phân tích bằng phần mềm Microsoft Office và IRRISTAT 5.0.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Khảo nghiệm sinh thái của giống lúa HD11 được tiến hành trong vụ xuân và vụ mùa 2018 tại 7 điểm khảo nghiệm đại diện cho các tiểu vùng sinh thái, bao gồm: (i) Yên Thành, Nghệ An; (ii) Phú Bình, Thái Nguyên; (iii) Gia Lộc, Hải Dương; (iv) Phúc Thọ, Hà Nội; (v) Hải Hậu, Nam Định; (vi) Điện Biên và (vii) Hưng Yên.

Thí nghiệm đánh giá thời vụ gieo cấy của giống lúa HD11 được tiến hành tại 3 điểm, bao gồm Hải Dương (khu vực Đồng bằng sông Hồng), Thái Nguyên (khu vực trung du miền núi phía Bắc) và Nghệ An (Bắc Trung Bộ) trong vụ mùa 2018 với thông tin mô tả ở bảng 2.

Bảng 2. Thời vụ gieo cấy của giống lúa HD11 tại các điểm khảo nghiệm.

Địa phương	Nghe An	Hải Dương	Thái Nguyên
Thời vụ 1	Gieo: 15/5/2018 Cấy: 25/5/2018	Gieo: 15/6/2018 Cấy: 23/6/2018	Gieo: 05/6/2018 Cấy: 15/6/2018
Thời vụ 2	Gieo: 22/5/2018 Cấy: 29/5/2018	Gieo: 22/6/2018 Cấy: 30/6/2018	Gieo: 12/6/2018 Cấy: 22/6/2018
Thời vụ 3	Gieo: 29/5/2018 Cấy: 10/6/2018	Gieo: 29/6/2018 Cấy: 6/7/2018	Gieo: 19/6/2018 Cấy: 27/6/2018

Kết quả và thảo luận

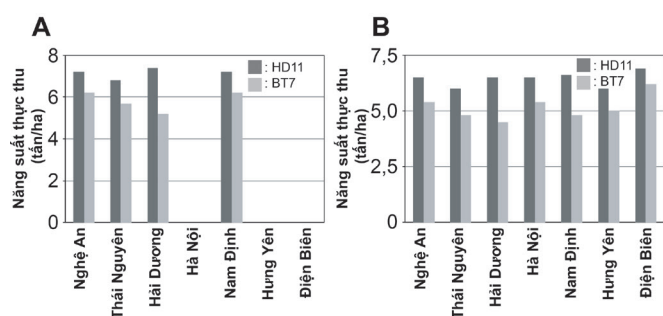
Đánh giá khảo nghiệm giống lúa thuần HD11 tại các tỉnh phía Bắc

Trong khảo nghiệm cơ bản, năng suất thực thu của giống lúa HD11 được thu thập tại 5 địa phương đại diện cho các vùng sinh thái phía Bắc. Theo dõi trong vụ xuân 2018, giống lúa thuần HD11 tỏ ra ưu thế hơn về năng suất (vượt 4,1-6,1%) so với giống đối chứng BT7 và BT7 KBL (bảng 3). Cụ thể, nằm trong nhóm giống ngắn ngày chất lượng, giống HD11 có năng suất thực thu vào vụ xuân dao động từ 6,13 (tại Hòa Bình) đến 8,02 tấn/ha (tại Thanh Hóa), trung bình 7,05 tấn/ha. Trong khi đó, năng suất thực thu của giống đối chứng BT7 và BT7 KBL lần lượt là 5,75-7,18 tấn/ha (trung bình 6,52 tấn/ha) và 5,24-7,40 tấn/ha (trung bình 6,54 tấn/ha), tương tự như trong ghi nhận gần đây [5]. Sự chênh lệch về năng suất của giống lúa HD11 so với 2 giống đối chứng là có ý nghĩa ở mức 5%.

Bảng 3. Năng suất thực thu của giống lúa HD11 trong khảo nghiệm cơ bản.

TT	Giống	Điểm khảo nghiệm					Bình quân
		Hưng Yên	Thái Bình	Yên Bái	Hòa Bình	Thanh Hóa	
1	HD11	7,28	6,50	7,32	6,13	8,02	7,05
2	BT7	7,18	5,75	6,87	6,53	6,26	6,52
3	BT7 KBL	6,96	5,24	5,92	7,17	7,40	6,54
CV (%)		5,1	6,1	4,2	4,1	5,2	
LSD _{0,05}		4,96	7,32	4,88	4,69	6,07	

Để đánh giá khả năng thích ứng và năng suất của giống lúa HD11 ở các tỉnh phía Bắc, 7 địa phương đại diện cho các tiểu vùng sinh thái khác nhau đã được lựa chọn cho khảo nghiệm sinh thái. Kết quả theo dõi năng suất thực thu của giống HD11 và so sánh với BT7 được minh họa ở hình 1A (vụ xuân 2018) và hình 1B (vụ mùa 2018).



Hình 1. Năng suất thực thu của giống lúa HD11 trong khảo nghiệm sinh thái vào vụ xuân 2018 (A) và vụ mùa 2018 (B).

Tại tất cả các tiểu vùng sinh thái, năng suất thực thu của HD11 đều cao hơn hẳn giống BT7 trong cả 2 vụ. Trong vụ xuân 2018, giống lúa HD11 có năng suất thực thu tại các điểm khảo nghiệm sinh thái dao động từ 6,80 (tại Thái Nguyên) đến 7,40 tấn/ha (tại Hải Dương), trong khi đó, giống lúa BT7 có năng suất thực thu đạt khoảng 5,20-6,20 tấn/ha (hình 1A). Ở vụ mùa 2018, năng suất thực thu của giống HD11 nằm trong khoảng từ 6,00 (tại Thái Nguyên và Hưng Yên) đến 6,90 tấn/ha (tại Điện Biên), cao hơn so với BT7 (dao động 4,50-6,20 tấn/ha) (hình 1B). Tóm lại, năng suất thực thu trung bình của giống lúa HD11 trong khảo nghiệm sinh thái đạt khoảng 6,90 tấn/ha (vụ xuân) và 6,30 tấn/ha (vụ mùa), cao hơn so với đối chứng BT7 (5,80 tấn/ha trong vụ xuân và 5,00 tấn/ha trong vụ mùa). Để đánh giá chính xác khả năng thích nghi, tiềm năng năng suất và chống chịu sâu bệnh hại của giống lúa HD11 cần tiếp tục tiến hành mở rộng khảo nghiệm ở những vụ tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời vụ đến canh tác giống lúa HD11 tại các tỉnh phía Bắc

Thí nghiệm về thời vụ gieo cấy giống HD11 bước đầu tiến hành trong vụ mùa 2018 tại 3 vùng sinh thái đại diện cho các tỉnh phía Bắc, kết quả theo dõi được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời vụ đến sinh trưởng và phát triển của giống lúa HD11.

Thời vụ	Chỉ tiêu	TGST (ngày)	Số bông/m ²	Số hạt/bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)	P ₁₀₀₀ (g)	NSTT (tấn/ha)
Nghệ An							
Thời vụ 1		110	235,4	162,0	85,1	24,0	6,05
Thời vụ 2		109	240,2	167,0	90,7	24,2	6,78
Thời vụ 3		111	237,5	160,0	88,9	24,1	6,50
CV (%)							5,7
LSD _{0,05}							2,8
Hải Dương							
Thời vụ 1		110	240,8	157,8	90,4	24,1	6,53
Thời vụ 2		110	235,7	155,7	89,1	24,2	6,28
Thời vụ 3		112	237,5	145,5	87,6	24,0	6,02
CV (%)							4,8
LSD _{0,05}							3,5
Thái Nguyên							
Thời vụ 1		110	235,5	157,8	89,1	24,0	6,23
Thời vụ 2		110	230,7	155,7	88,3	24,1	6,08
Thời vụ 3		112	220,9	145,5	87,4	24,1	5,82
CV (%)							4,5
LSD _{0,05}							3,7

Ghi chú: TGST: thời gian sinh trưởng; P₁₀₀₀: khối lượng 1000 hạt; NSTT: năng suất thực thu.

Theo dõi ảnh hưởng của thời vụ gieo cấy đến năng suất của giống lúa HD11 tại Nghệ An trong vụ mùa 2018 cho thấy, năng suất thực thu trong cả 3 công thức thời vụ đều có sự sai khác có ý nghĩa. Đáng chú ý, thời vụ 2 (gieo vào 22/5/2018, cấy vào 29/5/2018) nhờ gặp thời tiết thuận lợi hơn nên tỷ lệ hạt chắc cao (90,7%), năng suất thực thu cao nhất (6,78 tấn/ha). Trong khi đó, thời vụ 1 trùng với thời điểm mưa bão đầu mùa gây ngập úng nên tỷ lệ hạt chắc thấp nhất (85,1%), năng suất thực thu chỉ đạt 6,05 tấn/ha (bảng 4). Còn tại Hải Dương, mưa nhiều xảy ra vào đầu vụ nên thời vụ 3 (gieo vào 29/6/2018, cấy vào 6/7/2018) cây trồng chịu ảnh hưởng lớn, sinh trưởng kém hơn trong lúc ở 2 thời vụ sớm hơn, giống HD11 vẫn phát triển tốt, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất thực thu của giống cao. Cụ thể, năng suất thực thu cao nhất đạt 6,53 tấn/ha (thời vụ 1), cao hơn hẳn thời vụ 3 ở mức ý nghĩa 95% (bảng 4). Điều này cho thấy, giống lúa HD11 thích hợp với gieo cấy vào vụ mùa sớm tại Hải Dương (đại diện cho vùng Đồng bằng sông Hồng). Tại điểm khảo nghiệm Thái Nguyên (đại diện cho khu vực trung du miền núi phía Bắc), giống HD11 có mức sinh trưởng và phát triển khá. Năng suất thực thu của giống HD11 đạt cao nhất (6,23 tấn/ha) ở khung thời vụ 1 (gieo vào 5/6/2018, cấy vào 15/6/2018) (bảng 4). Tóm lại, các kết quả cho thấy, HD11 thích hợp gieo cấy vào vụ mùa sớm tại các tỉnh phía Bắc nhằm tránh hiện tượng ngập úng xảy ra vào đầu vụ.

Ảnh hưởng của mật độ cấy và lượng phân bón đến canh tác giống lúa HD11 tại các tỉnh phía Bắc

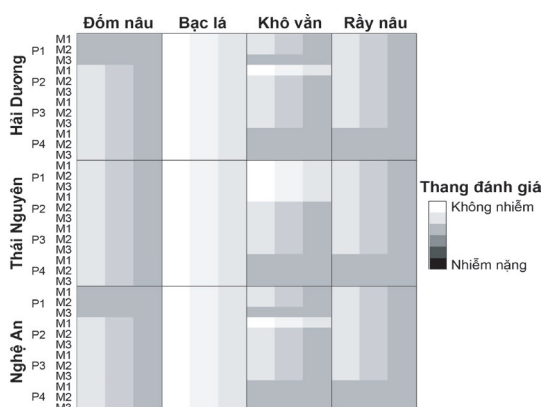
Để hoàn thiện quy trình canh tác của giống lúa HD11 tại các tỉnh phía Bắc, 3 công thức mật độ cấy và 4 công thức phân đạm đã được xây dựng dựa trên khuyến cáo trong sản xuất của địa phương. Trong nghiên cứu này, năng suất thực

thu (tấn/ha) và khả năng kháng sâu bệnh hại của giống là yếu tố được quan tâm khi phân tích các công thức mật độ cây và lượng phân đạm.

Bảng 5. Năng suất thực thu của giống lúa HD11 ở các mật độ cây và mức phân đạm.

Phân đạm	Mật độ	NSTT (tấn/ha)	Phân đạm	Mật độ	NSTT (tấn/ha)	Phân đạm	Mật độ	NSTT (tấn/ha)
<i>Hải Dương</i>			<i>Thái Nguyên</i>			<i>Nghệ An</i>		
P1	M1	4,45	P1	M1	4,25	P1	M1	4,75
	M2	5,05		M2	4,75		M2	4,85
	M3	5,23		M3	5,01		M3	5,05
P2	M1	5,57	P2	M1	5,05	P2	M1	5,20
	M2	5,88		M2	5,88		M2	5,59
	M3	6,04		M3	6,04		M3	6,00
P3	M1	6,41	P3	M1	6,01	P3	M1	6,57
	M2	6,73		M2	6,55		M2	6,79
	M3	6,25		M3	6,25		M3	6,05
P4	M1	6,05	P4	M1	6,00	P4	M1	6,20
	M2	6,27		M2	6,11		M2	6,05
	M3	5,95		M3	5,68		M3	5,68
CV (%)		6,2	CV (%)		5,8	CV (%)		6,2
LSD _{0,05} (P×M)		3,2	LSD _{0,05} (P×M)		2,5	LSD _{0,05} (P×M)		3,0

Nhìn chung, áp dụng các mức phân đạm và mật độ khác nhau đem lại năng suất khác nhau (bảng 5). Tại Hải Dương, năng suất thực thu của giống lúa HD11 trong vụ mùa đạt cao nhất là 6,73 tấn/ha với công thức P3 (1 tấn phân HCVS + 110 kg N + 100 kg P₂O₅ + 90 kg K₂O) × M2 (40 khóm/m²). Trong khi đó, ở mức phân đạm thấp nhất (P1) và mật độ cây thưa nhất (M1), năng suất thực thu của giống HD11 đạt thấp nhất, tương đương 4,45 tấn/ha. Công thức P3 × M2 cũng được kiểm chứng tại Thái Nguyên và Nghệ An cho năng suất thực thu của giống HD11 đạt tối ưu nhất (lần lượt là 6,55 và 6,79 tấn/ha).



Hình 2. Mức độ kháng/nhiễm sâu bệnh hại chính của giống lúa HD11 trong vụ mùa có sử dụng thuốc bảo vệ thực vật.

Hình 2 trình bày ảnh hưởng của mật độ cây và lượng phân đạm đến phản ứng của giống với một số loại sâu bệnh hại chính ở các điểm khảo nghiệm. Kết quả cho thấy, giống HD11 không nhiễm bạc lá (điểm 0-1) ở tất cả các công thức.

Bệnh đốm nâu có xu hướng xuất hiện trên đồng ruộng khi bố trí mật độ cây thưa (công thức P1) (điểm 3). Hiện tượng này được ghi nhận ở Hải Dương và Nghệ An (hình 2). Trong khi đó, giống HD11 có xu hướng gia tăng mức độ nhạy cảm với khô vằn và rầy nâu khi mật độ cây cao (công thức P4) (hình 2). Ở công thức P3 × M2, giống HD11 có xu hướng nhiễm nhẹ với đốm nâu, khô vằn và rầy nâu, không nhiễm bạc lá (hình 2). Vì vậy, cần chú ý chế độ sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hợp lý.

Kết luận

1. Giống lúa thuần HD11 chịu thâm canh, năng suất thực thu biến động trong khoảng 6,8-7,4 tấn/ha (vụ xuân) và 6,0-6,9 tấn/ha (vụ mùa), cao hơn so với giống BT7.

2. Giống lúa HD11 được khuyến cáo nên gieo cấy vào vụ mùa sớm tại các tỉnh phía Bắc để đảm bảo phát huy tiềm năng năng suất của giống.

3. Lượng phân bón 1 tấn phân HCVS + 110 kg N + 100 kg P₂O₅ + 90 kg K₂O/ha với mật độ cây khoảng 40 khóm/m² đem lại năng suất cao nhất cho giống HD11, nhiễm nhẹ với đốm nâu, khô vằn, rầy nâu và không nhiễm bạc lá.

Đề nghị tiếp tục nghiên cứu thời vụ gieo cấy vào vụ xuân và tiến hành các bước khảo nghiệm sản xuất cho giống lúa HD11.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu chọn tạo giống lúa có giá trị hàng hóa cao cho các vùng trồng lúa chính trong toàn quốc” thuộc Dự án Sản phẩm quốc gia lúa gạo “Công nghệ chọn tạo, sản xuất giống lúa phẩm cấp cao và kỹ thuật canh tác lúa tiên tiến đạt năng suất, chất lượng cao” do Bộ Khoa học và Công nghệ cấp kinh phí. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ và tạo điều kiện của Bộ Khoa học và Công nghệ và từ các cộng tác viên của Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2016), *Quyết định số 1898/QĐ-BNN-TT ngày 23/5/2016 phê duyệt Đề án tái cơ cấu ngành lúa gạo Việt Nam đến năm 2020 và tầm nhìn đến năm 2030*.
- [2] Trần Xuân Định, Nguyễn Như Hải, Nguyễn Văn Vương, Phạm Văn Thuyết (2015), “Kết quả điều tra, rà soát giống lúa toàn quốc 2015 phục vụ tái cấu trúc ngành lúa gạo”, *Hội thảo Quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ hai*, tr.89-104.
- [3] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2013), *Quyết định số 2765/QĐ-BNN-KHCN ngày 22/11/2013 phê duyệt Đề án khung phát triển sản phẩm quốc gia sản phẩm lúa gạo Việt Nam chất lượng cao, năng suất cao*.
- [4] L.T. Hickey, et al. (2019), “Breeding crops to feed 10 billion”, *Nature Biotechnology*, 37(7), pp.744-754.
- [5] Nguyễn Thị Lệ, Vũ Hồng Quảng, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Huệ, Nguyễn Văn Hoan, Nguyễn Chí Dũng (2014), “Kết quả chọn tạo giống lúa Bắc thơm số 7 kháng bạc lá”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12(2), tr.131-138.
- [6] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2011), *QCVN 01-55: 2011/BNNT - Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa*.

Tuyển chọn các chủng giống nấm đùi gà *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) mới nhập nội nuôi trồng trên giá thể phụ phẩm nông nghiệp

Nguyễn Duy Trinh*, Trần Thu Hà, Lê Thanh Uyên, Phạm Xuân Hội

Viện Di truyền Nông nghiệp

Ngày nhận bài 17/2/2020; ngày chuyển phản biện 20/2/2020; ngày nhận phản biện 23/3/2020; ngày chấp nhận đăng 8/5/2020

Tóm tắt:

Nấm đùi gà *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr) thuộc chi nấm *Pleurotus* được nuôi trồng phổ biến thứ ba trên thế giới, sau chi nấm mỡ (*Agaricus*) và chi nấm hương (*Lentinus*). Ở Việt Nam, là một trong sáu loại nấm chủ lực, nấm đùi gà đang nhận được nhiều sự quan tâm trong các chương trình phát triển công nghệ nông nghiệp bền vững. Nhằm mục đích tuyển chọn được giống nấm năng suất, chất lượng cao, 4 chủng giống nấm đùi gà mới nhập nội đã được đánh giá về đặc tính và đặc điểm sinh trưởng. Kết quả thu nhận được cho thấy, chủng giống E₁₁ được nhập nội từ Trung Quốc thể hiện khả năng sinh trưởng hệ sợi nhanh nhất (4,0-4,44 mm/ngày), tỷ lệ hình thành mầm quả thể nấm từ 97,7 đến 98,2% và hiệu suất sinh học (BE) đạt 61,4%. Trên các loại giá thể, sự sai khác về BE của chủng giống E₁₁ với các chủng giống khác có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Chất lượng quả thể của chủng giống E₁₁ cũng được đánh giá có sự vượt trội về hình thái, kích thước, hàm lượng protein và glucid tổng số.

Từ khóa: giá thể, nấm đùi gà, *Pleurotus eryngii*.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Chi nấm *Pleurotus* được nuôi trồng phổ biến xếp thứ ba trên thế giới, sau chi nấm mỡ (*Agaricus*) và nấm hương (*Lentinus*). Nấm đùi gà *P. eryngii* hay còn được gọi là nấm sò vua (king oyster) là một loại nấm ăn có chất lượng tốt, với hàm lượng dinh dưỡng cao và thời gian sử dụng dài hơn so với các loại nấm cùng loài khác [1]. Vào những năm 1970, nấm đùi gà bắt đầu được nuôi trồng thương mại ở Italy [2]. Sau đó được nuôi trồng rộng khắp thế giới, phát triển nhất ở các nước như Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc... Giá thể sử dụng nuôi trồng nấm *P. eryngii* khá phong phú, có thể là mùn cưa, bông phế loại, rơm rạ, bã mía, vỏ đậu tương có bổ sung thêm các chất phụ gia như cám ngô, cám gạo [3, 4]. BE của nấm *P. eryngii* phụ thuộc vào từng chủng giống và các yếu tố tác động trong quá trình nuôi trồng [3]. J'ozsef và cs (2011) [5] ghi nhận hiệu suất nuôi trồng của các chủng nấm đùi gà cao nhất đạt 156,18 và thấp nhất là 28,52%.

Ở Việt Nam, chi nấm *Pleurotus* đã được nuôi trồng từ rất lâu, tuy nhiên không như các loại nấm sò trắng (*P. florida*), nấm sò nâu (*P. sajor caju*), diện tích nuôi trồng nấm đùi gà ở Việt Nam còn rất hạn chế do yêu cầu cần có sự kiểm soát khắt khe về các điều kiện nuôi trồng như nhà xưởng, chất lượng giống, dinh dưỡng và các yếu tố ngoại cảnh khác. Bên cạnh đó, các nghiên cứu về nấm đùi gà ở nước ta cũng còn khiêm tốn. Một số nghiên cứu về chọn tạo giống nấm năng

suất, chất lượng cao cũng mới được khởi động và thực hiện trong thời gian gần đây [2]. Hiện nay, chỉ duy nhất giống nấm đùi gà E_{NH} của Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm (Viện Di truyền Nông nghiệp) được Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn công nhận và cho phép đưa vào sản xuất đại trà cùng một vài chủng nấm đùi gà mới được thu thập tuyển chọn có năng suất cao như E₂ của tác giả Nguyễn Thị Bích Thủy và cs (2019) [2].

Nhằm hướng tới đa dạng hóa các chủng giống nấm, phát triển chọn tạo nhiều giống nấm đùi gà mới phù hợp với sản xuất nấm quy mô công nghiệp theo hướng tự động hóa hoàn toàn thuộc Chương trình phát triển sản phẩm quốc gia đến năm 2020 (sản phẩm nấm ăn và nấm dược liệu), chúng tôi đã thực hiện các nghiên cứu đánh giá, tuyển chọn các nguồn gen nấm đùi gà mới nhập nội trên các loại giá thể nông nghiệp, làm cơ sở lựa chọn ra chủng giống nấm đùi gà mới có năng suất, chất lượng cao.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Chủng giống nấm

Bốn chủng giống nấm đùi gà *P. eryngii* (DC.:Fr.) mới được nhập nội ký hiệu lần lượt là E₃ (Đài Loan, Trung Quốc), E₇ (Nhật Bản), E₁₀ (Hàn Quốc) và E₁₁ (Trung Quốc). Sử dụng giống nấm đùi gà (E_{NH}) làm giống đối chứng. Các giống nấm hiện được lưu giữ, bảo quản tại Trung tâm

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenduytrinh2011@gmail.com

Selection of newly imported king oyster mushroom *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) strains cultivated on agricultural byproducts in Viet Nam

Duy Trinh Nguyen*, Thu Ha Tran, Thanh Uyen Le, Xuan Hoi Pham

Agricultural Genetics Institute

Received 17 February 2020; accepted 8 May 2020

Abstract:

King oyster mushroom *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) belonging to the genus *Pleurotus* is the third most cultivated edible mushroom in the world after button mushroom (*Agaricus*) and shiitake mushroom (*Lentinus*). In Vietnam, as one of the top six edible mushrooms, king oyster mushroom has been attracting wide attention in the agricultural technology for sustainable development program. In an attempt to search for potential strains with high yield, four newly imported strains were evaluated cultural and cultivation characteristics. Based on the obtained results, strain E₁₁ collected from China exhibited the highest mycelial growth rate (4.0 to 4.44 mm/day), primordial formation percentage from 97.7 to 98.2%, and biological efficiency at 61.4%. The substrates have a significant difference at $p < 0.05$ on the biological efficiency between E₁₁ strain and other strains. The quality of the fruiting body of E₁₁ strain was evaluated to be absolutely greater than the others in terms of morphology, size, total protein, and glucid content.

Keywords: king oyster mushroom, *Pleurotus eryngii*, substrates.

Classification number: 4.1

Nghiên cứu và phát triển nấm, Viện Di truyền Nông nghiệp ở nhiệt độ 4°C trên môi trường PDA gồm 200 g/l khoai tây, 20 g/l dextrose, 20 g/l agar.

Chuẩn bị giống nấm

Các chủng giống nấm đùi gà được nhân nuôi trên giá thể gồm 79% mùn cưa, 20% cám gạo và 1% bột nhẹ, nhiệt độ ươm sợi 25±1°C, độ ẩm 65% và không cần ánh sáng trong thời gian 30 ngày.

Chuẩn bị giá thể nuôi trồng

Ba loại nguyên liệu là mùn cưa, bông hạt, rơm rạ được sử dụng để phối trộn tạo nên 2 loại giá thể nuôi trồng nấm đùi gà. Loại giá thể thứ nhất gồm mùn cưa, bông hạt (SD+CH=1:1) và bổ sung 15% cám gạo, 1% bột CaCO₃. Loại giá thể thứ hai gồm mùn cưa, rơm rạ (SD+SR=1:1) và bổ sung 15% cám gạo, 1% bột CaCO₃. Sử dụng máy Exotek MC-410 để chuẩn ẩm độ giá thể nuôi trồng nấm đùi gà bằng 65%, sau đó giá thể được cho vào lọ nhựa PP (1100 ml) và hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 180 phút. Khi nhiệt độ của giá thể giảm xuống dưới 28°C thì tiến hành cấy giống, lượng giống nấm đùi gà sử dụng là 15 g/lọ. Các lọ phối được nuôi sợi ở nhiệt độ 25±1°C trong điều kiện tối hoàn toàn để hệ sợi nấm sinh trưởng.

Chăm sóc và thu hái quả thể

Sau khi hoàn thành pha sợi, các bịch phối được đưa vào nhà nuôi nấm được kiểm soát về nhiệt độ (19±2°C), độ ẩm (85-90%), cường độ ánh sáng (250 lux), nồng độ khí cacbonic (dưới 1000 ppm) [3, 5-7]. Quả thể nấm đùi gà sẽ được thu hái khi mũ nấm phẳng và có màu sáng.

Các chỉ tiêu theo dõi

Tốc độ sinh trưởng hệ sợi: tốc độ sinh trưởng hệ sợi của nấm đùi gà được đánh giá theo phương pháp của Nguyễn Thị Bích Thùy và cs (2016) [8]. Đơn vị tính: mm/ngày.

Thời gian hình thành mầm quả thể: là thời gian từ khi cấy giống đến khi mầm quả thể nấm đùi gà đầu tiên được hình thành trên giá thể. Đơn vị tính: ngày.

Tỷ lệ hình thành quả thể: là % số lượng lọ phối cấy giống nấm đùi gà có khả năng hình thành mầm quả thể nấm. Đơn vị tính: %.

Thời gian quả thể trưởng thành: là thời gian từ khi mầm quả thể nấm đùi gà đầu tiên được hình thành đến lần thu hái quả thể đầu tiên. Đơn vị tính: ngày.

Số lượng mầm quả thể: là số lượng quả thể nấm đùi gà được hình thành trên 1 lọ giá thể.

Số lượng quả thể hữu hiệu: số lượng quả thể nấm đùi gà hữu hiệu được xác định theo phương pháp của Won và cs (2010) [9], là số lượng quả thể nấm đùi gà có khối lượng >10 g.

BE(%): hiệu suất sinh học nuôi trồng nấm đùi gà được tính theo công thức của Moonmoon và cs (2010) [10].

$$BE = \frac{M_1}{M_2} \times 100\%$$

Trong đó: M_1 là khối lượng quả thể nấm tươi (gam); M_2 là khối lượng giá thể khô (giá thể đạt độ ẩm 13%) (g).

Đặc điểm phát triển quả thể: đánh giá các chỉ tiêu về đường kính mũ nấm (cm), đường kính cuống nấm (cm), chiều dài quả thể (cm) [10]. Tỷ lệ quả thể dị dạng (%) được đánh giá theo phương pháp của Won và cs (2010) [9], là tỷ lệ quả thể nấm đùi gà xuất hiện những bất thường về hình thái như không hình thành mũ nấm; mũ nấm, cuống nấm biến dạng.

Chất lượng quả thể: trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá chất lượng quả thể của các chủng nấm đùi gà mới dựa trên kết quả phân tích các chỉ tiêu hàm lượng glucid, hàm lượng protein tổng số và hàm lượng lipid tổng số. Trong đó, hàm lượng glucid tổng số được phân tích theo phương pháp KN/QTKT-10.3, hàm lượng protein tổng số được phân tích theo phương pháp KN/QTKT-10.1, hàm lượng lipid tổng số được phân tích theo phương pháp KN/QTKT-10.2 của Viện Thực phẩm chức năng.

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm excel 2010 và phân tích Anova bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 tại mức ý nghĩa $p < 0,05$ cho thí nghiệm một nhân tố. Các giá trị trung bình mang chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê.

Kết quả nghiên cứu

Tốc độ sinh trưởng

Pleurotus được biết đến là chi nấm có khả năng phân giải tốt nhất các loại vật liệu có chứa cellulose, hemicellulose hay lignin [11]. Khả năng phân giải và hấp thụ dinh dưỡng thể hiện tốc độ sinh trưởng và phát triển của một giống nấm và chịu sự chi phối của yếu tố nội tại (giống nấm), yếu tố ngoại cảnh (môi trường sống), trong đó cơ chất nền hay thành phần giá thể nuôi trồng là nhân tố hàng đầu.

Bảng 1. Sinh trưởng của các chủng giống nấm đùi gà *P. eryngii* trên các loại giá thể.

	Giá thể 1: mùn cưa, bông hạt					Giá thể 2: mùn cưa, rơm rạ				
	E_{NH}	E_3	E_7	E_{10}	E_{11}	E_{NH}	E_3	E_7	E_{10}	E_{11}
TDHS	3,52±0,15 ^a	3,6±0,04 ^a	4,22±0,14 ^a	4,0±0,04 ^a	4,44±0,02 ^a	3,67±0,03 ^b	3,72±0,05 ^b	3,96±0,06 ^b	3,92±0,14 ^b	4,0±0,11 ^a
THTQT	41±1,0 ^b	40±0,0 ^b	40±1,0 ^b	48±1,0 ^b	38±1,0 ^b	42±0,0 ^b	42±1,0 ^b	43±1,0 ^b	47±1,0 ^b	39±1,0 ^b
TLHTQT	95,6±1,9 ^a	98,2±0,4 ^a	97,8±0,3 ^a	90,4±1,1 ^a	97,7±1,1 ^a	94,6±1,1 ^b	97,4±1,6 ^b	97,2±0,6 ^b	89,6±0,9 ^c	98,2±0,9 ^a
TQTT	7±0,0 ^a	6±0,0 ^a	6±1,0 ^a	10±1,0 ^a	8±1,0 ^a	6±0,0 ^a	6±1,0 ^a	6±1,0 ^a	12±1,0 ^a	8±0,0 ^a

Ghi chú: TDHS: tốc độ sinh trưởng hệ sợi (mm/ngày); THTQT: thời gian hình thành mầm quả thể (ngày); TLHTQT: tỷ lệ hình thành quả thể (%); TQTT: thời gian quả thể trưởng thành (ngày); các chữ a, b, c, d ứng với mỗi giá trị sai khác giữa các giá trị trung bình tại mức ý nghĩa $p < 0,05$.

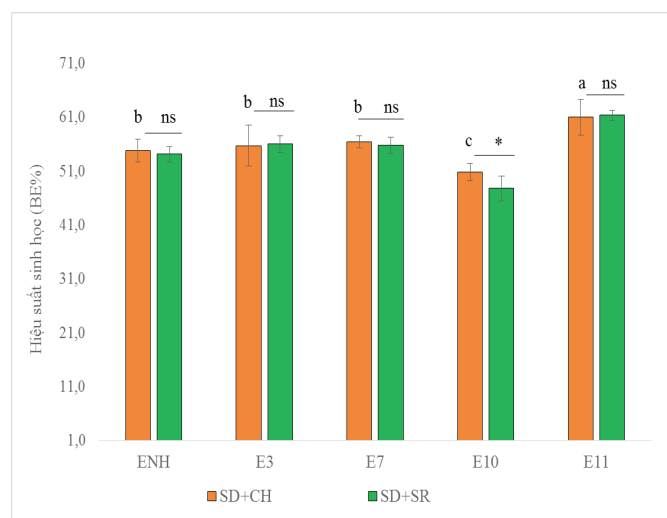
Bảng 1 cho thấy, trên giá thể mùn cưa, bông hạt, tốc độ sinh trưởng hệ sợi của chủng E_7 và E_{11} cao nhất, lần lượt là 4,22 và 4,44 mm/ngày, tiếp đến là chủng E_{10} , chậm nhất là hai chủng E_{NH} (3,52 mm/ngày) và E_3 (3,60 mm/ngày). Trên giá thể mùn cưa, rơm rạ ba chủng E_7 , E_{10} , E_{11} có tốc độ sinh trưởng hệ sợi tương tự nhau và khác biệt ở mức có ý nghĩa $p < 0,05$.

Thời gian hình thành mầm quả thể nấm của các chủng nấm đùi gà cũng có sự sai khác. Chủng E_{11} có thời gian hình thành quả thể sớm nhất, trung bình 38-39 ngày, giống E_{NH} , E_3 , E_7 có thời gian hình thành quả thể dao động từ 40 đến 43 ngày ở cả hai loại giá thể. Chủng E_{10} thời gian ra quả thể muộn nhất (47-48 ngày sau khi cấy giống).

Tỷ lệ hình thành quả thể của các chủng nấm đùi gà mới cũng được xác định với khả năng hình thành mầm quả thể đạt tỷ lệ cao nhất ở giống E_3 , E_7 và E_{11} (đều cao hơn 97% ở cả hai loại giá thể sử dụng). Chủng E_{NH} có tỷ lệ hình thành quả thể đứng thứ hai (94,6-95,6%). Chủng E_{10} có tỷ lệ hình thành quả thể thấp nhất, trung bình có 89,6-90,4% lọ giá thể có khả năng hình thành mầm quả thể.

Thời gian quả thể trưởng thành của chủng E_{10} dài nhất (10-12 ngày), chủng E_3 , E_7 có thời gian quả thể nấm trưởng thành ngắn nhất (6 ngày từ khi mầm quả thể hình thành). Thời gian trưởng thành của chủng E_{11} là 8 ngày, sai khác có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ ở cả 2 giá thể nghiên cứu. Sinh trưởng hệ sợi của các chủng giống nấm đùi gà mới trên hai loại giá thể nuôi trồng không có khác biệt có ý nghĩa thống kê.

BE



Hình 1. BE các chủng giống nấm đùi gà *P. eryngii* trên SD+CH và SD+SR. Các chữ cái a, b, c ứng với mỗi giá trị sai khác giữa các giá trị trung bình khác nhau ở $p < 0,05$. *: là sự sai khác có ý nghĩa thống kê; ns: là sự sai khác không có ý nghĩa thống kê.

Hình 1 thể hiện BE của các chủng *P. eryngii* trên hai loại giá thể SD+CH và SD+SR. Trên giá thể SD+CH, BE cao nhất được ghi nhận ở chủng E₁₁ (61,4%), BE của E₃, E₇ tương đương với giống E_{NH} lần lượt là 55,7, 56,4 và 54,8%. BE của chủng E₁₀ thấp đáng kể so với chủng E₁₁ và chủng đối chứng E_{NH} (50,8%). Trên giá thể SD+SR, BE cao nhất được tìm thấy ở chủng giống E₁₁ (61,4%), tiếp theo là chủng E₃ (56,0%) và E₇ (55,8%), thấp nhất là chủng E₁₀ (47,8%). Kết quả này có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa p<0,05.

Đặc điểm phát triển quả thể

Bảng 2. Đặc điểm quả thể của các chủng nấm đùi gà *P. eryngii* trên các loại giá thể.

	Giá thể 1: mùn cưa, bông hạt					Giá thể 2: mùn cưa, rơm rạ				
	E _{NH}	E ₃	E ₇	E ₁₀	E ₁₁	E _{NH}	E ₃	E ₇	E ₁₀	E ₁₁
CDQT	14,2±0,5 ^a	14,9±0,3 ^b	15,9±2,3 ^b	9,6±0,7 ^c	17,8±1,2 ^a	14,5±0,8 ^a	14,6±0,6 ^a	16,2±1,2 ^a	10,2±1,6 ^c	14,2±0,3 ^a
DKC	4,05±0,08 ^a	4,25±0,22 ^b	4,65±0,2 ^a	2,34±0,33 ^c	4,15±0,0 ^b	3,93±0,06	4,1±0,1 ^b	4,04±0,08 ^a	2,56±0,22 ^c	4,45±0,12 ^a
DKM	4,12±0,12 ^b	4,01±0,12 ^c	4,34±0,22 ^a	2,46±0,12 ^c	3,87±0,2 ^d	3,92±0,15 ^c	4,22±0,11 ^b	3,95±0,08 ^a	2,66±0,21 ^c	4,23±0,22 ^a
SLQTHH	2,6±0,4 ^b	2,8±0,2 ^a	2,2±0,0 ^b	1,6±0,1 ^c	3,0±0,3 ^a	2,5±0,3 ^c	2,7±0,2 ^b	2,4±0,1 ^c	1,4±0,1 ^d	2,9±0,1 ^a
TLDD	7,2±0,2 ^a	6,4±0,3 ^d	7±0,4 ^c	10,2±0,4 ^a	5,6±0,4 ^d	7,1±0,1 ^b	6±0,0 ^a	6,7±0,2 ^c	9,8±0,1 ^a	5,3±0,2 ^c

Ghi chú: CDQT: chiều dài quả thể (cm); DKC: đường kính cuống nấm (cm); DKM: đường kính mũ nấm (cm); SLQTHH: số lượng quả thể hữu hiệu (>10 g); TLDD: tỷ lệ dị dạng (%). Các chữ a, b, c, d, e ứng với mỗi giá trị sai khác giữa các giá trị trung bình tại mức ý nghĩa p<0,05.

Bảng 2 miêu tả chất lượng quả thể của giống nấm đùi gà nuôi trồng trên 2 loại cơ chất tổng hợp mùn cưa, bông hạt và mùn cưa, rơm rạ. Nhận thấy trên giá thể SD+CH, E₇ và E₁₁ là 2 chủng giống có chiều dài quả thể lớn nhất và có sự khác biệt đối với các chủng nấm khác ở mức ý nghĩa p<0,05; đường kính cuống của chủng giống E₇ lớn nhất. Chủng nấm E₁₀ có chiều dài quả thể và đường kính cuống nhỏ nhất ở cả hai loại giá thể SD+CH và SD+SR.

Đường kính mũ nấm của các chủng giống đùi gà có sự thay đổi đáng kể (bảng 2, hình 2), chủng E₇ có đường kính mũ nấm lớn nhất ở giá thể SD+CH và có sự sai khác ở mức ý nghĩa p<0,05 đối với các chủng giống khác. Trên giá thể SD+SR, E₁₁ là chủng giống có đường kính mũ nấm lớn nhất (4,23 cm). Ở cả hai loại giá thể, số lượng quả thể hữu hiệu lớn nhất thuộc về chủng E₁₁ (2,9 đến 3,0 quả/lọ giá thể), nhỏ nhất là ở chủng giống E₁₀ (1,4 và 1,6%). Tỷ lệ quả thể dị dạng của các giống nấm đùi gà từ 5,3 đến 10,2%, trong đó chủng giống E₁₁ có tỷ lệ quả thể dị dạng thấp nhất ở cả SD+CH và SD+SR và thấp hơn có ý nghĩa đối với các giống nấm khác. Chủng giống E₁₀ có tỷ lệ quả thể dị dạng lớn nhất, trung bình 10%.



Hình 2. Hình thái quả thể của các chủng giống nấm đùi gà (*P. eryngii*) nuôi trồng trên giá thể SD+CH.

Chất lượng quả thể

Ngoài các tiêu chí đánh giá về hình thái, kích thước quả thể nấm, trong nghiên cứu này chúng tôi còn đi sâu so sánh chất lượng quả thể của các chủng nấm đùi gà mới thông qua phân tích hàm lượng protein, lipid và glucid tổng số, kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng dinh dưỡng của quả thể các chủng giống nấm đùi gà *P. eryngii* trên các giá thể.

	Giá thể 1: mùn cưa + bông hạt			Giá thể 2: mùn cưa + rơm rạ		
	Protein tổng số (%)	Lipid tổng số (%)	Glucid (%)	Protein tổng số (%)	Lipid tổng số (%)	Glucid (%)
E _{NH}	1,8±0,10 ^a	0,02±0,00 ^c	4,17±0,17 ^b	2,0±0,00 ^c	0,02±0,01 ^b	1,68±0,11 ^d
E ₃	1,8±0,20 ^a	0,10±0,05 ^b	5,1±0,11 ^a	2,2±0,10 ^b	0,10±0,03 ^a	5,9±0,45 ^a
E ₇	1,8±0,20 ^a	0,03±0,01 ^c	3,27±0,10 ^c	2,4±0,10 ^a	0,04±0,00 ^b	4,16±0,14 ^c
E ₁₀	1,4±0,00 ^b	0,15±0,02 ^a	2,12±0,01 ^d	1,2±0,00 ^d	0,11±0,02 ^a	2,07±0,05 ^d
E ₁₁	2,0±0,10 ^a	0,02±0,00 ^c	5,18±0,14 ^a	2,0±0,00 ^c	0,10±0,01 ^a	5,5±0,16 ^b

Ghi chú: các chữ a, b, c, d ứng với mỗi giá trị sai khác giữa các giá trị trung bình tại mức ý nghĩa p<0,05.

Kết quả bảng 3 cho thấy có sự sai khác về hàm lượng glucid, protein, lipid giữa các chủng giống nấm đùi gà mới. Trên giá thể SD+CH ghi nhận, chủng giống E₁₁, E₃, E₇ có hàm lượng protein cao nhất và tương đương với đối chứng E_{NH}. Hàm lượng glucid tổng số của chủng E₁₁ và E₃ sai khác có ý nghĩa p<0,05 so với các chủng nấm còn lại, lần lượt là 5,18 và 5,1%. E₁₀ là chủng nấm có hàm lượng protein và glucid thấp nhất. Ngược lại, chủng E₁₀ lại có hàm lượng lipid tổng số cao nhất (0,15%) và khác biệt có ý nghĩa với các chủng khác. Các chủng E₇ và E₁₁ có hàm lượng lipid tương đương với đối chứng E_{NH}. Trên giá thể SD+SR, hàm lượng protein cao nhất cũng được xác định ở chủng E₇. Chủng E₁₁ có hàm lượng protein tương đương với chủng E_{NH} (2,0%) và có hàm lượng glucide tổng số bằng 5,5%, xếp thứ hai sau chủng E₃. Hàm lượng lipid tổng số có sự thay đổi so với trên giá thể SD+CH, chủng E₃, E₁₀, E₁₁ đều có hàm lượng lipid cao hơn có ý nghĩa so với giống đối chứng E_{NH}.

Kết quả tại bảng 3 cũng cho thấy không có sự sai khác đáng kể về hàm lượng dinh dưỡng của quả thể nấm đùi gà khi nuôi trồng trên các loại giá thể khác nhau.

Thảo luận

Mùn cưa, bông hạt, rom rạ là những loại phụ phẩm nông nghiệp được sử dụng khá phổ biến trong nuôi trồng nấm ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 2 loại giá thể tổng hợp để nuôi trồng 4 chủng giống nấm đùi gà khác nhau. Chủng giống E_{11} được ghi nhận là chủng giống có tốc độ sinh trưởng hệ sợi cao hơn so với ba chủng nấm còn lại. Tốc độ mọc sợi của chủng E_{11} dao động từ 4,0 đến 4,44 mm/ngày. Đồng thời, tốc độ sinh trưởng hệ sợi của 4 chủng giống thí nghiệm khi nuôi trồng trên giá thể mùn cưa, bông hạt vượt trội hơn trên giá thể rom rạ, bông hạt. Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Philippousis và cs (2002) [12] khi cho rằng thời gian sinh trưởng của các chủng nấm khác nhau tùy thuộc vào kiểu gen và giá thể nuôi trồng.

Thời gian hình thành mầm quả thể của các chủng giống đùi gà mới cũng có sự sai khác có ý nghĩa. E_{11} vẫn được ghi nhận là chủng giống có thời gian hình thành mầm quả thể nhanh nhất, trung bình 38-39 ngày. Ngược lại chủng nấm E_{10} mặc dù có tốc độ sinh trưởng hệ sợi nhanh nhưng thời gian hình thành quả thể lại chậm nhất. Một kết quả tương tự cũng đã được Iqbal và cs (2018) [13] trình bày trong công bố của mình. Nhóm tác giả này so sánh hai chủng nấm đùi gà (ký hiệu là P_9 và P_{10}) ở 5 loại giá thể khác nhau. Kết quả cho thấy, P_{10} có tốc độ mọc sợi nhanh nhất ở giá thể 100% bông hạt, tuy nhiên thời gian hình thành mầm quả thể của P_{10} ở giá thể 100% bông hạt lại chậm hơn so với giá thể 75% bông hạt và 25% rom. Kết quả này lần nữa khẳng định khả năng sinh trưởng và hình thành quả thể của các chủng giống nấm nói chung và giống nấm đùi gà nói riêng chịu sự chi phối mạnh mẽ từ yếu tố kiểu gen [14].

Thời gian quả thể trưởng thành của chủng nấm đùi gà được Kirbag và Akyuz (2008) [15] nghiên cứu với khoảng dao động từ 34,7 đến 54,8 ngày kể từ khi cấy giống và phụ thuộc vào thành phần cơ chất. Kết quả của nghiên cứu này cũng tương tự khi xác định thời gian trưởng thành quả thể của các chủng giống nấm đùi gà mới từ khi cấy giống đến khi thu hoạch trong khoảng 47-59 ngày. Trong đó, E_{10} có thời gian quả thể trưởng thành dài nhất, giữa các chủng E_{NH} , E_3 , E_7 , E_{11} không có sự sai khác có ý nghĩa khi thay đổi thành phần giá thể nuôi trồng ở $p < 0,05$. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Moonmoon và cs (2010) [10] khi nuôi trồng các chủng nấm đùi gà mới trên giá thể mùn cưa và rom rạ tại Bangladesh, khi đó thời gian quả thể trưởng thành của chủng giống nấm đùi gà Pe-3 là 47 ngày sau khi cấy giống.

Số lượng mầm quả thể hữu hiệu được xác định từ 1,4 đến 3,0 và không có sự sai khác ý nghĩa thống kê giữa chủng giống E_{11} và đối chứng E_{NH} . Nuôi trồng các chủng giống nấm đùi gà trên hai loại giá thể cũng không mang đến sự sai khác có ý nghĩa thống kê về số lượng mầm quả thể ở mức ý nghĩa $p < 0,05$. Nghiên cứu của Amin và cs (2007) [16], Jawad và cs (2013) [17] cũng không tìm thấy sự thay đổi đáng kể nào về số lượng quả thể nấm đùi gà nuôi trồng trên hai loại giá thể mùn cưa và rom rạ. Trong khi đó, Moonmoon và cs (2010) [10] lại cho rằng, số lượng quả thể nấm đùi gà nuôi trồng trên giá thể mùn cưa cao hơn đáng kể khi nuôi trồng trên giá thể rom rạ và sự sai khác này có ý nghĩa ở độ tin cậy $p < 0,05$.

BE của các chủng nấm đùi gà mới trên giá thể SD+CH và SD+SR là từ 47,8 đến 61,4% và chủng giống E_{11} có hiệu suất cao nhất đạt 61,4%. Kết quả này phù hợp với công bố của Atila (2019) [18] khi nuôi trồng 3 chủng nấm đùi gà K-16, K-20 và M-18 trên 3 loại giá thể tổng hợp gồm mùn cưa (tỷ lệ 80%) và bột hướng dương, bã thải nho, vỏ quả óc chó đã xác định BE dao động từ 28,9 đến 68,8%. Kirbag và Akyuz (2008) [15] nuôi trồng nấm đùi gà (*P. eryngii* Q:Fr) trên 6 loại giá thể tổng hợp được phối trộn từ rom lúa mì (W), vỏ đậu tương (S), thân cây ngô (C), thân cây đậu tương (B), thân cây kê (M), thân cây bông (P) và cám gạo (RB) cho hiệu suất cao nhất là 82,5% trên giá thể thân lúa mì và thân cây kê, thấp nhất là 48,0% trên giá thể thân lúa mì. Công bố của Hassan và cs (2010) [3] cũng chỉ ra rằng, BE khi nuôi trồng nấm đùi gà trên giá thể mùn cưa, bã mía dao động từ 45,71 đến 65,22%. Chủng giống Pe-1 của Moonmoon và cs (2010) [10] được tìm thấy hiệu suất BE dao động từ 62,6 đến 73,5% khi nuôi trồng trên hai loại giá thể là mùn cưa và rom rạ. 3 chủng nấm đùi gà *P. eryngii* B₁₁₂, B₀₁₂, B₀₄₅ là các chủng giống lai tạo từ các monokaryon phân lập từ chủng ATCC 36047 và Holland 150 của Peng và cs (2001) [7] có BE từ 59,37 đến 77,87% khi nuôi trồng trên giá thể mùn cưa có bổ sung 15% cám gạo. Hay công bố của tác giả Nguyễn Thị Bích Thủy và cs (2016, 2019) [2, 8] về chủng giống đùi gà ký hiệu E_1 và E_2 có BE lần lượt là 59,4 và 54,37%.

Chất lượng quả thể các chủng nấm đùi gà *P. eryngii* trong nghiên cứu này được đánh giá tương đương với chất lượng của các chủng nấm *P. eryngii* khác đã được công bố và chất lượng quả thể của các chủng giống nấm đùi gà bị thay đổi bởi giá thể nuôi trồng [2]. Theo Mazzi và cs (2004) [19], nấm đùi gà có hàm lượng protein dao động từ 1,88 đến 2,65%. Rodrigues và cs (2015) [20] xác định hàm lượng đường, protein, chất béo trong nấm đùi gà lần lượt là 5,45, 1,36 và 0,29%. Tương tự Reis và cs (2012) [21] cũng công bố giá trị dinh dưỡng của nấm đùi gà *P. eryngii* gồm hàm lượng protein 1,21%, đường 8,95% và lipid là 0,15%.

Kết luận

Sự khác nhau về khả năng sinh trưởng, năng suất và chất lượng của các chủng nấm đùi gà *P. eryngii* được quy định bởi đặc tính sinh học của mỗi chủng nấm (kiểu gen). Chủng giống E₁₁ cho thấy nhiều đặc điểm sinh trưởng, phát triển vượt trội. Với đặc điểm sinh trưởng hệ sợi khỏe, thời gian hình thành mầm quả thể ngắn (38-39 ngày), số lượng quả thể hữu hiệu đạt 2,9-3,0 quả/lọ và BE 60,0-61,4%, chủng giống nấm đùi gà E₁₁ (có nguồn gốc từ Trung Quốc) được nhận định là chủng giống nấm triển vọng, đáp ứng đầy đủ các tiêu chí của một giống nấm thương mại có năng suất và chất lượng cao và phù hợp với điều kiện nuôi trồng ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Lewinsohn, et al. (2002), "The *Pleurotus eryngii* species complex in Israel: distribution and morphological description of a new taxon", *Mycotaxon*, **81**, pp.51-67.
- [2] Nguyễn Thị Bích Thùy, Ngô Xuân Nghiễn, Lê Văn Vê, Nguyễn Thị Luyện, Nguyễn Thị Huyền Trang, Phan Thu Huy (2019), "Sinh trưởng hệ sợi và hình thành quả thể của nấm sò vua *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) chủng E₂", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **61**(7), tr.39-44.
- [3] F.R.H. Hassan, et al. (2010), "Cultivation of the king oyster Mushroom (*Pleurotus eryngii*) in Egypt", *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **4**(1), pp.99-105.
- [4] A. Li, et al. (2014), "Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology", *Int. J. Biol. Macromol.*, **65**, pp.28-32.
- [5] S. J'ozsef, et al. (2011), "Comparative studies on the cultivation and phylogenetics of king oyster Mushroom (*Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qu'el.) strains", *Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment*, **3**, pp.18-34.
- [6] J.S. Ryu, et al. (2007), "The growth characteristics of *Pleurotus eryngii*", *The Korean Journal of Mycology*, **1**(35), pp.47-53.
- [7] J.T. Peng, et al. (2001), "Selection and breeding of king oyster mushroom", *Journal of Agricultural Research of China*, **50**(4), pp.43-58.
- [8] Nguyễn Thị Bích Thùy, Ngô Xuân Nghiễn, Nguyễn Thế Thắng, Trần Đông Anh, Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Văn Giang, Trần Thị Đào (2016), "Đánh giá sinh trưởng và năng suất của nấm sò vua (*Pleurotus eryngii*) (DC.:Fr.) Quel trên nguyên liệu nuôi trồng khác nhau", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **14**, tr.816-823.
- [9] S.Y. Won, et al. (2010), "Optimum CO₂ concentration for Fruit-body formation and yield of *Pleurotus ferulae* mushroom in the growing facility for bottle cultivation", *Journal of Bio-Environment Control*, **19**(2), pp.77-81.
- [10] M. Moonmoon, et al. (2010), "Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh", *Saudi Journal of Biological Sciences*, **17**, pp.341-345.
- [11] E. Baysal, et al. (2003), "Cultivation of oyster mushroom on waster paper with some added supplementary materials", *Technology*, **89**, pp.95-97.
- [12] A. Philippoussis, et al. (2002), *Monitoring of mycelium growth and fructification of lentinula edodes on several lignocellulosic residues*, Mushroom Biology and Mushroom Products UAEM Cuernavaca Mexico.
- [13] W. Iqbal, et al. (2018), "Optimization of King oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) production against cotton waste and fenugreek straw", *Pak. J. Phytopathol.*, **31**(2), pp.149-154.
- [14] S.M. Ayodele, E.O. Akpaja (2007), "Yield evaluation of *Lentinus squarosulus* (Mont) sing on selected sawdust of economic tree species supplemented with 20% oil palm fruit fibers", *Asian J. Plant Sci.*, **6**(7), pp.1098-1102.
- [15] S. Kirbag, M. Akyuz (2008), "Effect of various agro-residues on growing periods, yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*", *J. Food Agric. Environ.*, **6**, pp.402-405.
- [16] S.M. Amin, et al. (2007), "Effect of different substrates on the growth and yield of five selected oyster mushrooms", *Bangladesh J. Mushroom*, **1**, pp.21-25.
- [17] A. Jawad, et al. (2013), "Effect of different substrate supplements on oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) production", *Food Science and Technology*, **1**(3), pp.44-51.
- [18] F. Atila (2019), "Yield and fruit body properties of *Pleurotus eryngii* isolates grown on poplar sawdust supplemented with different additive materials", *The Journal of Fungus*, **10**, pp.106-113.
- [19] P. Manzi, et al. (2004), "Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking", *Food Chem.*, **84**(2), pp.201-206.
- [20] D.M.F. Rodrigues, et al. (2015), "Chemical composition and nutritive value of *Pleurotus citrinopileatus* var *cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. salmoneo stramineus*, *Pholiota nameko* and *Hericium erinaceus*", *J. Food Sci. Technol.*, **52**, pp.6927-6939.
- [21] F.S. Reis, et al. (2012), "Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study", *Food and Chemical Toxicology*, **50**(2), pp.191-197.

Hoạt tính kháng nấm của nano bạc đối với một số nấm gây bệnh trên cây trồng trong điều kiện *in vitro*

Công Hồng Hạnh^{1*}, Nguyễn Hồng Nhung¹, Trần Thị Hương¹, Trần Quế Chi¹, Phạm Duy Khánh¹,
Kartsko Larisa Alexandrovna², Shukanov Vladimir Petrovich², Hoàng Anh Sơn¹

¹Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Thực nghiệm Thực vật V.F. Kuprevich, Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Belarus

Ngày nhận bài 30/6/2020; ngày gửi phản biện 3/7/2020; ngày nhận phản biện 30/7/2020; ngày chấp nhận đăng 5/8/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu này thực hiện đánh giá trong điều kiện *in vitro* trên môi trường PDA hoạt tính kháng nấm của dung dịch nano bạc đối với một số loài nấm gây bệnh phân lập được từ cây gừng (đốm lá - *P. zingerberis*, héo vàng - thối củ - *F. oxysporum*), cây ớt (thán thư - *Colletotrichum* spp.), cây lúa mì, lúa mạch (đốm lá - *Alternaria* spp., thối rễ - *H. teres*). Kết quả nghiên cứu cho thấy, nano bạc ở các nồng độ khác nhau, đối với các loại nấm khác nhau có hoạt tính kháng nấm ở các mức độ khác nhau. Nano bạc nồng độ 60 ppm có hoạt tính kháng nấm *P. zingerberis* đạt 39,5%, kháng nấm *F. oxysporum* đạt 48,5%. Nano bạc nồng độ 40 ppm ức chế 59,4% sự phát triển của nấm *Colletotrichum* spp. Hoạt tính kháng nấm *H. teres* của nano bạc nồng độ 50 và 100 ppm đều đạt 53,3%, nấm *Alternaria* spp. lần lượt là 27,8 và 33,3%. Như vậy, theo kết quả thu được từ phòng thí nghiệm, có thể sử dụng dung dịch nano bạc để phòng và trị một số bệnh do nấm gây ra đối với cây trồng.

Từ khóa: *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *F. oxysporum*, hiệu lực kháng nấm, *H. teres*, nano bạc, *P. zingerberis*.

Chỉ số phân loại: 4.1

Giới thiệu

Nông nghiệp là ngành kinh tế quan trọng của Việt Nam, trong đó lĩnh vực trồng trọt những năm gần đây đã gặt hái thành công ở nhiều mặt hàng, đảm bảo đáp ứng nhu cầu của người dân trong nước cũng như nâng cao kim ngạch xuất khẩu. Đặc biệt, các cây gia vị như gừng, ớt ở nước ta có tiềm năng xuất khẩu rất lớn, mang lại thu nhập, góp phần xoá đói giảm nghèo cho bà con nông dân những xã vùng cao.

Tuy nhiên, trong quá trình gieo trồng cũng như bảo quản sau thu hoạch có sự xuất hiện của các tác nhân gây bệnh, gây thiệt hại nặng nề đến năng suất và hiệu quả kinh tế. Trong số đó phải kể đến nấm bệnh, tác nhân của hầu hết các loại bệnh hại cho cây trồng, gây ra các triệu chứng thối rễ, thối gốc thân, thối thân, khô vằn, thối lá. Theo ước tính, thiệt hại do nấm bệnh lên tới 11,6% tổng sản lượng nông nghiệp, tương đương hàng ngàn tỷ đồng bị thất thu mỗi năm do nấm bệnh. Việc tìm ra các chế phẩm có khả năng diệt nấm bệnh, an toàn cho người sử dụng và môi trường luôn được các nhà khoa học trên thế giới và trong nước đặc biệt quan tâm [1, 2].

Hiện nay, công nghệ nano có thể mở ra nhiều hướng ứng dụng trong lĩnh vực công nghệ sinh học, nông nghiệp và thực phẩm [3]. Nhờ vào hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm cao, hạt nano bạc đã và đang thu hút được nhiều sự chú

ý, đầu tư trong nghiên cứu và ứng dụng loại vật liệu này [4]. Các chế phẩm nano bạc-chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ có hiệu lực ức chế nấm *Phytophthora capsici* lên đến 100% tại nồng độ 40 ppm với kích thước hạt 5 nm [5]. Vật liệu nano Ag/CTS/bentonite ở nồng độ bạc 400 ppm có hiệu quả ức chế nấm *Rhizoctonia solani* đạt 92,82% và nấm *F. oxysporum* đạt 66,70% [6]. Nano bạc dạng keo kích thước trung bình 52 nm ở nồng độ 180 ppm đã ức chế trên 90% sự phát triển của nấm *Phomopsis* sp. trên hạt đậu tương [7].

Các nhà khoa học cho rằng, khả năng ức chế của dung dịch nano bạc đối với sự phát triển của nấm bệnh là nhờ sự chuyển hóa từ Ag^0 thành ion Ag^+ tấn công đồng thời nhiều vị trí trong tế bào vi sinh vật, vô hiệu hóa các tổ chức chức năng quan trọng trong tế bào, làm ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp thành tế bào, quá trình vận chuyển các chất qua màng, tổng hợp và dịch mã axit nucleic (RNA, DNA), tổng hợp protein cũng như vận chuyển điện tử qua màng. Ion bạc có ái lực mạnh đối với các nhóm chức mang điện tích âm trên phân tử sinh học, đó là các nhóm -SH, -COOH, PO_4^{3-} và các nhóm chức tích điện âm khác phân bố khắp trong tế bào vi sinh vật [8, 9]. Chính phản ứng liên kết đó đã làm thay đổi cấu trúc của các đại phân tử, làm chúng trở nên mất tác dụng trong tế bào.

Hiện nay, tại huyện Hà Quảng, Cao Bằng, với mục tiêu

*Tác giả liên hệ: Email: hanhcong9389@gmail.com

Antifungal activity of silver nanoparticles against phytopathogenic fungi *in vitro*

Hong Hanh Cong^{1*}, Hong Nhung Nguyen¹,
Thi Huong Tran¹, Que Chi Tran¹, Duy Khanh Pham¹,
Kartsko Larisa Alexandrovna²,
Shukanov Vladimir Petrovich², Anh Son Hoang¹

¹Institute of Materials Science,
Vietnam Academy of Science and Technology

²V.F.Kuprevich Institute of Experimental Botany,
National Academy of Sciences of Belarus

Received 30 June 2020; accepted 5 August 2020

Abstract:

In this study, the antifungal activity of silver nano solution against some phytopathogenic fungi, which were isolated from ginger (*P. zingerberis*, *F. oxysporum*), chili (*Colletotrichum* spp.), and wheat, barley (*Alternaria* spp., *H. teres*) was carried out *in vitro* by using PDA medium. The results showed that silver nanoparticles (AgNPs) had different antifungal effects at different concentrations for each fungus. AgNPs at a concentration of 60 ppm inhibited 39.5% and 48.5% growth of *P. zingerberis* and *F. oxysporum*, respectively. The inhibition level of AgNPs at 40 ppm concentration against *Colletotrichum* spp. was 59.4%. The antifungal activity of AgNPs against *H. teres* at concentrations 50 and 100 ppm reached 53.3%, against *Alternaria* spp. 27.8% and 33.3%, respectively. Thus, the silver nano solution could be recommended to effectively prevent and treat some fungal diseases of plants.

Keywords: *Alternaria* spp., antifungal effect, *Colletotrichum* spp., *F. oxysporum*, *H. teres*, *P. zingerberis*, silver nanoparticles.

Classification number: 4.1

xoá đói giảm nghèo cho bà con nông dân vùng cao, hai đối tượng cây trồng được địa phương phát triển khá hiệu quả để xuất khẩu là cây gừng trâu và cây ớt trồng theo mô hình sản xuất hữu cơ không thuốc trừ sâu, không bón phân hóa học. Tuy nhiên, trong mấy năm qua hiện tượng nấm bệnh đã gây ảnh hưởng không nhỏ đến năng suất, chất lượng của củ gừng trâu và ớt sau thu hoạch. Nấm bệnh cũng gây thiệt hại nghiêm trọng đối với nhiều loại cây trồng khác, trong đó có cây lúa mì, lúa mạch ở Belarus. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu lực của nano bạc đối với một số loài nấm gây bệnh trên cây gừng, cây ớt, cây lúa mì, lúa mạch, làm cơ sở cho các giải pháp bảo vệ các đối tượng cây trồng nêu trên.

Phương pháp nghiên cứu và thực nghiệm

Phương pháp chế tạo dung dịch nano bạc

• Hoá chất sử dụng gồm có: bạc nitrat (AgNO_3), natri bohidrua (NaBH_4), chitosan, axit acetic (CH_3COOH) và nước cất 1 lần chế tạo tại phòng thí nghiệm.

• Phương pháp chế tạo: qua quá trình nghiên cứu, nhóm tác giả đã lựa chọn được quy trình tối ưu chế tạo nano bạc với chất ổn định là chitosan. Hạt nano bạc được hình thành trên dựa trên phản ứng sau:



Dung dịch nano bạc - chitosan được điều chế với tỷ lệ $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3=0,25$, hàm lượng chitosan 120 ppm và nồng độ AgNO_3 500 ppm. AgNO_3 dạng rắn được cho vào môi trường có sẵn chitosan hòa tan trong axit axetic tạo thành dung dịch AgNO_3 . Sau đó nhỏ từ từ dung dịch NaBH_4 vào dung dịch AgNO_3 , khuấy mạnh tại nhiệt độ phòng.

• Các phương pháp nghiên cứu đặc trưng của hệ nano Ag-chitosan được thực hiện tại Viện Khoa học Vật liệu như sau: phương pháp kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường FE-SEM (TB Hitachi S-4800, Nhật Bản); phương pháp phổ Zeta; phương pháp tán xạ ánh sáng động DLS (máy đo nano Zetasizer, Malvern UK); phương pháp UV-Vis (UV-Vis-1800, Nhật).

Phương pháp phân lập và giám định nấm bệnh

Phương pháp phân lập và nuôi cấy nấm bệnh trong phòng thí nghiệm được tiến hành theo Burgess và cộng sự [10]: mô bệnh được cắt thành miếng có kích thước 1x1 cm, nằm ở ranh giới giữa mô bệnh và mô khỏe. Khử trùng bề mặt bằng cồn 70°, rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Dùng dao đã khử trùng cắt vết bệnh thành các miếng nhỏ 5x5 mm. Đặt các mảnh mô vào môi trường phân lập bao gồm thạch - nước cất (WA) (có bổ sung kháng sinh), môi trường khoai tây - đường - agar cải tiến (MPDA). Khi nấm đạt đường kính tán nấm 1-2 cm, cấy truyền sang môi trường WA. Làm thuần mẫu nấm bằng cách cấy đỉnh sinh trưởng của một sợi nấm từ môi trường trung gian (WA) sang môi trường

nuôi cấy phù hợp với từng loại nấm: môi trường khoai tây - đường - agar (PDA), môi trường thạch lá cẩm chương CLA.

Phương pháp nghiên cứu khả năng ức chế của dung dịch nano bạc đến sự phát triển của nấm gây bệnh trên cây trồng

Các loại nấm sau khi phân lập được sử dụng trong nghiên cứu: *F. oxysporum*, *P. zingiberis*, *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp. và *H. teres*.

Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường PDA, sau khi hấp khử trùng, để nguội môi trường khoảng 80°C, bổ sung chế phẩm dung dịch nano bạc (với các nồng độ khác nhau) vào môi trường PDA, đổ vào đĩa petri.

Cây tằm nấm đã được làm thuần với đường kính 5 mm lên giữa đĩa môi trường đã được chuẩn nồng độ nghiên cứu và môi trường PDA làm đối chứng. Các đĩa nuôi cấy được đặt trong môi trường có nhiệt độ 24-26°C, theo dõi sự phát triển của tằm nấm thông qua đường kính tằm nấm sau khi cấy từ 7-12 ngày. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần nhắc lại và mỗi lần nhắc lại 5 đĩa petri [1].

Mức độ hiệu quả các nồng độ dung dịch nano bạc nghiên cứu sẽ được đánh giá dựa trên hoạt tính kháng nấm [1]: $HTKN (\%) = ((D-d)/D) \times 100$. Trong đó: D (mm) là đường kính tằm nấm trên môi trường thạch không bổ sung dung dịch nano bạc (đối chứng); d là đường kính tằm nấm trên môi trường thạch có bổ sung dung dịch nano bạc.

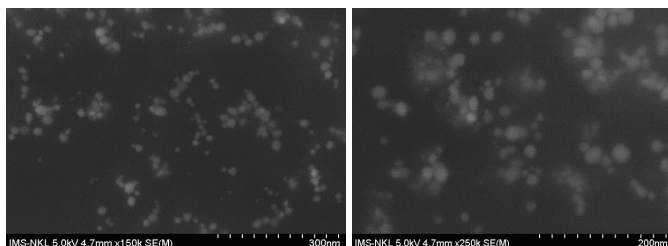
Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được tính toán các giá trị trung bình, sai số được xử lý trên chương trình Microsoft Excel 2016. Để xác định sự khác biệt giữa các nhóm có mang ý nghĩa thống kê hay không sử dụng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA single factor).

Kết quả và thảo luận

Các đặc trưng của dung dịch nano bạc

Các hạt nano bạc chế tạo được có dạng cầu, kích thước đồng đều từ 5-20 nm. Các hạt nano đa số tách rời nhau, bên cạnh đó có một số ít hạt có xu hướng tụ lại do ảnh hưởng của chitosan được sử dụng với vai trò chất ổn định (hình 1).



Hình 1. Ảnh FE-SEM của hệ nano Ag-chitosan ở các độ phân giải khác nhau.

Sử dụng phương pháp khác (DLS) để xác định kích thước phân tán của hạt nano cho thấy kích thước hạt trung bình là 43,83 nm, cao hơn kết quả ảnh FE-SEM (đây có thể là do có sự tương tác giữa các hạt nano Ag với chitosan). Thế zeta của hệ dung dịch nano đạt 34,2 mV, dung dịch nano Ag-chitosan có tính ổn định cao.

Phân lập các chủng nấm gây bệnh

Cây gừng tại huyện Hà Quảng, Cao Bằng trong quá trình canh tác đã quan sát thấy có 2 nhóm cây với các biểu hiện bị nhiễm bệnh khác nhau. Nhóm thứ nhất có các triệu chứng: lá cây bị héo vàng, thân cây nhũn ra khi chạm vào (hình 2). Nhóm thứ 2 có các triệu chứng của bệnh đốm lá: trên lá ban đầu xuất hiện các đốm vàng nhỏ, sau đó lan dần ra khắp lá và sang các lá khác (hình 3).



A. Thực trạng ngoài đồng ruộng

B. Mẫu lá bệnh xét nghiệm

Hình 2. Cây gừng bị bệnh héo vàng - thối củ do nấm *F. oxysporum* gây ra.



A. Thực trạng ngoài đồng ruộng

B. Mẫu lá bệnh xét nghiệm

Hình 3. Lá cây gừng bị bệnh đốm lá do nấm *P. zingiberis* gây ra.

Mẫu cây gừng bệnh được phân lập, xác định tác nhân gây bệnh tại Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội, Viện Dược liệu. Dựa vào đặc điểm hình thái tằm nấm xác định được tác nhân gây bệnh héo vàng - thối củ trên cây gừng là nấm *F. oxysporum* - loại nấm gây bệnh thối củ phổ biến trên cây gừng, tác nhân gây bệnh đốm lá là nấm *P. zingiberis*. Điều này phù hợp với sự hiện diện trên 95% mẫu cây bệnh trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Nghiênm và cộng sự khi xác định tác nhân gây thối củ trên cây gừng [11].

Trên một số cây ớt trồng tại huyện Hoà An, Cao Bằng đã xuất hiện các triệu chứng bệnh: cây bị cháy mép lá, đốm nhỏ trên bề mặt lá, ranh giới phần mô bệnh và mô khoẻ có quầng vàng. Mẫu ớt bệnh được phân lập và định danh tác nhân gây bệnh tại Bộ môn Công nghệ vi sinh, Viện Di truyền Nông nghiệp. Dựa vào đặc điểm hình dạng và kích thước được đánh giá theo mô tả đã công bố [12-15], xác định bệnh trên cây ớt là do nấm *Colletotrichum* spp. Trên môi trường PDA, tản nấm xốp, sợi nấm phân nhánh mỏng dần về phía rìa tản nấm, có màu trắng xám (hình 4) [16].



Hình 4. Hình thái tản nấm *Colletotrichum* spp. trên môi trường PDA.

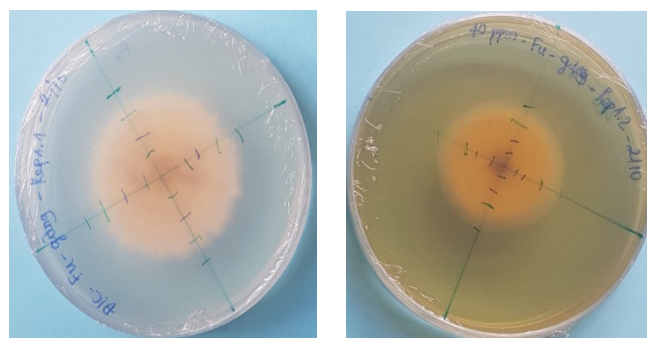
Khả năng ức chế phát triển nấm gây bệnh trên thực vật của dung dịch nano bạc

*Khả năng ức chế của dung dịch nano bạc đối với sự phát triển của nấm *F. oxysporum* và *P. zingiberis* gây bệnh trên cây gừng trâu:*

Sự phát triển của nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng - thối củ ở gừng trâu sau 7 ngày nuôi cấy và nấm *P. zingiberis* gây bệnh đốm lá ở gừng trâu sau 12 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung nano bạc được thể hiện lần lượt ở hình 5 và hình 6.

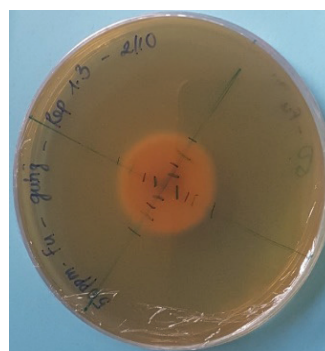
Kết quả thu được cho thấy, khả năng ức chế sự phát triển của nấm tăng dần theo nồng độ nano bạc. Đối với nấm *F. oxysporum*, quá trình theo dõi được tiến hành trong 7 ngày và nấm *P. zingiberis* là 12 ngày.

Sau 7 ngày, dung dịch nano bạc nồng độ 20 ppm không có khả năng ức chế sự phát triển của nấm bệnh với đường kính tản nấm không khác biệt so với đối chứng. Nano bạc ở nồng độ 30 và 40 ppm có khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* lần lượt là 6,2 và 13,5%. Nano bạc nồng độ 50 và 60 ppm có hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm bệnh lần lượt là 46,1 và 48,5% (bảng 1). Như vậy, nano bạc ở nồng độ 60 ppm vẫn chưa đủ để ức chế hoàn toàn sự phát triển của sợi nấm *F. oxysporum*. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của S.W. Kim [1] và Nguyễn Hoài Châu [6].

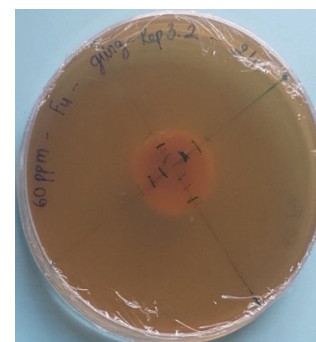


(A)

(B)



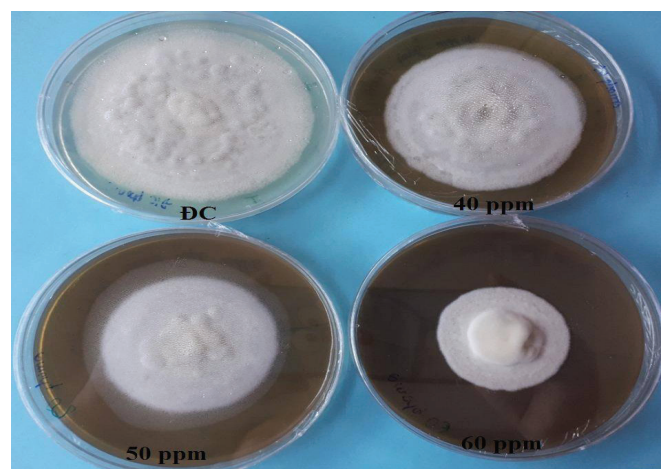
(C)



(D)

Hình 5. Sự phát triển của nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng - thối củ ở gừng trâu sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung nano bạc. (A) Đối chứng; (B) Nano bạc nồng độ 40 ppm; (C) 50 ppm; (D) 60 ppm.

Sau 12 ngày, đường kính tản nấm *P. zingiberis* lớn nhất được qua sát thấy ở nhóm đối chứng (môi trường PDA không bổ sung dung dịch nano bạc), đạt $75,4 \pm 0,5$ mm. Hoạt tính kháng nấm *P. zingiberis* của dung dịch nano bạc ở nồng độ 20, 30, 40, 50 và 60 ppm đạt lần lượt là 2,9, 8,0, 11,4, 31,7 và 39,5% (bảng 1).



Hình 6. Sự phát triển của nấm *P. zingiberis* gây bệnh đốm lá ở gừng trâu sau 12 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung nano bạc.

Bảng 1. Ảnh hưởng của dung dịch nano bạc đến sự phát triển của nấm *F. oxysporum* và nấm *P. zingiberis* trên môi trường PDA.

STT	Nồng độ dung dịch nano Ag (ppm)	Đường kính tán nấm (cm)		Hoạt tính kháng nấm (%)	
		<i>F. oxysporum</i> (ngày thứ 7)	<i>P. zingiberis</i> (ngày thứ 12)	<i>F. oxysporum</i> (ngày thứ 7)	<i>P. zingiberis</i> (ngày thứ 12)
1	20	8,0±0,0	7,3±0,1*	0	2,9
2	30	7,5±0,1	6,9±0,04**	6,2	8,0
3	40	6,9±0,1	6,7±0,1**	13,5	11,4
4	50	4,3±0,1**	5,2±0,1**	46,1	31,7
5	60	4,1±0,1**	4,6±0,1**	48,5	39,5
6	Đối chứng	8,0±0,0	7,5±0,1	-	-

* và **: sự khác biệt so với đối chứng ở mức ý nghĩa 5% ($p \leq 0,05$) và 1% ($p \leq 0,01$).

Khả năng ức chế của dung dịch nano bạc đối với sự phát triển của nấm Colletotrichum spp. gây bệnh trên cây ớt:

Đánh giá hiệu lực phòng trừ của dung dịch nano bạc đối với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư ớt được thực hiện sau 12 ngày trên môi trường PDA.

Kết quả đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm *Colletotrichum* spp. của dung dịch nano bạc sau 12 ngày theo dõi được trình bày ở bảng 2. Các nồng độ thử nghiệm của dung dịch nano bạc 20, 30 và 40 ppm đều cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum* spp. trên 50% (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của dung dịch nano bạc đến sự phát triển của nấm *Colletotrichum* spp. trên môi trường PDA (ngày thứ 12).

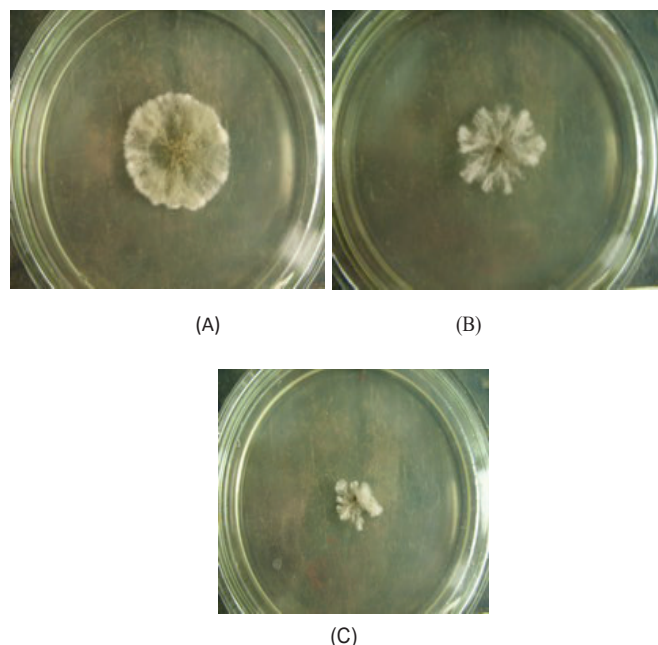
STT	Nồng độ dung dịch nano Ag (ppm)	Đường kính tán nấm (cm)	Hoạt tính kháng nấm (%)
1	20	4,03**	52,6
2	30	3,71**	56,4
3	40	3,45**	59,4
4	Đối chứng	8,5	-

** : sự khác biệt so với đối chứng ở mức ý nghĩa 1% ($p \leq 0,01$).

Khả năng ức chế của dung dịch nano bạc đến sự phát triển của nấm Alternaria spp. và H. teres gây bệnh trên cây lúa mì, lúa mạch:

Hoạt tính kháng nấm của dung dịch nano bạc đối với nấm *Alternaria* spp. gây bệnh đốm lá và nấm *H. teres* gây bệnh thối rễ trên cây lúa mì, lúa mạch được thực hiện tại Phòng Sinh lý bệnh học và khả năng chống chịu bệnh thực vật - Viện Thực nghiệm Thực vật V.F. Kuprevich, Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Belarus.

Sự phát triển của nấm *H. teres* gây bệnh thối rễ trên lúa mì, lúa mạch sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung nano bạc được thể hiện ở hình 7.



Hình 7. Sự phát triển của nấm *H. teres* gây bệnh thối rễ trên lúa mì, lúa mạch sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung nano bạc. (A) Đối chứng; (B) Ag 50 ppm; (C) Ag 100 ppm.

Nano bạc các nồng độ 50 và 100 ppm có hoạt tính kháng nấm đối với nấm *Alternaria* spp. lần lượt là 27,8 và 33,3%. Đối với nấm *H. teres* dung dịch nano bạc cho thấy hiệu quả kháng nấm ở tất cả các nồng độ thí nghiệm (25, 50 và 100 ppm) lần lượt là 40, 53,3 và 53,3% (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của dung dịch nano bạc đến sự phát triển của nấm *Alternaria* spp. và *H. teres* trên môi trường PDA (ngày thứ 10).

STT	Nồng độ dung dịch nano Ag (ppm)	Đường kính tán nấm (cm)		Hoạt tính kháng nấm (%)	
		<i>Alternaria</i> spp.	<i>H. teres</i>	<i>Alternaria</i> spp.	<i>H. teres</i>
1	25	4,00±0,13	2,25±0,10**	-	40
2	50	3,25±0,16**	1,75±0,11**	27,8	53,3
3	100	3,00±0,16**	1,75±0,10**	33,3	53,3
4	Đối chứng	4,50±0,13	3,75±0,15	-	-

** : sự khác biệt so với đối chứng ở mức ý nghĩa 1% ($p \leq 0,01$).

Kết luận

Bằng phương pháp phân lập và nuôi cấy nấm bệnh trong phòng thí nghiệm đã xác định được các bệnh trên cây gừng như héo vàng, thối củ - do nấm *F. oxysporum*, đốm lá - *P. zingerberis*; bệnh thán thư trên cây ớt - *Colletotrichum* spp.; các bệnh trên cây lúa mì, lúa mạch như đốm lá - *Alternaria* spp., thối rễ - *H. teres*.

Nano bạc ở các nồng độ khác nhau, đối với các loại nấm khác nhau cho khả năng ức chế sự phát triển của nấm bệnh

ở các mức độ khác nhau. Nano bạc nồng độ 20 ppm đã cho thấy hoạt tính kháng nấm đối với nấm *P. zingerberis*, đạt 2,9%, trong khi đó ở nồng độ này không có hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm *F. oxysporum*. Đối với nấm *P. zingerberis* ở nồng độ 60 ppm, nano bạc ức chế 39,5% so với đối chứng, còn đối với nấm *F. oxysporum*, hoạt tính kháng nấm của nano bạc ở nồng độ này là 48,5%. Nano bạc nồng độ 40 ppm ức chế 59,4% sự phát triển của nấm *Colletotrichum* spp. Nano bạc ở nồng độ 50 và 100 ppm ức chế 53,3% sự phát triển của nấm *H. teres*. Nano bạc nồng độ 50 ppm chỉ ức chế được 27,8% sự phát triển của nấm *Alternaria* spp. và ở nồng độ 100 ppm ức chế được 33,3% sự phát triển của nấm này trên môi trường PDA.

Dung dịch nano bạc có thể là biện pháp thay thế việc sử dụng thuốc diệt nấm truyền thống đầy hứa hẹn, được sử dụng hiệu quả để phòng và điều trị các bệnh do nấm gây ra trên đối tượng cây trồng. Do vậy, cần có những nghiên cứu triển khai ở điều kiện ngoài đồng ruộng, cũng như những nghiên cứu về ảnh hưởng của nano bạc đến cấu trúc tế bào, chức năng di truyền của cây, nhằm đánh giá chính xác hơn nữa hiệu quả sử dụng dung dịch nano bạc với vai trò là sản phẩm phòng và điều trị bệnh cho cây trồng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi các đề tài mã số QTBY02.02/19-20 của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và BRFFR (Mã B19VA-001) của Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Belarus, và đề tài UDNGDP.03/19-20 của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.W. Kim, J.H. Jung, K. Lamsal, Y.S. Kim, et al. (2012), "Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi", *Mycobiology*, **40**(1), pp.53-58.
- [2] Y.K. Jo, B.H. Kim, G. Jung (2009), "Antifungal of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi", *Plant Disease*, **93**(10), pp.1037-1043, DOI: 10.1094/PDIS-93-10-1037.
- [3] Võ Văn Quốc Bảo, Trương Ngọc Đăng (2018), "Khả năng kháng nấm của chế phẩm nano bạc-TBS đối với *Macrophoma theicola* gây hại trên quả quýt Hương Cần (*Citrus deliciosa* T.)", *Tạp chí Khoa học - Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, **127**(1C), tr.131-139, DOI: 10.26459/hueuni-jns.v127i1C.4954.
- [4] I. Akpınar, T. Sar, E. Yuzbasioglu, et al. (2017), "Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) isolates", *Conference paper: International Green Biotechnology Congress*, **2**.
- [5] Lê Quang Luân, Nguyễn Huỳnh Phương Uyên, Phan Hồ Giang (2014), "Nghiên cứu hiệu ứng kháng nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu của chế phẩm nano bạc-chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ", *Tạp chí Sinh học*, **36**(1se), tr.152-157.
- [6] Nguyễn Hoài Châu, Nguyễn Thị Thúy, Đào Trọng Hiền và các cộng sự (2017), "Nghiên cứu khả năng ức chế nấm gây bệnh trên cây đậu tương của vật liệu nano Ag/bentonite", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **15**(2), tr.349-357.
- [7] J.E. Mendes, J.A. Abrunhosa, E.R. de Camargo Teixeira, et al. (2014), "Antifungal activity of silver colloidal nanoparticles against phytopathogenic fungus (*Phomopsis* sp.) in soybean seeds", *International Journal of Biological, Veterinary, Agriculture and Food Engineering*, **8**(9), pp.928-933.
- [8] <http://zhurnal.apc.relarn.ru/articles/2005/139.pdf>.
- [9] Antibiotic effect and features of Anson nanosilver, <http://nanosilver.blogfa.com/post/13>.
- [10] L.W. Burgess, T.E. Knight, L. Tesoriero and H.T. Phan (2008), *Diagnostic Manual for Plant Diseases in Vietnam*, Australian Centre for International Agricultural Research Canberra, p.210, <http://docshare01.docshare.tips/files/21361/213612115.pdf>.
- [11] Nguyễn Thị Nghiêm, Trần Thị Diên, Nguyễn Thị Mộng Tuyền (2009), "Xác định tác nhân và biện pháp phòng trị bệnh thối củ gừng tại huyện Phụng Hiệp, Hậu Giang", *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*, **11**, tr.20-27.
- [12] L. Cai, K. Hyde, P. Taylor, et al. (2009), "A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*", *Fungal Diversity*, **39**, pp.183-204.
- [13] Nguyễn Duy Hưng, Hà Viết Cường, Hoàng Chúng Lắm, Nguyễn Đức Huy (2017), "Xác định nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ở Đồng bằng sông Hồng", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **12**(85), tr.87-93.
- [14] A.G. De Silva, M. Groenewald, P.W. Crous, et al. (2019), "Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia", *IMA Fungus*, **10**, DOI: 10.1186/s43008-019-0001-y.
- [15] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez and M.J. Yacaman (2005), "The bactericidal effect of silver nanoparticles", *Nanotechnology*, **16**, pp.2346-2353.
- [16] Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Cao Cường và các cộng sự (2015), "Khả năng ức chế của nanochitosan đối với *Colletotrichum acutatum* L2 gây hại quả cà chua sau thu hoạch", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **13**(8), tr.1481-1487.

Hiệu quả ứng dụng bentonit Tam Bó (Lâm Đồng) để cải tạo đất cát trồng măng tây và ngô

Nguyễn Văn Hà*, Nguyễn Hoài Châu, Nguyễn Anh Vũ, Đoàn Quang Hà

Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 18/2/2020; ngày chuyển phản biện 21/2/2020; ngày nhận phản biện 19/3/2020; ngày chấp nhận đăng 27/3/2020

Tóm tắt:

Bài báo trình bày nội dung và kết quả nghiên cứu thực nghiệm cải tạo đất cát ở khu vực ven biển huyện Ninh Phước, tỉnh Ninh Thuận bằng khoáng sét bentonit được khai thác tại mỏ Tam Bó (Lâm Đồng). Chất lượng bentonit được đánh giá dựa trên kết quả phân tích thành phần khoáng vật và thành phần hóa học. Chất lượng đất trồng cây được đánh giá qua kết quả phân tích 25 chỉ tiêu cho thấy: đây là khu đất cát rất nghèo dinh dưỡng và khả năng giữ ẩm đồng ruộng thấp. Ở mức trộn bentonit 3% đã cải tạo sức giữ ẩm đồng ruộng trên 10% và dung lượng trao đổi cation (CEC) tăng trên 20%. Thí nghiệm đồng ruộng khi trồng cây măng tây và cây ngô đã cho kết quả tiết kiệm nước tưới và tăng năng suất cây trồng. Với các mức trộn bentonit vào đất trồng 20, 40 và 60 tấn/ha đã thể hiện tăng năng suất cây măng tây lần lượt 10,1, 15,5 và 18,6%. Với cùng tỷ lệ bentonit cải tạo đất, năng suất cây ngô tăng lần lượt 10,5, 17,9 và 22,2%.

Từ khóa: bentonit, đất cát, đặc tính hóa lý của đất, măng tây và ngô.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Đất cát có đặc điểm thấm nước cao nhưng không giữ được nước; hàm lượng sét thấp nên khó tích tụ mùn, chất dinh dưỡng; khả năng đệm pH thấp nên dễ bị axit hóa. Chính vì vậy, cây trồng trên đất cát thường có năng suất thấp. Trong môi trường nhiệt đới, đất cát suy thoái nhanh hơn [1, 2].

Bentonit là loại khoáng sét có khả năng trương nở cao, khi trộn vào đất cát sẽ giúp đất giảm độ thấm và giữ nước tốt hơn. Khi độ ẩm của đất tăng lên, tính dẫn nhiệt (khả năng nhiệt dung) cũng tăng, tạo điều kiện sinh trưởng tốt hơn cho cây trồng [3]. Thời gian tác dụng của bentonit trong cải tạo đất cát là khoảng 8 năm [4]. Một số nghiên cứu đã cho thấy, bentonit có khả năng cải thiện độ pH, dung lượng trao đổi cation (CEC), duy trì chất dinh dưỡng, cải thiện hiệu quả sử dụng phân bón...[5]. Ở nơi có nhiệt độ cao như tây Australia, việc bổ sung bentonit vào đất đã cải thiện đáng kể khả năng giữ nước cho đồng ruộng; năng suất cây trồng tăng tỷ lệ thuận với tỷ lệ bentonit trộn vào đất. Kết quả tương tự cũng đã được báo cáo ở Thái Lan [6]. Những năm gần đây, nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng bentonit để cải tạo đất trồng trọt trong điều kiện thiếu nước tại châu Phi đã được công bố [7]. A.Z.A. Hassan và cs đã tiến hành nghiên cứu cải tạo đất cát và đánh giá ảnh hưởng của bentonit đối với một số cây ngũ cốc; O. Semalulu và cs đã sử dụng bentonit dạng canxi để cải tạo đất trong khu vực chịu ảnh hưởng của hạn hán tại Uganda [8-10]. Trong điều kiện hạn hán tại Tunisia, N. Karboub và cs [11] đã nghiên cứu tác động của việc dùng bentonit để cải tạo đất. Nghiên cứu cải tạo đất nghèo dinh dưỡng hoặc đất cát phần lớn được thực hiện bởi các nhà khoa học tại các quốc gia có những vùng đất cần được cải tạo, hoặc đang chịu áp lực của sự

thiếu nước, như Thái Lan [12], Angeria [13] và Irac [14]. Trong thời gian 5 năm, L. Zhou và cs [15] đã thực hiện thí nghiệm cải tạo bằng bentonit trên các lô đất cát khác nhau và đánh giá khả năng lưu trữ nước, urê, các enzym trong đất cũng như khả năng tăng trưởng của cây. Kết quả cho thấy sự cải thiện đáng kể về năng suất ngô hạt và năng suất sinh khối của cây.

Tỉnh Ninh Thuận là vùng khô hạn có lớp đất canh tác mỏng, nghèo hữu cơ, thành phần sét trong đất thấp, thành phần vụn thô chiếm ưu thế. Theo thống kê sơ bộ của Trung tâm Dự báo khí tượng thủy văn Ninh Thuận, tổng diện tích đất hoang mạc ở Ninh Thuận là 41.021 ha, chiếm 12,21% diện tích tự nhiên toàn tỉnh. Diện tích đất canh tác với đặc trưng thổ nhưỡng đất cát mịn khá lớn (khoảng 10.807 ha). Hiện nay, thực trạng hoang mạc hóa vẫn tiếp tục có chiều hướng gia tăng do tình trạng hạn hán, thiếu nước thường xuyên vào mùa khô, làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất và các hoạt động dân sinh, kinh tế của địa phương.

Từ các kết quả nghiên cứu đã dẫn ra ở trên, ta thấy rằng việc sử dụng bentonit để cải tạo đất cát, đất bạc màu sẽ cải thiện được 2 yếu tố cơ bản của đất trồng trọt là tăng khả năng giữ nước và giữ các chất dinh dưỡng có độ linh động cao như amoni, kali... Mục tiêu nghiên cứu này là cải tạo đất cát bằng bentonit tự nhiên có các đặc tính hợp lý để tăng khả năng giữ nước của đất, giảm mức độ rửa trôi dinh dưỡng, tăng CEC, có tác động tốt tới năng suất cây trồng.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu bentonit

Bentonit tự nhiên được khai thác tại mỏ Tam Bó thuộc địa

* Tác giả liên hệ: Email: nhongha1951@gmail.com

Effect of application of bentonite from Tam Bo (Lam Dong province) to improve sandy soil for asparagus and maize cultivation

Van Ha Nguyen*, Hoai Chau Nguyen, Anh Vu Nguyen, Quang Ha Doan

*Institute of Environmental Technology,
Vietnam Academy of Science and Technology*

Received 18 February 2020; accepted 27 March 2020

Abstract:

This work included an experimental study of sandy soil reclamation in the coastal area of Ninh Phuoc district, Ninh Thuan province by adding bentonite clay which was produced from Tam Bo mine (Lam Dong province). The quality of bentonite was determined by the assessment of analysed mineral and chemical composition. The soil of experimental site was analysed with 25 parameters which showed a lack of nutrition and ability to retain moisture from the soil. With 3% bentonite mixing, soil moisture content was raised above 10% and cation exchange capacity increased over 20%. In-situ experiments of asparagus and maize cultivation resulted in irrigation water savings and crop yields increase. By mixing bentonite with the soil at the rate of 20 tons/ha, 40 tons/ha, and 60 tons/ha, the asparagus yield increased by 10.1%, 15.5%, and 18.6% respectively. With the same percentage of bentonite concentration, the yield of maize increased by 10.5%, 17.9%, and 22.2%, respectively.

Keywords: asparagus and maize, bentonite, physicochemical characterisation of soil, sandy soil.

Classification number: 4.1

phận xã Tam Bồ, huyện Di Linh, tỉnh Lâm Đồng. Mỏ nằm sát QL20 đường Đà Lạt - TP Hồ Chí Minh, cách Di Linh 18 km về phía đông bắc. Các mẫu khảo sát chất lượng bentonit được lấy tại khu nguyên liệu và sản phẩm tự nhiên (quặng bentonit được phơi khô và nghiền mịn).

Xác định thành phần khoáng vật: phương pháp nhiễu xạ Ronghen (XRD) được sử dụng để xác định thành phần khoáng vật của các pha kết tinh trong mẫu dựa trên định luật Vulf - Bragg. Các mẫu bentonit được tiến hành phân tích trên máy D8 - Advance tại Phòng Khoáng vật (Trung tâm Thí nghiệm địa chất, Cục Địa chất Việt Nam).

Xác định thành phần hóa học: phương pháp phân tích huỳnh quang tia X (XRF) được sử dụng để xác định thành phần hóa học của mẫu. Các mẫu bentonit khảo sát được tiến hành phân tích tại Trung tâm Phân tích (Viện Địa chất, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam).

Xác định CEC: dung lượng CEC của các mẫu bentonit khảo sát được xác định theo tiêu chuẩn ASTM C-837. Phương pháp này dựa trên bản chất trao đổi cation giữa khoáng vật sét với các cation metylen xanh (Methylene Blue - MB) khi hòa tan trong nước.

Đối tượng và thời gian nghiên cứu

Khu đất cát ven biển thí nghiệm trồng cây măng tây và cây ngô tại xã An Hải, huyện Ninh Phước, tỉnh Ninh Thuận. Thời gian thí nghiệm từ tháng 3/2018 đến tháng 3/2019.

Phương pháp nghiên cứu

Lấy mẫu và phân tích chất lượng khu đất thí nghiệm: khu đất thí nghiệm được lấy 9 mẫu. Mỗi mẫu được lấy ở 2 độ sâu từ 0-30 cm và 30-60 cm.

- Các mẫu đều được phân tích các thông số quan trọng liên quan tới sinh trưởng cây trồng: thành phần cơ giới, sức chứa ẩm đồng ruộng, CEC, pH, hàm lượng cacbon hữu cơ, dinh dưỡng đa lượng N, P, K, trung lượng Ca, Mg và một số vi lượng: Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B, Se, Co.

- Phương pháp phân tích: theo các QCVN và TCVN về chất lượng đất trồng trọt.

Xác định tác động của bentonit tới sức chứa ẩm đồng ruộng, CEC: 3 mẫu đất được trộn với bentonit theo tỷ lệ (w/w) 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 và 3%. Xác định thông số sức chứa ẩm đồng ruộng và CEC của các mẫu đất sau khi được trộn với bentonit ở các tỷ lệ trên.

Thí nghiệm đồng ruộng: măng tây được trồng sau ươm giống 3 tháng theo phương án rãnh kép với mật độ 45x60 cm. Các ô thí nghiệm kích thước 4,5x6 m được trộn bentonit theo 3 công thức 20, 40 và 60 tấn/ha và 1 công thức đối chứng không sử dụng bentonit được bố trí theo phương pháp khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD), nhắc lại 3 lần. Các ô thí nghiệm được bón lượng phân như nhau, được tưới nước bằng hệ thống phun thấp theo số liệu đo độ ẩm đất bằng dụng cụ tensiometer. Sau khi trồng 6 tháng,

măng tây được thu hoạch đợt đầu trong vòng 30 ngày, sau đó dưỡng cây 30 ngày. Đánh giá năng suất ở các ô thí nghiệm được lấy số liệu thu hoạch trong vòng 90 ngày sau khi dưỡng cây.

Đối với cây ngô, hạt giống được gieo sau khi xử lý với mật độ 25x80 cm. Các ô thí nghiệm kích thước 3,2x8 m, được trộn bentonit theo 3 công thức 20, 40 và 60 tấn/ha và 1 công thức đối chứng không sử dụng bentonit được bố trí theo phương pháp khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCBD - Randomized complete block design), nhắc lại 3 lần. Các ô thí nghiệm được bón lượng phân như nhau, được tưới nước bằng hệ thống tưới nhỏ giọt theo số liệu đo độ ẩm đất bằng dụng cụ tensiometer. Sau khi xuống hạt giống 3 tháng, tiến hành thu hoạch, thu thập và xử lý số liệu.

Xử lý số liệu: số liệu được xử lý bằng chương trình IRRISTAT 5.0, DUNCAN và Microsoft Excel 2010.

Kết quả và thảo luận

Thành phần khoáng vật và thành phần hóa học của bentonit Tam Bó (Lâm Đồng)

Bentonit có những đặc tính có giá trị ứng dụng thực tế độc đáo, không có những loại sét tương tự thay thế được. Hai đặc trưng cơ bản nhất của bentonit là tính trương nở và trao đổi cation do khoáng chất montmorilonit quyết định. Hàm lượng khoáng montmorilonit của 4 mẫu khảo sát TN1, TN2, TN3 và TN4 thu thập tại mỏ bentonit Lâm Đồng được nêu trong bảng 1. Thành phần hóa học các mẫu bentonit được trình bày ở bảng 2.

Bảng 1. Thành phần khoáng vật của mẫu bentonit.

STT	Ký hiệu mẫu	Thành phần khoáng vật và khoáng hàm lượng (%)					
		Montmorilonit	Illit	Kaolinit	Clorit	Thạch anh	Khoáng vật khác
1	TN 1	50-52	11-13	9-11	4-6	9-11	7-17
2	TN 2	46-48	11-13	9-11	4-6	16-18	4-14
3	TN 3	68-70	9-11	4-6		9-11	0-6
4	TN 4	66-68	9-11	4-6		9-11	0-8

Bảng 2. Thành phần hoá học mẫu bentonit (%).

STT	Thành phần (%)	Các mẫu khảo sát			
		TN1	TN2	TN3	TN4
1	SiO ₂	58,06	57,53	57,56	57,83
2	Al ₂ O ₃	16,02	18,53	21,30	21,03
3	Fe ₂ O ₃	11,64	9,22	7,56	7,85
4	TiO ₂	1,66	0,93	0,76	0,71
5	CaO	1,57	0,97	0,83	0,86
6	MgO	1,97	2,30	2,32	2,36
7	Na ₂ O	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
8	K ₂ O	0,33	1,43	1,53	1,48
9	P ₂ O ₅	0,05	0,06	0,04	0,04
10	MKN	10,99	11,56	12,34	12,18

Các kết quả nghiên cứu [3, 4, 9, 10, 15] đã cho thấy, bentonit

được sử dụng hiệu quả trong việc cải tạo đất cần có hàm lượng khoáng montmorilonit từ 40% trở lên, vì đó là khoáng chất có đặc tính hấp phụ cao. Khi đó CEC đạt khoảng 60 meq/100 g. Bentonit dạng kiềm thổ (có hàm lượng Ca²⁺, Mg²⁺ cao) có khả năng trao đổi cation cao hơn bentonit dạng kiềm (có hàm lượng K⁺, Na⁺ cao). Các thông số cơ bản của bentonit Tam Bó được nêu trong bảng 1, 2 hoàn toàn phù hợp khả năng hấp phụ và trao đổi cation cao, có hàm lượng canxi, magiê, kali hợp lý, cho phép sử dụng bentonit như là vật liệu để cải tạo đất, làm thay đổi tính chất lý hóa và tính chất nông hóa của đất được xử lý.

Kết quả phân tích chất lượng đất trồng cây thí nghiệm

Khu vực thí nghiệm có diện tích 1 ha, được lấy mẫu đất ở 9 vị trí. Mỗi vị trí được lấy 2 mẫu đất ở hai tầng: 0-30 cm và 30-60 cm. Kết quả phân tích 25 thông số của các mẫu đất được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích chất lượng đất (n=9).

STT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị tính	Mẫu 0-30 cm	Mẫu 30-60 cm
1	Cát (0,02-2 mm)	%	98,43±0,67	98,39±0,70
	Limon (0,02-0,002 mm)	%	1,15±0,38	1,29±0,71
	Sét (<0,002 mm)	%	0,42±0,33	0,32±0,16
2	Dung trọng	g/cm ³	1,25±0,11	1,21±0,10
3	Sức chứa ẩm đồng ruộng	%	36,24±0,16	36,2±0,16
4	pH _{H₂O}		7,25±0,28	7,13±0,31
5	pH _{KCl}		6,04±0,40	5,94±0,42
6	CEC	meq/100 g	2,47±0,23	3,02±0,2
7	Độ dẫn điện EC		38,22±17,10	33,00±17,44
8	Carbon hữu cơ tổng số (OM)	%	0,27±0,26	0,27±0,021
9	Nitơ tổng số (Nts)	%	0,04±0,01	0,03±0,01
10	Nitơ dễ tiêu (Ndt)	mgN/100 g	4,60±0,72	6,72±0,71
11	Phốt pho tổng số (Pts)	%	0,04±0,01	0,08±0,01
12	Phốt pho dễ tiêu (Pdt)	mgP ₂ O ₅ /100 g	12,26±4,85	4,81±5,06
13	Kali tổng số (Kts)	%	0,14±0,03	0,18±0,02
14	Kali dễ tiêu (Kdt)	mgK ₂ O/100 g	2,52±0,51	3,37±0,68
15	Fe trao đổi (Fe ²⁺ , Fe ³⁺)	meq/100 g	7,79±1,11	5,76±1,34
16	Sắt tổng số (Fe)	mg/kg	0,77±0,10	0,70±0,10
17	Mangan tổng số (Mn)	mg/kg	242,28±43,27	233,06±29,93
18	Canxi tổng số (Ca)	%	0,18±0,03	0,16±0,01
19	Magiê tổng số (Mg)	%	0,17±0,05	0,15±0,04
20	Đồng (Cu)	mg/kg	4,20 ± 1,28	3,91±1,18
21	Kẽm (Zn)	mg/kg	25,89±5,68	23,16±4,32
22	Molipđen (Mo)	mg/kg	1,60±1,99	2,57±3,49
23	Bo (B)	mg/kg	4,48±5,91	4,16±5,25
24	Selen (Se)	mg/kg	1,72±1,06	1,67±0,94
25	Coban (Co)	mg/kg	0,25±0,05	0,22±0,02

Các kết quả phân tích cho thấy, đất trong vùng nghiên cứu có thành phần cơ giới chủ yếu là cát, các thông số sức chứa ẩm đồng ruộng và CEC đều thấp nên khả năng giữ nước và giữ phân kém. Đất có độ mặn khá cao, vì vậy ảnh hưởng rất

lớn đến khả năng hấp thu nước của cây trồng trong quá trình sinh trưởng, thậm chí cây có thể chết nếu không được tưới kịp thời. Hàm lượng các chất dinh dưỡng đa lượng trong đất khá nghèo, đặc biệt là hàm lượng hữu cơ ở mức rất nghèo (hầu hết OM<0,5%), lân tổng số, kali tổng số và kali dễ tiêu đều nghèo, dinh dưỡng trung lượng Ca, Mg thấp. Hàm lượng các nguyên tố vi lượng trong đất khá giàu như: đồng, kẽm, mangan, molipden và bo. Tuy nhiên, hàm lượng selen và coban lại thấp. Vì vậy rất cần các biện pháp kỹ thuật để khắc phục điểm yếu này.

Mức độ cải thiện CEC và hiệu quả giữ nước khi trộn bentonit vào đất

3 mẫu đất tầng 0-30 cm trong số 9 mẫu khảo sát có thông số CEC và hiệu quả giữ nước khác nhau được lựa chọn thực hiện thí nghiệm trộn với bentonit theo các tỷ lệ 0, 0,5, 1, 1,5, 2 và 3% để xác định khả năng gia tăng sức chứa ẩm và CEC của đất. Kết quả được thể hiện ở bảng 4 và 5.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, ở mức trộn bentonit 0,5% sức chứa ẩm đồng ruộng đã tăng, nhưng để đạt mức tăng 10% thì cần ít nhất tỷ lệ trộn bentonit khoảng 2%.

Bảng 4. Mức tăng sức chứa ẩm đồng ruộng của đất trộn bentonit.

STT	Mẫu đất % bentonit	Sức chứa ẩm đồng ruộng (%)					
		0	0,5	1	1,5	2	3
1	2	36,3	37,8	38,4	39,7	40,9	42,2
2	4	36,2	37,7	38,6	39,1	40,1	42,8
3	7	36,1	36,4	38,1	39,5	40,2	42,6

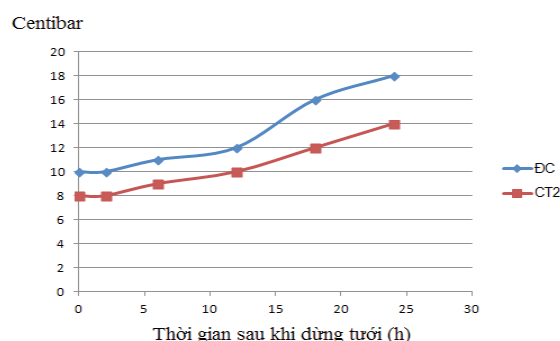
Bảng 5. Mức tăng CEC của đất trộn bentonit.

STT	Mẫu % bentonite	CEC (meq/100 g đất)					
		0	0,5	1	1,5	2	3
1	2	2,4	2,68	2,98	3,32	3,56	3,92
2	4	2,08	2,2	2,28	2,38	2,44	2,52
3	7	2,72	2,82	2,9	2,96	3,2	3,28

Kết quả ở bảng 5 thể hiện mức tăng CEC của đất trộn bentonit khá cao. Ở tỷ lệ trộn bentonit 3%, mức tăng dung tích hấp thu đất đạt trên 20%. Điều này cho thấy, khả năng giữ dinh dưỡng dạng cation như NH_4^+ , K^+ cho đất sẽ tăng cao khi trộn thêm bentonit.

Kết quả thí nghiệm đồng ruộng trồng măng tây

Hiệu quả giữ ẩm khu đất trộn bentonit: sử dụng dụng cụ đo độ ẩm tensiometer để đánh giá mức độ suy giảm độ ẩm của đất trồng theo thời gian: từ sau khi tưới đủ độ ẩm cho cây đến khi độ ẩm giảm đến mức cần phải tưới đợt tiếp theo. Từ đó đưa ra kết quả tiết kiệm nước tưới cho từng công thức sử dụng bentonit. Tensiometer được đặt ở độ sâu với 2 mức: nơi mật độ rễ của cây cao nhất để đánh giá mức độ ẩm thấp tới mức cần tưới và nơi cuối của rễ cây để thể hiện mức nước đã bão hòa đạt được khi dừng tưới.



Hình 1. Độ ẩm đất thí nghiệm thay đổi theo thời gian.

Các kết quả đo độ ẩm cho thấy, khi được tưới cùng lượng nước thì ở các ô thí nghiệm có trộn bentonit đạt giá trị 10 centibar trên tensiometer (bắt đầu bão hòa hóa nước) luôn sớm hơn. Ngược lại, sau khi tưới thời gian đạt giá trị 20 centibar trên tensiometer (thời điểm cần tưới) tại các ô thí nghiệm có trộn bentonit lại muộn hơn so với các ô đối chứng. Điều đó cho thấy, tác động của bentonit đã tạo hiệu quả giữ nước tốt cho khu đất cát được sử dụng trồng măng tây. Trên hình 1 thể hiện mức độ khác biệt về số liệu đo độ ẩm bằng tensiometer ở ô CT2 và ô đối chứng.

Mức độ giữ ẩm của các mẫu đất trộn bentonit: các mẫu đất lấy để so sánh mức độ giữ ẩm được lấy ở độ sâu 20 cm, là nơi mật độ rễ cây cao nhất. Mỗi ô thí nghiệm lấy 1 mẫu ở chính giữa rãnh cây trồng cách béc tưới khoảng 30 cm. Thời điểm lấy mẫu cách thời điểm ngừng tưới khoảng 24 h (chuẩn bị tưới lần tiếp sau). Độ ẩm của đất được xác định theo phương pháp tính tỷ lệ khối lượng nước trong khối lượng đất khô (sấy ở nhiệt độ 105°C). Các kết quả cho thấy, hiệu quả giữ nước của đất cát được trộn bentonit tương đối cao. Điều này thể hiện rõ khả năng tiết kiệm nước tưới khi sử dụng bentonit để cải tạo đất cát trồng măng tây. Trong khi khu đối chứng độ ẩm chỉ đạt 42,4% sức chứa ẩm đồng ruộng, các khu được trộn bentonit đạt CT1-56,9%, CT2-61,6 và CT3-75,1% sức chứa ẩm đồng ruộng.

Tăng năng suất thu hoạch măng tây: vụ thu hoạch chính đầu tiên được bắt đầu vào tháng 1/2019. Các ô thí nghiệm ở mỗi công thức được lặp lại 3 lần. Khối lượng măng tây thành phẩm ở mỗi công thức được chia đều cho từng ô hàng ngày. Kết quả thu hoạch 1 vụ được tính theo 90 ngày (3 tháng). Kết quả thu hoạch được nêu trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả thu hoạch măng tây thí nghiệm.

Công thức	Năng suất mỗi ô (kg/ngày)	Năng suất 90 ngày (kg/1000 m ²)
ĐC	0,258 ^d	860,0
CT1	0,284 ^{bc}	946,6
CT2	0,298 ^{ab}	993,3
CT3	0,306 ^a	1020,0
CV	6,5%	

Ghi chú: trong cùng một cột, các giá trị có cùng ký tự theo sau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P<0,05)

Kết quả cho thấy năng suất thu hoạch măng tây ở các ô đất thí nghiệm được trộn thêm bentonit ở các mức 20, 40 và 60 tấn/ha cao hơn đối chứng lần lượt là 10,1, 15,5 và 18,6%. Điều này chứng tỏ khả năng giữ độ ẩm đất và dinh dưỡng của bentonit đã tạo ra điều kiện thuận lợi cho cây măng tây phát triển.

Kết quả thí nghiệm đồng ruộng trồng ngô

Các chỉ tiêu theo dõi trên toàn ô: thời gian sinh trưởng của cây ngô (từ khi gieo hạt đến thu hoạch) không có sự khác biệt giữa các ô thí nghiệm và đối chứng. Số cây được thu hoạch trên mỗi ô: xấp xỉ 40 bắp/ô, cũng không có sự khác biệt giữa các ô thí nghiệm và đối chứng.

Các chỉ tiêu lấy trên 10 cây/ô đã đánh dấu: chiều cao cây cuối vụ (đo trên các cây đã đánh dấu) ở các công thức thí nghiệm (từ 192,33-195,33 cm) đều cao hơn so với ô đối chứng (191,33 cm). Diện tích lá của cây ngô ở các ô thí nghiệm cũng đều lớn hơn diện tích lá của cây ngô ở các ô đối chứng. Tới thời điểm thu hoạch, mật độ lá cây ngô còn xanh ở các ô thí nghiệm cũng nhiều hơn ở các ô đối chứng. Điều đó cho thấy, sự giữ nước của bentonit đã có ảnh hưởng tương đối rõ đến khả năng sinh trưởng, phát triển của cây ngô.

Năng suất thu hoạch ngô thí nghiệm: năng suất thu hoạch ngô ở các ô thí nghiệm và đối chứng được nêu trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả thu hoạch ngô thí nghiệm (năng suất thực thu - NSTT ở độ ẩm 14%).

Công thức	Số hàng hạt/bắp	Số hạt/hàng	P 1000 hạt (g)	NSTT (tạ/ha)
CT1	14,03	34,23	232,2	61,09
CT2	14,47	34,53	234,7	65,22
CT3	14,33	33,97	230,5	67,58
Đ/C	14,13	32,03	233,2	55,31
CV				8,8
LSD _{0.05}				3,4

Các kết quả về mức độ sinh trưởng và phát triển của cây ngô ở các ô thí nghiệm thu được có ý nghĩa thống kê đã cho thấy việc cải tạo đất trồng ngô bằng bentonit có chất lượng phù hợp đã làm tăng đáng kể khả năng giữ nước và dinh dưỡng cho đất cát. Với tỷ lệ trộn bentonit 20 tấn/ha đã tăng năng suất lên 10,5%, 40 tấn/ha tăng 17,9% và 60 tấn/ha tăng 22,2%. Tuy nhiên, về mặt hiệu quả kinh tế khi trồng ngô chỉ nên chọn mức trộn bentonit 40 tấn/ha.

Kết luận

Sử dụng bentonit để cải tạo đất cát đã đáp ứng được yêu cầu tăng khả năng giữ nước và giữ dinh dưỡng cho đất trồng cây, kể cả cây lâu năm như măng tây và cây có vụ ngắn như ngô. Với tỷ lệ trộn bentonit thích hợp từ 20 đến 60 tấn/ha, đất cát đã giữ ẩm tốt, tiết kiệm 20-30% nước tưới, năng suất cây măng tây tăng 10,1 tới 18,6% và năng suất cây ngô tăng từ 10,5 tới 22,2%. Bentonit chậm bị phân hủy nên tác dụng của nó sẽ ổn định từ 8-10 năm. Do đó việc ứng dụng bentonit có khả năng thích hợp về chi phí kinh tế cho lĩnh vực trồng trọt trên đất cát. Thêm vào đó, mỏ bentonit Tam Bó có trữ lượng cao (khoảng 400.000 tấn),

chất lượng đảm bảo, lại gần với khu đất cát cần cải tạo tại tỉnh Ninh Thuận và các tỉnh Nam Trung Bộ nên khả năng ứng dụng rộng rãi hoàn toàn hợp lý.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Bộ KH&CN tài trợ thông qua đề tài cấp quốc gia “Nghiên cứu ứng dụng bentonit và phân bón lá nano để cải tạo đất nâng cao năng suất cây trồng và tiết kiệm nước tưới nhằm ứng phó với tình trạng khô hạn tại Ninh Thuận và một số tỉnh vùng Nam Trung Bộ”, mã số: ĐTĐLCN.32/17. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Croker, R. Poss, C. Hartmann, S. Bhuthornd-Haraj (2004), “Effects of recycled bentonite addition on soil properties, plant growth and nutrient uptake in a tropical sandy soil”, *Plant Soil*, **267**, pp.155-163.
- [2] J. Káta, M. Tallai, Z.S. Sándor, Á. Olash Zsuposne (2010), “Effect of bentonite and zeolite on some characteristics of acidic sandy soil and on the biomass of a test plant”, *Agrokém. Talajtan*, **59(1)**, pp.165-174.
- [3] Zanusz Czaban, Grzegorz Siebielec, Ewa Czyn, Jaced Niedzdziewski (2013), “Effects of bentonite addition on sandy soil chemistry in a long-term plotexperiment (I); Effect on organic carbon and total nitrogen”, *Pol. J. Environ. Stud.* **22(6)**, pp.1661-1667.
- [4] Janusz Czaban, Ewa Czyn, Grzegorz Siebielec, Jacek Niedzdziewski (2014), “Long-lasting effects of bentonite on properties of a sandy soil deprived of the humus layer”, *Int. Agrophys.*, **28**, pp.279-289.
- [5] A. Satje, P. Nelson (2009), “Bentonite treatments can improve the nutrient and water holding capacity of sugar cane soils in the wet tropics”, *Proc. Austr. Soc. Sugar Cane Technol.*, **31**, pp.166-176.
- [6] W. Soda, A.D. Noble, S. Suzuki, R. Simmons, L. Sindhusen, S. Bhuthorndharaj (2006), “Co-composting of acid waste bentonites and their effects on soil properties and crop biomass”, *Journal of Environmental Quality*, **35**, pp.2293-2301.
- [7] A.E. Manue, E.L. Periago, J.C. Nóvoa-Muñoz, A. Torrado-Agrasar, and J. Simal-Gándara (2007), “Treatment of an acid soil with bentonite used for wine fining: effects on soil properties and the growth of *Lolium multiflorum*”, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, pp.7541-7546.
- [8] A.Z.A. Hassan and Abdel Wahab M. Mahmoud (2013), “The combined effect of bentonite and natural zeolite on sandy soil properties and productivity of some crops”, *Topclass Journal of Agricultural Research*, **1(3)**, pp.22-28.
- [9] O. Semalulu, M. Magunda, D.N. Mubiru (2013), “Use of Ca-bentonite to ameliorate moisture and nutrient limitations of sandy soils in drought stricken areas”, *Uganda Journal of Agricultural Sciences*, **14(2)**, pp.49-59.
- [10] O. Semalulu, M. Magunda và D.N. Mubiru (2015), “Amelioration of sandy soils in drought stricken areas through use of Ca-bentonite”, *Uganda Journal of Agricultural Sciences*, **16(2)**, pp.195-205.
- [11] N. Karbout, M. Moussa, I. Gasmi, H. Bousnina (2015), “Effect of clayamendmenton physical and chemical characteristics of sandy soil in arid areas: the case of ground south - eastern Tunisian”, *App. Sci. Report*, **11(2)**, pp.43-48.
- [12] S. Sithaphanit, R.W. Bell, V. Limpinuntana (2010), “Effect of clay amendments on nitrogen leaching and forms in a sandy soil”, *19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World*, pp.107-110.
- [13] H.Y. Reguieg, M. Belkhdja, A. Chibani (2011), “Effect of bentonite on the sandy soils of arid regions: study of behavior of an association of wheat and chickpea”, *Journal of Environmental Science and Engineering*, **5**, pp.1668-1677.
- [14] T. Aamir Jawad, A. Mohammed Baqir (2009), “Improvement of sandy soil properties by using bentonite”, *Kufa Journal of Engineering*, **1(1)**, pp.29-39.
- [15] L. Zhou, J.H. Liu, B.P. Zhao, A. Xue, G.C. Hao (2016), “Effects of soil amendment on soil characteristics and maize yield in Horqin Sandy Land”, *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, **41**, pp.1-12.

Nghiên cứu đặc điểm hình thái quần thể cá Măng sữa *Chanos chanos* (Forsskal, 1977) ở vùng biển đông nam Việt Nam

Nguyễn Thị Mỹ Dung^{1,2}, Nguyễn Phú Hòa^{2*}, Phan Quỳnh Trâm^{3,4}

¹Trường Cao đẳng Sư phạm Bà Rịa - Vũng Tàu

²Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh

⁴Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 12/6/2020; ngày chuyển phản biện 15/6/2020; ngày nhận phản biện 16/7/2020; ngày chấp nhận đăng 24/7/2020

Tóm tắt:

Để mô tả đặc điểm hình thái học, so sánh và phân nhóm kiểu hình quần thể cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam, nhóm nghiên cứu đã thu thập 200 mẫu cá Măng sữa có chiều dài tiêu chuẩn $SL \geq 200$ mm trên khu vực 6 tỉnh/thành phố ven biển từ Bình Định đến Bà Rịa - Vũng Tàu, sau đó tiến hành phân tích 10 tính trạng chất lượng, 25 tính trạng số lượng và tỷ lệ hình thái học, so sánh dựa trên phương pháp lập bảng và đồ thị phân tán. Với giá trị $k=0,02$ và $0,0211$ cho thấy, quần thể cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam cùng nguồn gốc phát sinh với quần thể cá Măng sữa Philippines. Kết quả SL/BD là 3,89 (cao hơn so với tỷ lệ tiêu chuẩn là 3,5), thể hiện cơ thể cá có cấu trúc thon dài điển hình cho nhóm “Kiểu hình thông thường” (Normal type). Kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái cấu tạo ngoài khẳng định, quần thể cá Măng sữa *Chanos chanos* (Forsskal, 1977) thuộc nhóm “Kiểu hình thông thường”, được nuôi phổ biến nhất hiện nay.

Từ khóa: cá Măng sữa *Chanos chanos*, đặc điểm hình thái học, kiểu hình “Normal type”, tỷ lệ hình thái học, vùng biển đông nam Việt Nam.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Nghề nuôi cá Măng sữa hiện phát triển rất mạnh ở khu vực Đông Nam Á, điển hình như Indonesia với 66% diện tích mặt nước được thả nuôi [1] và Philippines với trên 3.200 ha [2]. Tại Đài Loan, cá Măng sữa là loài nuôi chính trong ngành sản xuất thủy sản, với sản lượng hàng năm đạt 60.000 tấn, phục vụ tiêu dùng nội địa và xuất khẩu sang Mỹ và các nước Trung Đông [3]. Thống kê cho thấy, sản lượng cá Măng sữa toàn cầu năm 2019 đạt 2,27 triệu tấn, trong đó Indonesia có sản lượng cao nhất thế giới, đạt 672,2 ngàn tấn (chiếm 59,3%), Philippines với 392,91 ngàn tấn (chiếm 34,6%), Đài Loan đứng thứ 3 với 53,55 ngàn tấn (chiếm 4,7%), Mexico đứng thứ 4 với 10,67 ngàn tấn (chiếm 0,9%), phần còn lại là của các quốc gia khác như Singapore, Malaysia, Tanzania...[4]. Nghề nuôi cá Măng sữa hiện đã phát triển ở Ấn Độ, Solomon, Tanzania, Kenya, Haiti và một số quần đảo ở Thái Bình Dương như Kiribati, Nauru, Palau, Cooks và được đánh giá là có khả năng mang lại thu nhập tốt, có tính bền vững cao [5]. Việt Nam là vùng phân bố tự nhiên với mật độ cao của cá Măng sữa, có nhiều ưu thế trong phát triển nghề nuôi, đặc biệt ở khu vực ven

biển từ Bình Định đến Bà Rịa - Vũng Tàu [6], nhưng hiện chưa có tên trên bản đồ vùng nuôi cá Măng sữa của thế giới.

Họ cá Măng biển *Chanidae* là một trong bốn họ thuộc Bộ cá Vây tia *Gonorynchiformes*, chia thành 2 phân họ là *Rubiesichthyinae* (đã tuyệt chủng) và *Chaninae*. Phân họ *Chanidae* gồm 4 họ, trong đó 3 họ đã tuyệt chủng là *Dastilbe*, *Parachanos* và *Tharrhias*, chỉ còn 1 họ cá Măng *Chanos* với 1 loài duy nhất là cá Măng sữa *Chanos chanos*. Do mọi thành phần phân loại đều đã tuyệt chủng vào khoảng đầu kỷ phần trắng (Cretaceous), nên cá Măng sữa được các nhà khoa học thuộc Hội đồng Bảo tàng Anh đưa vào danh sách hóa thạch sống của thế giới, là loài duy nhất còn tồn tại cho đến hiện nay của cả họ cá Măng biển *Chanidae* [7]. Cá Măng sữa được xếp vào nhóm có nguy cơ tuyệt chủng rất cao (very high vulnerability), mức điểm xếp thứ 76/100 trong mô hình tính mức độ đe dọa tuyệt chủng [8]. Quần đàn cá Măng sữa tự nhiên ở Việt Nam hiện đã suy giảm nghiêm trọng, số lượng cá trưởng thành ngoài tự nhiên ngày càng cạn kiệt, phân hạng bảo vệ là VU A2d [9]. Cá Măng sữa được đưa vào danh mục nguồn gen quý hiếm trong cơ sở dữ liệu nguồn lợi thủy sản toàn quốc, thuộc nhóm đối tượng

*Tác giả liên hệ: Email: phuhoa@hcmuaf.edu.vn

Study morphology of Milkfish *Chanos chanos* (Forsskal, 1977) population in the southeastern sea region of Vietnam

Thi My Dung Nguyen^{1,2}, Phu Hoa Nguyen^{2*},
Quynh Tram Phan^{3,4}

¹Ba Ria - Vung Tau College of Education

²Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh city

³Ho Chi Minh city University of Education

⁴Institute of Tropical Biology,
Vietnam Academy of Science and Technology

Received 12 June 2020; accepted 24 July 2020

Abstract:

To describe the morphological characteristics, compare and group the phenotypic of the Milkfish population in the southeastern sea region of Vietnam, the authors collected 200 samples of Milkfish with standard length $SL \geq 200$ mm, in 6 coastal provinces from Binh Dinh to Ba Ria - Vung Tau, then analysed 10 quality traits, 25 quantitative traits and biometric rate. Comparisons were based on the method of tabulation and scatter graphs. The values $k=0.02$ and 0.0211 , suggested that the Milkfish population in the southeastern sea region of Vietnam has the same origin as the Milkfish population in the Philippines. The SL/BD result is 3.89 (higher than the standard ratio of 3.5) showing that the fish's body has a typical elongated structure for the "Normal type" group. Research results of external morphological characteristics confirmed that Milkfish *Chanos chanos* (Forsskal, 1977) population belongs to the "Normal type" group, which is currently the most popular cultured species.

Keywords: Milkfish *Chanos chanos*, morphological characteristic, morphological ratio, "Normal type" phenotypic, the southeastern sea region of Vietnam.

Classification number: 4.5

cần phải bảo tồn và phát triển (Quyết định số 188/QĐ-TTg ngày 13/2/2012 của Thủ tướng Chính phủ về việc phê duyệt Chương trình bảo vệ và phát triển nguồn lợi thủy sản đến năm 2020). Từ cơ sở này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đặc điểm quần thể cá Măng sữa ở vùng biển đông nam nhằm mục tiêu phân tích đặc điểm hình thái học, so sánh và phân nhóm kiểu hình cá Măng sữa, qua đó đóng góp cơ sở dữ liệu định loại trong việc nghiên cứu bảo tồn tại Việt Nam.

Nội dung nghiên cứu

Đặc điểm hình thái học của cá Măng sữa

Cá Măng sữa trên thế giới gồm 3 nhóm kiểu hình, hai nhóm kiểu hình cá vàng (Goldfish type) và kiểu hình cá mập (Shad type) ít phổ biến, kiểu hình thông thường (Normal type) là phổ biến nhất, có giá trị trong phát triển nghề nuôi do tỷ lệ đầu và đuôi nhỏ trong tổng trọng lượng thân [10]. Cá Măng sữa có hình thái hơi giống cá Đồi, cá Chét ở đặc điểm thân thon dài, màu trắng bạc, phủ vảy tròn. Tại Việt Nam, cá Măng sữa rất dễ bị nhầm lẫn với cá Măng nhồng, là loài cá thân dài, miệng rộng, tính ăn động vật và thường gây hại cho ao nuôi do ăn tôm, cá giống. Tiến hành thu thập 200 mẫu cá, có chiều dài tiêu chuẩn SL (Standard length) từ 200 mm trở lên, đây là kích cỡ biểu hiện đầy đủ đặc điểm hình thái đặc trưng của cá Măng sữa [11]. Thời gian thu mẫu từ tháng 5 đến tháng 10/2016. Mẫu được thu theo các hình thức: (1) Đặt hàng ghe lưới giã cào; (2) Thu mua trực tiếp từ chợ, điểm tập kết cá; (3) Thu mua trực tiếp từ các ao nuôi tôm có cá Măng sữa tự nhiên theo con nước vào sống lẫn trong ao. Khu vực thu mẫu là vùng biển đông nam Việt Nam, gồm 6 tỉnh Bình Định, Phú Yên, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Bình Thuận và Bà Rịa - Vũng Tàu. Mẫu được bảo quản trong thùng xốp ướp đá lạnh, nhiệt độ duy trì khoảng $4^{\circ}C$, chuyển về Phòng thí nghiệm sinh học, Trường Cao đẳng Sư phạm Bà Rịa - Vũng Tàu. Xác định mẫu dựa trên khóa phân loại cá Măng sữa [12] và so sánh mẫu vật lưu trữ tại Viện Sinh học Nhiệt đới (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam). Mô tả hình thái học của cá Măng sữa dựa trên phân tích tính trạng chất lượng, từ tổng thể đến chi tiết, theo tài liệu hướng dẫn kỹ thuật [13]. Thông tin mô tả gồm màu sắc, hình dáng, đánh dấu sự có mặt hoặc không có mặt các đặc điểm ngoại hình đặc trưng.

Sau khi phân tích, chọn các mẫu vật tiêu biểu nhất để lưu trữ. Mẫu được rửa sạch, ngâm trong dung dịch định hình là Ethanol 80% trong 7 ngày. Sau đó chuyển qua lưu trữ trong Bôcan, với dung dịch bảo quản là Ethanol 60%. Lưu giữ tại Phòng thí nghiệm sinh học, Trường Cao đẳng Sư phạm Bà Rịa - Vũng Tàu.

Đặc điểm kiểu hình quần thể cá Măng sữa

Việc phân tích tính trạng số lượng cá Măng sữa (có hiệu chỉnh theo mục tiêu nghiên cứu) được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp phân tích tính trạng số lượng của cá Măng sữa.

STT	Tính trạng	Phương pháp
1	Chiều dài miệng - đuôi SL (Standard length)	Đo từ điểm lồi nhất phía trước miệng cá đến điểm chính giữa gốc vây đuôi
2	Chiều dài miệng - vây hậu môn SA (Length snout - ana fin origin)	Đo từ điểm lồi nhất phía trước miệng cá đến gốc vây hậu môn
3	Chiều dài miệng - vây bụng SP (Length snout - pelvic fin origin)	Đo từ điểm lồi nhất phía trước miệng cá đến gốc vây bụng
4	Chiều dài miệng - vây ngực SPc (Length snout - pectoral fin origin)	Đo từ điểm lồi nhất phía trước miệng cá đến gốc vây ngực
5	Chiều dài miệng - vây lưng SD (Length snout - dolsar fin origin)	Đo từ điểm lồi nhất phía trước miệng cá đến gốc vây lưng
6	Chiều dài đầu HL (Head length)	Đo từ điểm lồi nhất phía trước miệng cá đến phần lồi nhất của nắp mang
7	Chiều dài mõm SnL (Snout length)	Đo từ điểm lồi nhất phía trước miệng cá tới mép phía ngoài cùng của mắt
8	Chiều dài sau mắt PoL (Postorbital length)	Đo từ mép phía trong cùng mắt đến điểm đầu cùng nắp mang
9	Chiều dài mắt OL (Orbital length)	Đo đường kính mắt, từ mép phía ngoài cùng đến mép phía trong cùng
10	Độ cao đuôi CD (Caudal depth)	Đo từ điểm cao nhất đến điểm thấp nhất theo chiều thẳng đứng của đuôi
11	Độ cao thân BD (Body depth)	Đo độ cao thân theo chiều thẳng đứng tại điểm lồi nhất trên thân cá
12	Chiều dài gốc vây lưng LDb (Length dolsar fin base)	Đo từ điểm đầu gốc vây lưng đến điểm cuối gốc vây lưng
13	Chiều dài gốc vây hậu môn LAB (Length anal fin base)	Đo từ điểm đầu gốc vây hậu môn đến điểm cuối gốc vây hậu môn
14	Chiều dài gốc vây bụng LPb (Length pelvic fin base)	Đo từ điểm đầu gốc vây bụng đến điểm cuối gốc vây bụng
15	Chiều dài gốc vây ngực LP (Length pectoral fin base)	Đo từ điểm đầu gốc vây ngực đến điểm cuối gốc vây ngực
16	Độ rộng đầu HW (Head width)	Đo từ phần lồi nhất của nắp mang bên này sang nắp mang bên kia
17	Độ rộng mũi NW (Nares width)	Đo từ mép ngoài lỗ mũi bên này sang mép lỗ mũi bên kia
18	Độ rộng khung xương dưới mắt IoW (Bony interorbital width)	Đo từ mép phía dưới cùng mắt bên này đến phía dưới cùng mắt bên kia
19	Chiều dài hàm trước pML (Premaxilla length)	Đo từ mép mõm trên đến đường nối giữa 2 lỗ mũi
20	Số tia vây ngực PtR (Pectoral - fin ray)	Đếm số tia vây ngực
21	Số tia vây bụng PvR (Pelvic - fin ray)	Đếm số tia vây bụng
22	Số tia vây hậu môn AR (Anal - fin ray)	Đếm số tia vây hậu môn
23	Số tia vây lưng DR (Dolsar - fin ray)	Đếm số tia vây lưng
24	Vây đường bên có lỗ SpP (Pored lateral line scales)	Đếm số vây đường bên có lỗ
25	Vây dọc gốc vây lưng SpD (Scales along the base of dolsar fin)	Đếm số vây theo đường thẳng từ gốc phía trước tới gốc phía sau vây lưng

Kỹ thuật đo lường các chỉ tiêu hình thái dựa theo hướng dẫn [14]. Sử dụng thước đo bằng có độ chính xác đến 1 mm, đo ở trạng thái giãn cơ (vuốt dọc thân cá vài lần trước khi đo), vây xuôi, một người đo và một người ghi kết quả. Đo lần lượt toàn bộ cá thể, sau đó bắt ngẫu nhiên 3 cá thể đo lặp lại để kiểm tra tỷ lệ sai số đo đạc, nếu trung bình sai số vượt quá 5% thì phải tiến hành đo lại.

Số liệu đo lường được sử dụng để tính các tỷ lệ hình thái học, lập biểu đồ phân tán giá trị trung bình, tính hệ số góc đồ thị để đánh giá mức độ tương đồng kiểu hình so với một số quần thể cá Măng sữa khác trên thế giới.

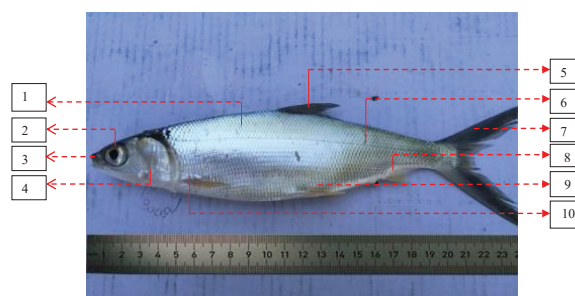
Phân nhóm kiểu hình quần thể cá Măng sữa

Để phân nhóm kiểu hình quần thể, tiến hành lập bảng so sánh tỷ lệ sinh trắc học với kết quả, đối chiếu hình ảnh mẫu thu thập với 3 nhóm kiểu hình được thực hiện theo [15-19].

Kết quả và thảo luận

Hình thái học của cá Măng sữa

Từ 200 mẫu cá Măng sữa thu thập tại vùng biển đông nam Việt Nam, chúng tôi đã phân tích 10 tính trạng chất lượng biểu thị đặc điểm hình thái học bên ngoài, thể hiện trong hình 1.

**Hình 1. Các chỉ tiêu mô tả hình thái học cá Măng sữa.**

1 - Cơ thể, 2 - Mắt, 3 - Miệng, 4 - Nắp mang, 5 - Vây lưng, 6 - Đường bên, 7 - Vây đuôi, 8 - Vây hậu môn, 9 - Vây bụng, 10 - Vây ngực.

Hình 1 thể hiện cá Măng sữa có cơ thể thon dài, nhọn ở 2 đầu, có màu trắng ở bụng, màu xám bạc ở 2 bên lưng, xanh dương thẫm ở phần lưng và xanh ô liu (xanh hơi vàng) ở phần đầu. Mắt cá lớn, có màng mỡ bao phủ, độ dày màng mỡ tăng dần theo độ tuổi cá. Mắt nằm trong hốc mắt lớn, xung quanh có một viền tròn trong suốt. Cá không có râu, miệng nhỏ, không răng, mõm ngắn và rộng. Nắp mang mỏng, có riềm phủ bên ngoài. Cá có vây đuôi lớn, màu xanh thẫm, xẻ thùy sâu ở giữa, gốc vây đuôi có 2 vây đuôi dài. Vây lưng màu xanh ô liu, có vây bẹ ôm gốc vây. Vây gốc vây lưng lớn, xếp chồng khít, vây cuối cùng to hơn các vây khác, kéo dài vượt quá chót tia vây cuối. Vây ngực màu vàng, gốc vây có vây nách, tia vây ngực từ thứ nhất đến thứ 6 dần chuyển sang màu xanh thẫm. Vây bụng màu vàng,

gốc vây có vây bẹ, tia vây bụng từ thứ nhất đến thứ 4 dần chuyển sang màu xanh nhạt. Vây hậu môn màu vàng, gốc vây có vây bẹ, tia vây hậu môn từ thứ nhất đến thứ 3 dần chuyển sang màu xanh thẫm. Vây cá hình tròn, kích thước nhỏ và mỏng. Góc vây yếu, rất dễ bong tróc khỏi bề mặt da. Vây đường bên rõ ràng, kéo dài từ đầu cung mang, kết thúc ở điểm chính giữa vây đuôi.

Kiểu hình quần thể Măng sữa

Kết quả nghiên cứu 25 tính trạng số lượng của loài cá Măng sữa được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích tính trạng số lượng của quần thể cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam.

Tính trạng	Nhỏ nhất	Lớn nhất	Dạng thể hiện số liệu
SL	200 mm	415 mm	270,3±52,4 mm
SA	162 mm	383 m	230,1±47,2 mm
SP	105 mm	237 mm	153,4±29,9 mm
SPc	46 mm	103 mm	65,8±13,0 mm
SD	93 mm	217 mm	137,6±27,6 mm
HL	46 mm	101 mm	65,5±12,7 mm
SnL	10 mm	21 mm	13,6±2,6 mm
PoL	22 mm	50 mm	32,3±6,3 mm
OL	14 mm	29 mm	19,3±3,7 mm
CD	72 mm	149 mm	98,8±19,1 mm
BD	49 mm	112 mm	70,7±14,1 mm
LDb	24 mm	57 mm	36,2±7,3 mm
LAB	13 mm	28 mm	17,7±3,5 mm
LPb	7 mm	16 mm	10,1±2,1 mm
LP	7 mm	18 mm	11,0±2,3 mm
HW	58 mm	125 mm	81,3±15,7 mm
NW	13 mm	28 mm	18,4±3,6 mm
IoW	24 mm	51 mm	33,9±6,6 mm
pML	9 mm	31 mm	14,9±5,3 mm
PtR	15 tia	17 tia	15,9±0,8 tia
PvR	10 tia	12 tia	11,0±0,8 tia
AR	8 tia	10 tia	9,0±0,8 tia
DR	11 tia	14 tia	12,7±1,0 tia
SpP	69 vây	98 vây	82,2±8,7 vây
SpD	10 vây	16 vây	13,6±1,6 vây

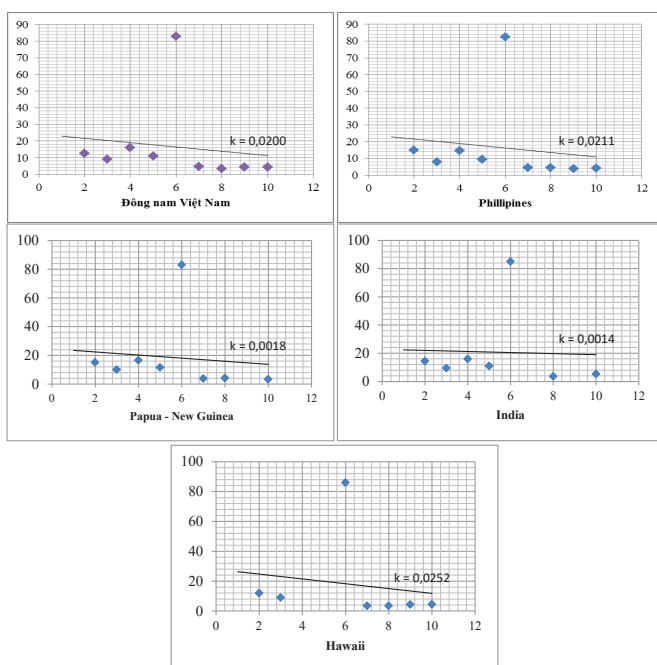
Bảng 2 thể hiện kết quả thu thập mẫu khảo sát, gồm các cá thể cá Măng sữa có chiều dài (SL) từ 200-415 mm. Cơ thể cá có hình dạng thuôn dài, thích hợp với lối sống thiên về tập tính di cư. Đầu cá (HL) ngắn, có tỷ lệ chiều dài so với độ rộng đầu (HL/HW) là 0,81. Mắt cá lớn, tỷ lệ chiều dài đầu so với đường kính mắt (HL/OL) là 3,39. Độ rộng khung xương dưới mắt (IoW) ở cá giai đoạn 200 mm gần tương đương với chiều dài sau mắt, cá càng lớn thì chiều dài càng tăng nhanh hơn. Góc vây lưng nằm chính giữa cơ thể, tỷ lệ SD/SL=0,50. Tỷ lệ SPc/SL=0,24 cho thấy, phần đầu chiếm tỷ lệ gần 25%. Tỷ lệ SA/SL=0,85 cho thấy, phần đuôi chiếm tỷ lệ khoảng 15%, Như vậy phần thân giữa của cá khá lớn, chiếm tỷ lệ khoảng 60% trong tổng trọng lượng toàn thân.

Tính tỷ lệ hình thái học nhằm đối chiếu đặc điểm kiểu hình của quần thể cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam với các khu vực khác trên thế giới, kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm kiểu hình cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam so với các khu vực khác trên thế giới.

Đặc điểm	Đông nam Việt Nam	Philippines [15]	Hawaii [16]	India [17]	Papua New Ghine [18]
DR	11-14	10-14	12	13-16	13-17
AR	8-10	7-9	9	9-10	9-11
PtR	15-17	13-16		16	16-17
PvR	10-12	9-10		11	11-12
SpP	69-98	77-88	86	80-90	75-91
HL/SnL	4,82	4,4	3,5		3,2-4,5
HL/OL	3,39	4,42	3,5	3,5-3,8	3,5-4,8
HL/pML	4,39	4,01	4,3		
SL/HL	4,13	4,26	4,4	5,2-5,5	3,0-3,6

Bảng 3 cho thấy, kiểu hình của các quần thể cá Măng sữa trên thế giới có mức độ tương đồng cao. Phản ánh đúng kết quả nghiên cứu của [11], cho rằng cá Măng sữa là một trong số ít loài sinh vật biển có dòng gen được duy trì ở mức tốt. Cá gần như không biến đổi kiểu hình theo vĩ độ, khoảng cách gen trung bình (thể hiện độ đa dạng của mỗi gen trên toàn bộ bộ gen) trong cùng quần thể là 0,0001, giữa các quần thể là 0,0033; tần suất xuất hiện biến dị của cá Măng sữa rất thấp, chỉ 1/10.000 km phân bố theo kinh độ. Mức độ phân tán tỷ lệ hình thái học trung bình của các quần thể cá Măng sữa được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Đồ thị phân tán tỷ lệ hình thái học của các quần thể cá Măng sữa.

Hình 2 thể hiện giá trị R^2 của quần thể cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam là 0,02, tương đồng ở mức cao nhất với giá trị R^2 của quần thể cá Măng sữa ở Philippines là 0,0211. Giá trị hệ số góc R^2 thể hiện độ phân tán của hai đồ thị trùng khớp lên tới 94,8%. Do vùng thu mẫu ở vùng biển đông nam Việt Nam nằm trong khoảng từ 14° vĩ Bắc đến 10° vĩ Nam, hoàn toàn tương thích với vị trí địa lý của các điểm thu mẫu thuộc miền trung Philippines, nên theo chúng tôi, 2 quần thể cá Măng sữa này có cùng nguồn gốc phát sinh. Mặc dù số liệu cho thấy có sự khác biệt giữa giá trị SpP lớn nhất và nhỏ nhất, là 69-98 so với 77-88, nhưng nguyên nhân có thể do kích cỡ cá đưa vào phân tích kiểu hình của chúng tôi đa dạng hơn, dao động từ 200-415 mm SL, so với kích cỡ mẫu là 225-295 mm SL.

Phân nhóm kiểu hình quần thể cá Măng sữa

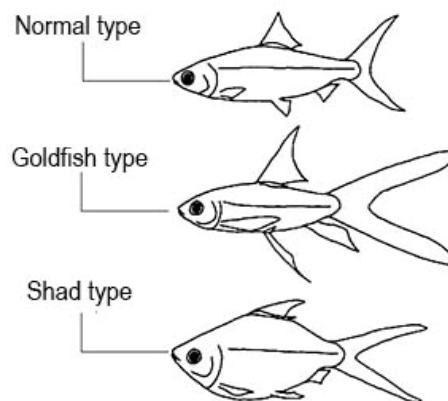
Kết quả phân nhóm kiểu hình cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam so với kết quả của [15] được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Phân nhóm kiểu hình cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam so với các nhóm khác.

Đặc điểm	Đông nam Việt Nam	Kiểu hình thông thường	Kiểu hình cá vàng	Kiểu hình cá mập
SL/HL	4,13	3,7	3,5	3,2
SL/SD	1,96	1,9	1,9	1,8
SL/SA	1,17	1,2	1,2	1,2
SL/SP	1,76	1,7	1,7	1,6
HL/SnL	4,82	4,3	5,8	3,4

HL/OL	3,39	4,0	3,7	3,9
HL/pML	4,39	4,0	5,8	6,3
SL/BD	3,89	3,6	3,5	2,0
FL (mm)	272,3	245	195	258

Kết quả $SL/HL=4,13$ cho thấy, cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam có tỷ lệ đầu nhỏ hơn so với các nhóm khác. Kết quả này trùng với kết quả nghiên cứu của [11] trên 17 điểm thu mẫu thuộc vùng biển Thái Bình Dương, cho rằng nhóm cá Măng sữa Philippines có đầu nhỏ hơn so với nhóm cá ở Hawaii. Các tỷ lệ SL/SD , SL/SP và SL/SA gần như tương đồng giữa bốn nhóm kiểu hình. Trong khi SL/SD và SL/SP tăng dần, thì SL/SA giảm dần theo độ tuổi, cho thấy cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam giai đoạn này đang phát triển mạnh xoang bụng và niệu sinh dục. Tỷ lệ SL/BD là 3,89, cao hơn so với tỷ lệ 3,6 tiêu chuẩn của “Kiểu hình thông thường” thể hiện cơ thể cá có cấu trúc thuần dài điển hình của nhóm này [10]. Do chiều dài FL trung bình của cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam cao nhất, các kết quả $HL/SnL=4,82$, $HL/pML=4,39$ thể hiện phần đầu có xu hướng tăng trưởng nhanh, trong khi hàm trước và mõm tăng rất chậm so với tăng trưởng chiều dài cơ thể.



Hình 3. Các nhóm kiểu hình cá Măng sữa.

(Nguồn: Sunier, 1922 [19])

Hình 3 thể hiện 3 nhóm kiểu hình cá Măng sữa hiện nay trên thế giới. Theo đó, “Kiểu hình cá vàng” có phần thân nhỏ, vây hậu môn, vây ngực và vây bụng dài, vây đuôi tương đương chiều dài cơ thể; “Kiểu hình cá mập” có phần thân cao, vây đuôi phát triển, tỷ lệ chiều dài so với độ cao thân từ 2,0-2,5; “Kiểu hình thông thường” có phần thân thuần dài, tỷ lệ chiều dài so với chiều cao từ 3,5 trở lên [15]. Đối chiếu hình ảnh cá Măng sữa trong hình 1 với hình 3 một lần nữa có thể khẳng định, quần thể cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam thuộc nhóm “Kiểu hình thông thường”, với phần vây đuôi kém phát triển hơn 2 nhóm “Kiểu hình cá vàng” và “Kiểu hình cá mập”. Tuy nhiên, tỷ lệ $HL/OL=3,39$

cho thấy, cá Măng sữa trong nghiên cứu của chúng tôi hoặc có đường kính mắt lớn hơn, hoặc có tỷ lệ đầu nhỏ hơn so với các kiểu hình còn lại [15].

Mặc dù các đặc điểm hình thái học trong nghiên cứu của chúng tôi đều cho thấy cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam thuộc “Kiểu hình thông thường” nhưng dữ liệu ở hình 1 lại cho thấy, cơ quan đường bên của cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam bắt đầu từ đầu nắp cung mang, giống với hình dạng đường bên của cá Măng sữa thuộc “Kiểu hình cá vàng” [19]. Tuy nhiên, do nghiên cứu của tác giả này chỉ khảo sát trên mẫu cá Măng sữa thu thập ở Indonesia, trong khi chưa có dữ liệu mô tả cơ quan đường bên của các quần thể cá Măng sữa thuộc nhóm “Kiểu hình thông thường” khác trên thế giới, nên chúng tôi cho rằng, có sự khác biệt về hình dạng cơ quan đường bên giữa 2 quần thể cá Măng sữa thuộc nhóm “Kiểu hình thông thường” phân bố ở vùng biển đông nam Việt Nam là tất nhiên.

Kết luận

Nghiên cứu đã mô tả chi tiết 10 đặc điểm hình thái học của cá Măng sữa tại vùng biển đông nam Việt Nam, giúp cung cấp cơ sở dữ liệu khoa học quan trọng cho công tác tư liệu hóa nguồn gen trong nhiệm vụ bảo tồn, nhân rộng nguồn gen cá Măng sữa ở Việt Nam. Các tỷ lệ hình thái học cho thấy, quần thể cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam có cùng nguồn gốc phát sinh với quần thể cá Măng sữa Philippines. So sánh hình ảnh mẫu thu thập với cơ sở dữ liệu hình ảnh phân nhóm kiểu hình cho thấy, cá thuộc nhóm phổ biến nhất là “Kiểu hình thông thường”. Vì nguồn gen của kiểu hình này đang được nuôi rất hiệu quả tại Philippines và Indonesia, tạo ra các sản phẩm phù hợp với thị hiếu của người tiêu dùng. Do đó, nghiên cứu đặc điểm hình thái quần thể cá Măng sữa ở vùng biển đông nam Việt Nam sẽ không chỉ giúp bảo tồn mà còn có giá trị trong phát triển nghề nuôi thủy sản trong nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Suharno, S. Indah and F. Firmansyah (2017), “Management of the traditional milkfish culture in Indonesia: an approach using technical efficiency of the stochastic frontier production”, *AACL Bioflux*, **10**(3), pp.1436-1444.
- [2] DOA (2010), *Fisheries Commodity Roadmap: Milkfish*, Fisheries Policy and Economics Division Bureau of Fisheries and Aquatic Resources.
- [3] M.H. Yang and I. Han (2015), *Domestic and International Market Expansion for Milkfish Sales*, Fisheries Agency, Council of Agriculture.

- [4] <https://www.tridge.com/intelligences/milkfish>.
- [5] T. Pickering, T. Hideyuki and A. Senikau (2012), *Capture-based aquaculture of Milkfish (Chanos chanos) in the Pacific Islands*, Noumea, New Caledonia: Secretariat of the Pacific Community, 56p.
- [6] Nguyễn Thị Mỹ Dung, Nguyễn Phú Hòa, Nguyễn Văn Trai (2020), “Tiềm năng của vùng biển đông nam Việt Nam trong phát triển nghề nuôi cá Măng sữa (*Chanos chanos*)”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **11**, tr.74-82.
- [7] Patterson Colin (1984), *Family Chanidae and others Teleostean Fishes as Living Fossils*, Springer-Verlag New York Inc.
- [8] William W.L. Cheung, Tony J. Pitcher, Daniel Pauly (2005), “A fuzzy logic expert system to estimate intrinsic extinction vulnerabilities of marine fishes to fishing”, *Biological Conservation*, **124**, pp.97-111.
- [9] Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách đỏ Việt Nam, Phần 1 - Động vật*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr.31.
- [10] T. Bagarinao (1994), “Systematics, distribution, genetics and life history of milkfish, *Chanos chanos*”, *Environmental Biology of Fishes*, **39**(1), pp.23-41.
- [11] G.A. Winans (1985), “Geographic variation in the milkfish *Chanos chanos*. Multivariate morphological evidence”, *Copeia*, **19**, pp.890-898.
- [12] Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia (2001), *Động vật chí Việt Nam, Tập 10 - Cá biển*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [13] A.R. Mc Cune (1981), “Quantitative description of body form in fishes: Implication for species level taxonomy and ecological influences”, *Copeia*, **4**, pp.897- 901.
- [14] C.N. Keat-Chuan, P. Aun-Chuan Ooi, W.L. Wong and G. Khoo (2017), “A review of fish taxonomy conventions and species identification techniques”, *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, **4**(1), pp.54-93.
- [15] S. Kumagai (1981), *Ecology of milkfish with emphasis on reproductive periodicity*, Terminal report to the SEAFDEC Aquaculture Department and the Japan International Cooperation Agency.
- [16] D.S. Jordan and B.W. Evermann (1973), “The shore fishes of Hawaii”, *The Aquatic Resources of the Hawaiian Islands*, U.S. Fish Comm. Bull. 23p.
- [17] F. Day (1958), *The Fishes of India, Vol. 1*, William Dawson and Sons, Ltd., London, 778p.
- [18] I.S.R. Munro (1967), *The Fishes of New Guinea*, Dept. Agriculture, Port Moresby, 650p.
- [19] A.L.J. Sunier (1922), “Contribution to the knowledge of the natural history of the marine fishponds of Batavia”, *Treubia*, **2**, pp.157-400.

Ảnh hưởng của việc loại bỏ zona pellucida đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Nguyễn Khánh Vân, Quấn Xuân Hữu, Nguyễn Thị Hương, Vũ Thị Thu Hương,
Hoàng Thị Âu, Phạm Thị Kim Yến, Phạm Doãn Lân*

Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 1/7/2020; ngày chuyển phản biện 3/7/2020; ngày nhận phản biện 30/7/2020; ngày chấp nhận đăng 10/8/2020

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc loại bỏ màng sáng (zona pellucida - ZP) đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Nghiên cứu sử dụng hai loại tế bào trứng có ZP và đã loại bỏ ZP cho quá trình tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Kết quả cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng nguyên vẹn sau loại nhân, tế bào trứng được loại nhân thành công của nhóm đã loại bỏ ZP (tương ứng là 96,19 và 86,28%) cao hơn so với nhóm có ZP (tương ứng 83,92 và 82,19%); tuy nhiên sự sai khác về tỷ lệ loại nhân thành công giữa nhóm đã loại bỏ ZP và có ZP không có ý nghĩa (tương ứng 86,28 so với 82,19%, $p>0,05$). Các tế bào trứng sau loại nhân thành công được cấy chuyển nhân tế bào soma (SCNT) lợn Ỉ, dung hợp, hoạt hóa bằng cytochalasin B (7,5 $\mu\text{g/ml}$) và nuôi *in vitro* trong môi trường PZM3 để đánh giá hiệu quả tạo phôi. Tỷ lệ phôi có phân chia và tỷ lệ tạo phôi nang của nhóm tế bào trứng đã loại bỏ ZP cao hơn có ý nghĩa so với nhóm có ZP, tương ứng là 84,98 so với 71,84% và 24,41 so với 16,03% ($p<0,05$). Kết quả cho thấy, việc loại bỏ ZP giúp nâng cao hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Từ khóa: cấy chuyển nhân tế bào soma, phôi lợn Ỉ nhân bản có zona pellucida, phôi lợn Ỉ nhân bản đã loại bỏ zona pellucida, zona pellucida.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Lợn Ỉ không chỉ có giá trị trong chăn nuôi mà còn cả trong lĩnh vực nghiên cứu y sinh. Lợn được hy vọng sử dụng trong cấy ghép nội tạng cho người vì có một số đặc điểm giải phẫu và sinh lý tương đồng với người. Polejaeva và cs (2000) [1] lần đầu tiên báo cáo về việc tạo được lợn con nhân bản bằng kỹ thuật SCNT. Từ đó đến nay đã có thêm nhiều báo cáo về việc tạo lợn biến đổi gen và lợn nhân bản, tuy nhiên hiệu quả nhân bản ở lợn vẫn thấp hơn so với các loài khác. Để nâng cao hiệu quả tạo lợn nhân bản, các nhà nghiên cứu đã cố gắng cải thiện một số yếu tố ảnh hưởng đến sự thành công của quá trình này như: loại nhân tế bào, gây động dục đồng pha, tạo phôi lợn nhân bản... Hiện nay phương pháp tạo phôi đã loại bỏ ZP được áp dụng nhằm cải thiện hiệu quả tạo phôi nhân bản ở một số động vật như bò [2], ngựa [3], lợn [4].

Phương pháp tạo phôi nhân bản từ trứng đã loại bỏ ZP là phương pháp đơn giản, hiệu quả, dễ sử dụng so với phương pháp tạo phôi nhân bản truyền thống [5]. Quá trình chuẩn bị loại nhân tế bào trứng đã loại bỏ ZP được thực hiện mà không cần nhuộm huỳnh quang đạt hiệu quả lên tới 95-100%, bảo tồn được 96-97% thể tích nguyên bào trứng sau loại nhân [6]. Tỷ lệ phôi nang nhân bản phát triển từ

cấy nhân nguyên bào trứng đã loại bỏ ZP được tạo ra bằng hoặc cao hơn so với phương pháp tạo phôi nhân bản truyền thống. Kết quả cấy chuyển phôi nhân bản vào lợn mẹ nhận phôi cũng có quy luật tương tự [7].

Tại Việt Nam, lợn Ỉ nằm trong danh mục giống vật nuôi cần được bảo tồn gấp bởi sự suy giảm nhanh về số lượng trong những năm gần đây. Tạo phôi lợn Ỉ nhân bản thành công có ý nghĩa lớn trong việc bảo tồn và gìn giữ nguồn gen lợn Ỉ cũng như đa dạng sinh học của giống lợn quý này. Mặc dù đã có công trình về tạo phôi lợn Ỉ nhân bản từ nguyên bào trứng đã loại bỏ ZP [8], nhưng chưa có công trình nào so sánh hiệu quả của việc loại bỏ hoặc không loại bỏ ZP trong quá trình tạo phôi lợn Ỉ nhân bản tại Việt Nam. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Hãng Sigma - Aldrich (Hoa Kỳ).

Chuẩn bị nguyên bào sợi lợn Ỉ

Nguyên bào sợi lợn Ỉ được thu từ mô tai lợn Ỉ thuần nuôi

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

Effect of zona pellucida removal on the development of I cloned pig embryos

Khanh Van Nguyen, Xuan Huu Quan,
Thị Hương Nguyễn, Thị Thu Hương Vũ, Thị Âu Hoàng,
Thị Kim Yến Phạm, Doan Lan Phạm*

Key Laboratory of Animal Cell Biotechnology,
National Institute of Animal Science

Received 1 July 2020; accepted 10 August 2020

Abstract:

This study aims to evaluate the effect of zona pellucida (ZP) removal on the efficiency of cloned embryos of I pig. For producing I pig cloned embryos, the authors used the oocytes with ZP and with ZP removal. The results showed that the percentage of intact oocytes after enucleation of the group with ZP removal oocytes was 96.19 and 86.28% and of the group with ZP was 83.92 and 82.19%. However, the rates of intact enucleated oocytes among these groups have no statistical significance (86.28 to 82.19% with $p > 0.05$). Enucleated oocytes were implanting somatic cell nuclear transfer, fused, activated by cytochalasin B (7.5 $\mu\text{g/ml}$), and *in vitro* cultured in PZM3 medium to evaluate the efficiency of embryogenesis. The cleavage rate and blastocyst formation of the group with ZP removal were higher than those of the group with ZP, 84.98 vs 71.84% and 24.41 vs 16.03% respectively ($p < 0.05$). The results exhibited that ZP removal improved the efficiency of producing cloned embryos of native I pig of Vietnam.

Keywords: I pig cloned embryos with zona pellucida, I pig cloned embryos with zona pellucida removal, somatic cell nuclear transfer, zona pellucida.

Classification number: 4.6

tại Trung tâm Lợn giống Dabaco (Bắc Ninh). Các mẫu mô tai lợn I được loại bỏ hết lông, mỡ thừa và cắt thành các mảnh nhỏ có diện tích khoảng 1 mm^2 và nuôi trong môi trường nuôi nguyên bào sợi DMEM có bổ sung 10% huyết thanh thai bê và kháng sinh ở điều kiện 37°C, 5% CO_2 , độ ẩm không khí bão hòa. Sau 9-10 ngày, quan sát thấy có nguyên bào sợi phát triển xung quanh mảnh mô thì loại bỏ hết các mảnh mô, thay môi trường nuôi nguyên bào sợi mới và nuôi tiếp cho tới khi các nguyên bào sợi phát triển tới >80% đáy đĩa nuôi thì cấy chuyển. Sử dụng các nguyên bào sợi ở lần cấy chuyển 5-10 cho quá trình cấy chuyển SCNT. Các nguyên bào sợi đạt tới trạng thái cấy chuyển được đồng pha chu trình tế bào về giai đoạn G0/G1 trước khi SCNT. Quá trình đồng pha được thực hiện như sau: các nguyên bào sợi được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 0,5% huyết thanh thai bê trong vòng 48h ở điều kiện 37°C, 5% CO_2 , độ ẩm không khí bão hòa. Sau 48h các tế bào sẽ được thu và sử dụng cho quá trình cấy chuyển SCNT.

Nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng lợn

Buồng trứng lợn đủ tiêu chuẩn sử dụng cho thí nghiệm được thu từ lò mổ, bảo quản trong dung dịch PBS có bổ sung kháng sinh và vận chuyển về phòng thí nghiệm ở 30-35°C trong vòng 2-3h. Sử dụng phương pháp chọc hút để thu tế bào trứng lợn từ những nang trứng có đường kính 3-6 mm trên buồng trứng. Tế bào trứng sau khi thu và lựa chọn dưới kính hiển vi soi nổi được nuôi trong đĩa 4 giếng chứa môi trường nuôi POM1 có bổ sung EGF, eCG, hCG và dbcAMP (50 tế bào trứng/giếng) trong vòng 20-22h ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , độ ẩm không khí bão hòa. Sau 20-22h, tế bào trứng được chuyển sang nuôi trong môi trường POM2 có bổ sung EGF, eCG và hCG trong vòng 20-22h ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , độ ẩm không khí bão hòa.

Loại nhân tế bào trứng lợn

Sau 40-44h nuôi thành thực *in vitro*, các tế bào trứng được chuyển sang môi trường TALP-HEPES có bổ sung 0,1% Hyaluronidase và loại bỏ toàn bộ lớp tế bào cumulus. Lựa chọn các tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* dựa vào sự xuất hiện của thể cực thứ nhất. Các tế bào trứng thành thực là các tế bào trứng có sự xuất hiện của thể cực thứ nhất. Chỉ sử dụng các tế bào trứng thành thực cho quá trình loại nhân. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hai phương pháp loại nhân khác nhau.

Loại nhân tế bào trứng lợn không có ZP: quá trình loại nhân được thực hiện theo phương pháp của Hosseini và cs (2013) [9] có cải biến. Tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* trước khi loại nhân sẽ được loại bỏ ZP và xử lý với Demecolcine. Quá trình loại bỏ ZP được thực hiện như sau: tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* được chuyển sang môi trường loại bỏ ZP có chứa 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Pronase trong vòng

3-6 phút. Sau loại bỏ ZP, tế bào trứng được chuyển sang môi trường TALP-HEPES + 10% huyết thanh thai bê. Tế bào trứng lợn đã được loại bỏ ZP sẽ được chuyển sang môi trường PZM3 có bổ sung 4 μM Demecolcine trong vòng 20-40 phút. Mục đích của việc xử lý tế bào trứng với Demecolcine nhằm đẩy phần nhân ra sát phần ngoại vi màng tế bào trứng tạo thành một khối hình nón lồi ra khi quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, qua đó giúp cho các kỹ thuật viên dễ dàng xác định vị trí của nhân tế bào trứng trong quá trình loại nhân.

Sau khi xử lý với Demecolcine, tế bào trứng được loại nhân trong môi trường TALP-HEPES có chứa 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B dưới kính hiển vi. Tế bào trứng sẽ được loại bỏ một phần nhỏ tế bào chất (5-10% thể tích tế bào trứng) có chứa hình nón lồi ra trên màng tế bào trứng bằng micro pipet dưới kính hiển vi soi nổi có độ phóng đại 100 lần.

Loại nhân tế bào trứng lợn có màng ZP: để loại nhân tế bào trứng có ZP cần phải sử dụng bộ micro pipet (pipet giữ và pipet tiêm) cùng với hệ thống máy Piezo. Tế bào trứng lợn với thể cực thứ nhất được chuyển vào môi trường loại nhân có chứa 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B. Tế bào trứng được cố định bằng một pipet giữ sao cho thể cực ở vị trí 3h. Dịch chuyển pipet tiêm tiếp xúc với ZP ở vị trí có thể cực, sau đó sử dụng máy Piezo để khoan thủng ZP tại vị trí đó. Tiếp theo, nhẹ nhàng đưa pipet tiêm xuyên vào bên trong tế bào trứng, hút phần tế bào trứng có chứa thể cực thứ nhất (lượng tế bào chất phải <30% thể tích tế bào trứng) vào bên trong pipet tiêm. Sau đó nhẹ nhàng rút pipet tiêm ra ngoài tế bào trứng và đẩy phần tế bào chất ra khỏi pipet tiêm. Các tế bào trứng sau loại nhân sẽ được chuyển vào môi trường giữ tế bào trứng để sử dụng cho quá trình cấy chuyển SCNT.

Cấy chuyển SCNT và dung hợp

Tế bào chất nhận không có ZP: tế bào trứng sau loại nhân được chuyển vào dung dịch chứa 1 mg/ml Phytohemagglutinin (PHA) trong 2-3 giây. Tiếp theo cứ một tế bào trứng nhận sẽ được dính với 1 tế bào cho (nguyên bào sợi lợn I) để tạo cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận. Các cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho được chuyển sang dung dịch dung hợp trong vòng 2-3 phút cho đến khi chìm hẳn xuống đáy đĩa thì chuyển sang buồng dung hợp có chứa môi trường dung hợp và kết nối với máy dung hợp. Cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận được dung hợp ở 1,2 kV/cm trong thời gian 30 μs .

Sau dung hợp các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận được chuyển vào môi trường PZM3 để trong tủ nuôi ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , 5% O_2 và độ ẩm không khí bão hòa. Sau 2h kiểm tra và loại bỏ các cặp đôi không dung hợp được, chỉ sử dụng các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận đã dung hợp được để hoạt hóa tái cấu trúc.

Tế bào chất nhận có ZP: quá trình cấy chuyển nhân tế bào cho vào tế bào trứng nhận có ZP được thực hiện như sau: tìm lại vị trí đã được khoan thủng trên ZP của tế bào trứng đã loại nhân, cố định tế bào trứng bằng pipet giữ, sử dụng pipet tiêm để hút một tế bào cho vào bên trong, nhẹ nhàng đưa pipet tiêm có chứa tế bào trứng vào bên trong tế bào trứng thông qua vị trí đã loại nhân trước đó và đẩy tế bào cho vào bên trong giữa tế bào trứng, nhẹ nhàng rút pipet tiêm ra khỏi tế bào trứng.

Hoạt hóa tế bào trứng sau cấy chuyển nhân tế bào cho và nuôi phôi in vitro

Tế bào trứng không có ZP sau cấy chuyển nhân: tại thời điểm 2h sau dung hợp, các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận đã dung hợp sẽ được xung điện lại ở 1 kV/cm trong thời gian 80 μs . Tiếp theo, các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận được chuyển sang môi trường hoạt hóa PZM3 có bổ sung 7,5 $\mu\text{g/ml}$ CyB trong vòng 3h ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , 5% O_2 và độ ẩm không khí bão hòa. Sau hoạt hóa, các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận (hợp tử giả định) sẽ được chuyển sang nuôi trong hệ thống microwell có chứa môi trường PZM3 ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , 5% O_2 và độ ẩm không khí bão hòa. Tại thời điểm nuôi ở ngày thứ 5 sau hoạt hóa (ngày hoạt hóa coi là ngày 0) bổ sung 10% huyết thanh thai bê vào môi trường nuôi PZM3. Kiểm tra khả năng phân chia, tạo phôi nang ở ngày thứ 2 và 7 sau hoạt hóa.

Tế bào trứng có ZP sau cấy chuyển nhân: tế bào trứng nhận có ZP sau khi được cấy chuyển nhân tế bào cho sẽ được xung điện ở 1,5 kV/cm trong thời gian 100 μs . Tiếp theo, các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận được chuyển sang môi trường hoạt hóa PZM3 có bổ sung 7,5 $\mu\text{g/ml}$ CyB trong vòng 3h ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , 5% O_2 và độ ẩm không khí bão hòa. Sau hoạt hóa, các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận (hợp tử giả định) sẽ được chuyển sang nuôi trong môi trường PZM3 ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , 5% O_2 và độ ẩm không khí bão hòa. Tại thời điểm nuôi ở ngày thứ 5 sau hoạt hóa (ngày hoạt hóa coi là ngày 0) bổ sung 10% huyết thanh thai bê vào môi trường nuôi PZM3. Kiểm tra khả năng phân chia, tạo phôi nang ở ngày thứ 2 và 7 sau hoạt hóa.

Phương pháp nhuộm Hoechst 33342

Quá trình nhuộm tế bào trứng/phôi được thực hiện như sau:

Chuẩn bị ba loại môi trường: (1) Hoechst 33342 stock: 250 μg Hoechst 33342/ml Ethanol tuyệt đối; (2) Dung dịch nhuộm tế bào trứng/phôi: 50 μl Hoechst 33342 stock + 450 μl Ethanol tuyệt đối; (3) Dung dịch rửa tế bào trứng/phôi: PBS + 0,3% PVP.

Rửa tế bào trứng/phôi trong dung dịch PBS có bổ sung 0,3% PVP; tiếp theo chuyển tế bào trứng/phôi vào dung

dịch nhuộm tế bào trứng/phôi để qua đêm ở 4°C. Chuẩn bị đĩa 4 giếng: giếng 1 chứa 500 µl Ethanol tuyệt đối; giếng 2 chứa 1 ml Glycerol. Hút tế bào trứng/phôi sau khi đã cố định trong dung dịch nhuộm tế bào trứng/phôi vào giếng 1 để rửa phôi, sau đó chuyển tế bào trứng/phôi sang giếng 2 và rửa tế bào trứng/phôi trong dung dịch Glycerol. Sau khi tế bào trứng/phôi được rửa trong Glycerol, chuyển sang lam kính, mỗi tế bào trứng/phôi một giọt và xếp hàng dọc theo chiều dọc lam kính. Đặt lam lên lam kính, soi kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excell 2010, sự sai khác có ý nghĩa được kiểm tra bằng hàm ANOVA, sự sai khác có ý nghĩa với $p < 0,05$.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả loại nhân tế bào trứng

Ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả loại nhân tế bào trứng được đánh giá dựa trên tỷ lệ tế bào trứng nguyên vẹn và không có nhân sau loại nhân. Các tế bào trứng sau loại nhân được nhuộm với Hoechst 33342 để kiểm tra hiệu quả loại nhân. Tế bào trứng được loại nhân thành công là tế bào trứng nguyên vẹn và không còn nhân sau loại nhân. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Hiệu quả loại nhân tế bào trứng có và không có ZP.

Dạng tế bào trứng	Tế bào trứng được loại nhân (n)	Tế bào trứng nguyên vẹn sau loại nhân n, %(Mean±SE)	Tế bào trứng nguyên vẹn và không còn nhân sau loại nhân n, %(Mean±SE)
Có ZP	462	386 83,92±1,32 ^a	316 82,19±1,42 ^a
Không có ZP	504	484 96,19±0,62 ^b	416 86,28±1,96 ^a

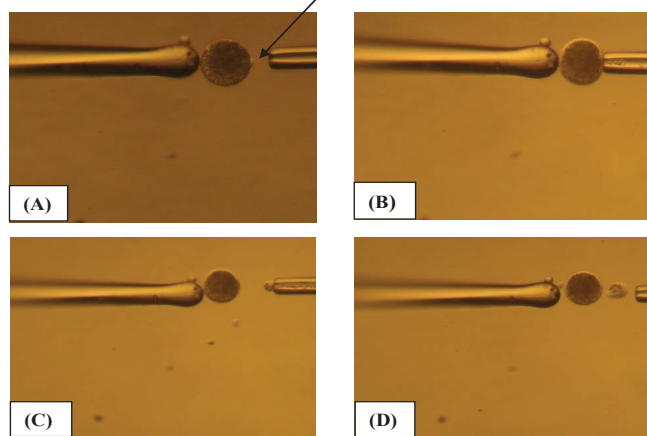
Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng nguyên vẹn sau loại nhân của nhóm đã loại bỏ ZP (96,19%) cao hơn có ý nghĩa so với nhóm có ZP (83,92%), mặc dù tỷ lệ tế bào trứng nguyên vẹn và không còn nhân sau loại nhân của nhóm đã loại bỏ ZP (86,28%) cao hơn nhóm có ZP (82,19%) không có ý nghĩa.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống máy Piezo cùng với một pipet giữ và một pipet vi thao tác để loại nhân tế bào trứng có ZP, mặc dù hệ thống Piezo được thiết kế để làm giảm thiểu những tổn thương đối với tế bào trứng trong quá trình loại nhân, nhưng để loại bỏ được nhân tế bào trứng trong quá trình loại nhân tế bào trứng có ZP thì một

lượng lớn tế bào chất sẽ bị loại bỏ cùng với thể cực (20-30% thể tích tế bào trứng) (hình 1). Đây cũng là một trong những nguyên nhân làm tổn thương màng tế bào chất của tế bào trứng, gây nên hiện tượng tế bào trứng bị tan rã ngay trong quá trình loại nhân tế bào trứng có ZP [10].

Phần tế bào chất lồi ra sau xử lý với Demecolcine có chứa nhân



Hình 1. Quá trình loại nhân tế bào trứng lợn không có ZP. (A) Tế bào trứng lợn với phần nhân lồi ra sau xử lý với Demecolcine; **(B)** Hút bỏ phần tế bào chất lồi ra có chứa nhân; **(C)** Tế bào chất có chứa nhân đã được hút bỏ; **(D)** Tế bào trứng sau loại nhân.

Việc loại bỏ ZP trước khi loại nhân tế bào trứng làm cho quá trình loại nhân trở nên đơn giản, dễ dàng, giúp tế bào trứng tránh khỏi những tổn thương trong quá trình loại nhân. Tế bào trứng sau khi được loại bỏ ZP sẽ được xử lý với Demecolcine trước khi tiến hành quá trình loại nhân. Demecolcine là chất hóa học có tác dụng đẩy phần nhân tế bào trứng ra sát với ngoại vi tế bào trứng, tạo thành một khối hình nón (hình 2), qua đó giúp cho kỹ thuật viên dễ dàng nhận biết được phần tế bào chất có chứa nhân và lượng thể tích tế bào chất bị loại bỏ trong quá trình loại nhân sẽ giảm đi đáng kể (3-5% thể tích tế bào trứng), 95-97% lượng thể tích tế bào chất được giữ lại sau loại nhân và không bị tan rã [7].

Phần tế bào chất bị loại có chứa nhân tế bào trứng



Hình 2. Loại nhân tế bào trứng lợn có ZP.

Ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

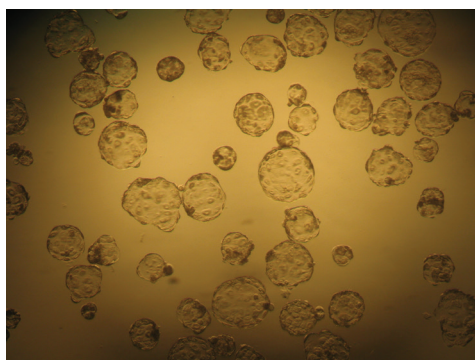
Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản được đánh giá dựa trên tỷ lệ tế bào trứng phân chia, tạo phôi nang sau cấy chuyển SCNT. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Dạng tế bào trứng	Tế bào trứng sau cấy chuyển nhân	Tế bào trứng phân chia n, %(Mean±SE)	Phôi nang n, %(Mean±SE)	Trung bình tổng số tế bào/phôi nang Mean±SE
Có ZP	301	215 71,84±1,76 ^a	48 16,03±1,56 ^a	41,38±2,01
Không có ZP	288	244 84,98±1,22 ^b	70 24,41±1,82 ^b	44,57±1,88

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng phân chia và tỷ lệ hình thành phôi nang (hình 3) của nhóm đã loại bỏ ZP là cao hơn có ý nghĩa so với nhóm có ZP (hình 4) (84,98 so với 71,84% và 24,41 so với 16,03%, $p < 0,05$). Điều này cho thấy, việc loại bỏ ZP giúp nâng cao được hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.



Hình 3. Phôi nang lợn Ỉ nhân bản không có ZP.



Hình 4. Phôi nang lợn Ỉ nhân bản có ZP.

Việc loại bỏ ZP trong quá trình tạo phôi động vật nhân bản đã được các nhà khoa học nghiên cứu. Zhang và cs (2013) [11] báo cáo về việc tạo được cừu chuyển gen có hàm lượng cao acid béo omega-3 trong sữa bằng cách loại bỏ ZP của tế bào trứng nhận trong quá trình loại nhân. Việc loại bỏ ZP có hiệu quả cao so với cấy chuyển SCNT truyền thống (cấy chuyển SCNT vào tế bào trứng nhận có ZP). Tế bào trứng nhận được loại bỏ ZP trước khi loại nhân giúp cho quá trình loại nhân trở nên dễ dàng và nâng cao hiệu quả dung hợp tế bào chất tế bào trứng nhận với tế bào soma [3]. Trong cùng một thời gian, số lượng tế bào trứng được loại nhân bằng phương pháp không ZP nhiều hơn 2-3 lần so với phương pháp loại nhân thông thường (phương pháp loại nhân có ZP) [5].

Để tạo các phôi tái cấu trúc, một nhân đã được phân lập hoặc tế bào soma sẽ được cho vào trong tế bào chất bằng vi tiêm hoặc xung điện. Đối với tế bào trứng có ZP, tế bào cho sẽ được chuyển vào trong tế bào chất bằng kỹ thuật vi tiêm. Việc tác động cơ học nhiều lần đến màng tế bào chất của tế bào trứng sẽ làm gia tăng tỷ lệ tổn thương màng tế bào chất, ảnh hưởng đến khả năng phát triển tiếp theo của tế bào trứng có ZP sau cấy chuyển SCNT.

Ngược lại, đối với tế bào trứng không có ZP, cấu trúc tế bào chất - tế bào soma thường được tạo ra dưới kính hiển vi soi nổi thông thường trong dung dịch Phytohemagglutinin. Quá trình cấy chuyển SCNT vào bên trong tế bào trứng không có ZP được thực hiện thông qua quá trình xung điện. Điều này đảm bảo cho sự nguyên vẹn của màng tế bào chất trong quá trình cấy chuyển SCNT. Sự nguyên vẹn của màng tế bào chất tế bào trứng là một trong các điều kiện quan trọng nhất đảm bảo cho sự thành công của quá trình xung điện cấy chuyển nhân tế bào cho và khả năng phát triển tiếp theo của phôi tái cấu trúc sau cấy chuyển nhân tế bào cho.

Khi SCNT được chuyển vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận, một số protein có trong nhân tế bào cho được giải phóng vào bên trong tế bào chất tế bào trứng nhận và ngược lại một số protein khác có trong tế bào chất tế bào trứng nhận được thu nhận bởi nhân tế bào cho. Nếu một lượng lớn thể tích tế bào chất bị loại bỏ đi trong quá trình loại nhân sẽ làm mất đi một lượng protein có trong tế bào chất, đó có thể là một trong những nguyên nhân làm giảm tỷ lệ phôi nang được hình thành sau cấy chuyển nhân vào tế bào trứng có ZP đã được loại nhân [12]. Trong quá trình loại nhân tế bào trứng không có ZP, lượng thể tích tế bào chất có chứa nhân tế bào trứng được loại bỏ thường ít hơn 4% thể tích tế bào trứng, qua đó tăng số lượng tế bào trứng được tái cấu trúc sau cấy chuyển nhân, nâng cao hiệu quả tạo phôi nhân bản [13].

Quá trình tái lập trình nhân tế bào cho có chứa trong phôi tái cấu trúc có liên quan đến hiệu quả dung hợp tế bào

chất tế bào trứng nhận với nhân tế bào cho. Tế bào trứng thành thực *in vitro* đã được loại nhân là nguồn nguyên liệu được sử dụng như là tế bào chất nhận. Tế bào chất của tế bào trứng ở giai đoạn MII có chứa các nhân tổ điều khiển quá trình tái lập trình nhân tế bào cho sau cấy chuyển [14]. Đối với tế bào trứng không có ZP, do lượng thể tích tế bào chất bị loại trong quá trình loại nhân ít (3-5%) nên tế bào chất của tế bào trứng nhận giữ lại được hầu hết các nhân tổ điều khiển quá trình tái lập trình nhân tế bào cho, qua đó nâng cao hiệu quả tạo phôi sau cấy chuyển SCNT. Ở lợn, nếu lượng thể tích tế bào chất bị loại bỏ trong quá trình loại nhân chiếm 20-30% thể tích tế bào trứng thì chỉ có khoảng 42-60% tế bào trứng sau cấy chuyển nhân hoàn thành được quá trình tái cấu trúc của mình; đây cũng là một trong những nguyên nhân làm giảm hiệu quả tạo phôi lợn nhân bản [15].

Kết luận

Loại bỏ ZP nâng cao hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân (SCNT); tỷ lệ tạo phôi nang lợn Ỉ nhân bản với tế bào trứng đã loại bỏ ZP đạt 24,41%; nhân bản với tế bào trứng đã loại bỏ ZP đơn giản, dễ sử dụng, nhanh chóng và hiệu quả hơn so với tế bào trứng có ZP.

Đề nghị tiếp tục nghiên cứu và sử dụng phôi lợn Ỉ nhân bản làm nguồn phôi nguyên liệu dùng cho quá trình cấy chuyển phôi tạo lợn Ỉ nhân bản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu tạo lợn Ỉ bằng kỹ thuật cấy chuyển SCNT” thuộc Chương trình trọng điểm ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] I.A. Polejaeva, et al. (2000), “Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cell”, *Nature*, **407**, pp.86-90.

[2] P.J. Booth, et al. (2001a), “Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona free manipulation technique”, *Cloning Stem Cell*, **3**, pp.139-150.

[3] C. Galli, et al. (2003), “A cloned horse born to its dam twin”, *Nature*, **424**, p.635.

[4] P.J. Booth, et al. (2001b), “Application of the zona free manipulation technique to porcine somatic nuclear transfer”, *Cloning Stem Cell*, **3**, pp.191-197.

[5] I. Lagutina, et al. (2007), “Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona - free method in cattle, horse, pig and sheep”, *Theriogenology*, **67**, pp.90-98.

[6] M.I. Prokofiev, et al. (2007), “Blind enucleation of oocytes is highly efficient in zona-free bovine cloning”, *Reprod. Fertil. Dev.*, **19**, pp.156-157.

[7] G.P. Malenko, et al. (2015), “Perspective of zona-free method use in farm animal cloning”, *Agricultural Biology*, **50(4)**, pp.420-430.

[8] Nguyễn Khánh Vân, Quàn Xuân Hữu, Vũ Thị Thu Hương, Phạm Doãn Lâm (2020), “Ảnh hưởng của Dimethylaminopurine, Cytochalasin B, Cycloheximide đến khả năng phát triển *in vitro* của phôi lợn Ỉ nhân bản không màng sáng”. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **18(1)**, tr.1-9.

[9] S.M. Hosseini, et al. (2013), “Simple, fast, and efficient method of manual oocyte enucleation using a pulled Pasteur pipette”, *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **49(8)**, pp.569-575, DOI: 10.1007/s11626-013-9630-4.

[10] T. Dominko, et al. (2000), “Dynamic imaging of the metaphase II spindle and material chromosomes in bovine oocytes implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis and successful embryogenesis”, *Biology of Reproduction*, **62**, pp.150-154.

[11] P. Zhang, et al. (2013), “Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids”, *PLOS ONE*, **8(2)**, p.e55941.

[12] K.M. Whitworth, R.S Prather (2010), “Somatic cell nuclear transfer efficiency: how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming”, *Mol. Reprod. Dev.*, **77**, pp.1001-1015.

[13] B. Oback, et al. (2003), “Cloned cattle derived from a novel zona-free embryos reconstruction system”, *Cloning Stem Cells*, **5**, pp.3-12.

[14] I. Wilmut, et al. (1997), “Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells”, *Nature*, **385**, pp.810-813.

[15] B.G. Jeon, et al. (2011), “*In vitro* developmental potential of nuclear transfer embryos cloned with enucleation methods using pre-denuded bovine oocytes”, *Reprod. Dom. Anim.*, **46**, pp.1035-1042.

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 62 - Number 9 - September 2020

Nghiên cứu nồng độ kháng nguyên CA125 ở bệnh nhân ung thư bạch cầu.

Trần Thị Phương Thảo, Bùi Kiều Trang, Hoàng Văn Tổng, Nguyễn Thị Xuân

Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong định danh loài bọ xít hút máu ở miền Trung Việt Nam.

Hồ Việt Hiếu, Nguyễn Thị Hà, Lê Thành Đô, Đoàn Đức Hùng, Nguyễn Thị Mai, Tạ Phương Mai, Phạm Anh Tuấn, Phạm Thị Khoa, Ngô Giang Liên

Phân tích mối liên quan giữa bạch cầu tinh dịch và một số chỉ số tinh dịch ở nam giới vô sinh.

Đoàn Thị Kim Phượng, Phan Văn Hường, Vũ Thị Hà, Nguyễn Hoài Bắc, Hoàng Thị Ngọc Lan

Đánh giá mối liên quan giữa hình thái phôi nang với bất thường nhiễm sắc thể.

Hoàng Minh Ngân, Nguyễn Đình Tào, Nguyễn Trung Nam, Triệu Tiến Sang

Đánh giá áp lực cơ thắt hậu môn, ngưỡng cảm nhận trực tràng và phản xạ rặn ở những bệnh nhân có rối loạn về đại tiện.

Đào Việt Hằng, Lưu Thị Minh Huế, Đào Văn Long

Đánh giá kháng nguyên tái tổ hợp hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1) trong chẩn đoán nhanh bệnh nhân nhiễm melioidosis (bệnh Whitmore) bằng kỹ thuật ELISA.

Trần Thị Lệ Quyên, Nguyễn Thị Tinh, Bùi Nguyễn Hải Linh, Đỗ Quốc Tuấn, Trần Anh Đào, Phạm Thị Huyền, Trịnh Hồ Tinh, Quế Anh Trâm, Hoàng Quang Trung, Trịnh Thành Trung

Khảo nghiệm và hoàn thiện quy trình canh tác giống lúa thuần HD11 phục vụ mục tiêu phát triển lúa gạo quốc gia.

Tạ Hồng Linh, Dương Xuân Tú, Chu Đức Hà, Trịnh Khắc Quang, Trần Đức Trung

Tuyển chọn các chủng giống nấm đùi gà *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) mới nhập nội nuôi trồng trên giá thể phụ phẩm nông nghiệp.

Nguyễn Duy Trinh, Trần Thu Hà, Lê Thanh Uyên, Phạm Xuân Hội

Hoạt tính kháng nấm của nano bạc đối với một số nấm gây bệnh trên cây trồng trong điều kiện *in vitro*.

Công Hồng Hạnh, Nguyễn Hồng Nhung, Trần Thị Hương, Trần Quế Chi, Phạm Duy Khánh, Kartsko Larisa Alexandrovna, Shukanov Vladimir Petrovich, Hoàng Anh Sơn

Hiệu quả ứng dụng bentonit Tam Bồ (Lâm Đồng) để cải tạo đất cát trồng măng tây và ngô.

Nguyễn Văn Hà, Nguyễn Hoài Châu, Nguyễn Anh Vũ, Đoàn Quang Hà

Nghiên cứu đặc điểm hình thái quần thể cá Măng sữa *Chanos chanos* (Forsskal, 1977) ở vùng biển đông nam Việt Nam.

Nguyễn Thị Mỹ Dung, Nguyễn Phú Hòa, Phan Quỳnh Trâm

Ảnh hưởng của việc loại bỏ zona pellucida đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Nguyễn Khánh Vân, Quân Xuân Hữu, Nguyễn Thị Hương, Vũ Thị Thu Hương, Hoàng Thị Âu, Phạm Thị Kim Yến, Phạm Doãn Lân

1 Cancer Antigen 125 concentration in different types of leukemia.
Thi Phuong Thao Tran, Kieu Trang Bui, Van Tong Hoang, Thi Xuan Nguyen

5 Application of molecular biology techniques in identification of kissing bugs species in Central Vietnam.
Viet Hieu Ho, Thi Ha Nguyen, Thanh Do Le, Duc Hung Doan, Thi Mai Nguyen, Phuong Mai Ta, Anh Tuan Pham, Thi Khoa Pham, Giang Lien Ngo

11 Analysis of the relationship between leucospermia and seminal parameters in infertile men.
Thi Kim Phuong Doan, Van Huong Phan, Thi Ha Vu, Hoai Bac Nguyen, Thi Ngoc Lan Hoang

15 Evaluation of the relationship between morphological blastocyst and chromosome abnormality.
Minh Ngan Hoang, Dinh Tao Nguyen, Trung Nam Nguyen, Tien Sang Trieu

20 Evaluating anal canal pressure, rectal sensations, and push maneuvers in patients with defecatory disorders.
Viet Hang Dao, Thi Minh Hue Luu, Van Long Dao

26 Evaluation of recombinant hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1) for rapid diagnosis of melioidosis (Whitmore's disease) using ELISA assay.
Thi Le Quyen Tran, Thi Tinh Nguyen, Nguyen Hai Linh Bui, Quoc Tuan Do, Anh Dao Tran, Thi Huyen Pham, Ho Tinh Trinh, Anh Tram Que, Quang Trung Hoang, Thanh Trung Trinh

32 Results of testing and construction of cultivation for the inbred rice variety HD11 towards the development of the national rice production.
Hong Linh Ta, Xuan Tu Duong, Duc Ha Chu, Khac Quang Trinh, Duc Trung Tran

36 Selection of newly imported king oyster mushroom *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) strains cultivated on agricultural byproducts in Viet Nam.
Duy Trinh Nguyen, Thu Ha Tran, Thanh Uyen Le, Xuan Hoi Pham

42 Antifungal activity of silver nanoparticles against phytopathogenic fungi *in vitro*.
Hong Hanh Cong, Hong Nhung Nguyen, Thi Huong Tran, Que Chi Tran, Duy Khanh Pham, Kartsko Larisa Alexandrovna, Shukanov Vladimir Petrovich, Anh Son Hoang

48 Effect of application of bentonite from Tam Bo (Lam Dong province) to improve sandy soil for asparagus and maize cultivation.
Van Ha Nguyen, Hoai Chau Nguyen, Anh Vu Nguyen, Quang Ha Doan

53 Study morphology of Milkfish *Chanos chanos* (Forsskal, 1977) population in the southeastern sea region of Vietnam.
Thi My Dung Nguyen, Phu Hoa Nguyen, Quynh Tram Phan

59 Effect of zona pellucida removal on the development of I cloned pig embryos.
Khanh Van Nguyen, Xuan Huu Quan, Thi Huong Nguyen, Thi Thu Huong Vu, Thi Au Hoang, Thi Kim Yen Pham, Doan Lan Pham