



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 58 - Số 10 - Tháng 10 năm 2016

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

Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

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

Nghiên cứu tổng hợp (S)-clopidogrel bisulfat từ DL-2-clorophenyl glycin

Phan Thị Trang*, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Văn Tài

Viện Dược liệu

Ngày nhận bài 15/12/2015, ngày chuyển phản biện 17/12/2015, ngày nhận phản biện 18/1/2016, ngày chấp nhận đăng 21/1/2016

(S)-clopidogrel bisulfat là thuốc kháng tiểu cầu thuộc nhóm thienopyridin, được sử dụng để ngăn ngừa hiện tượng máu đông ở bệnh động mạch vành, bệnh mạch máu ngoại biên, bệnh tai biến mạch máu não và nhồi máu cơ tim. Nhóm tác giả đã tổng hợp thành công (S)-clopidogrel bisulfat theo 5 bước đi từ nguyên liệu thương mại DL-2-clorophenyl glycin.

Từ khóa: DL-2-clorophenyl glycin, (S)-clopidogrel bisulfat, thienopyridin.

Chỉ số phân loại 3.4

Study on synthesis of (S)-clopidogrel bisulfate from DL-2-chlorophenyl glycin

Summary

(S)-clopidogrel bisulfate, a thienopyridine-class antiplatelet agent, is used to inhibit blood clots in coronary artery disease, peripheral vascular disease, cerebrovascular disease, and to prevent myocardial infarction. The authors have successfully synthesised (S)-clopidogrel bisulfate in five steps from commercial DL-2-chlorophenyl glycin.

Keywords: DL-2-chlorophenyl glycin, (S)-clopidogrel bisulfate, thienopyridine.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Theo Tổ chức Y tế thế giới, cứ 2 giây có một người chết vì bệnh tim mạch, cứ 5 giây có một trường hợp bị nhồi máu cơ tim và 6 giây lại có một trường hợp đột quỵ. Tại châu Âu, bệnh tim mạch là nguyên nhân gây tử vong cho hơn 17,5 triệu ca, chiếm 30% tổng số ca tử vong mỗi năm và là căn bệnh gây tử vong lớn nhất với 90.000 người tại Hoa Kỳ [1]. Đến năm 2015, trên thế giới có khoảng 20 triệu người chết do bệnh tim mạch và ước tính đến năm 2030 có khoảng 23 triệu người chết vì bị cơn đột quỵ đầu tiên. Tại Việt Nam, số bệnh nhân bị bệnh tim mạch có xu hướng ngày càng tăng nhanh. Hiện trên thị trường có nhiều loại thuốc có tác dụng điều trị bệnh tim mạch, một trong số hoạt chất phổ biến hiện nay là clopidogrel bisulfat, được phân phối bởi Công ty Dược phẩm Sanofi-Synthelabo với tên thương mại Plavix, có giá khá cao.

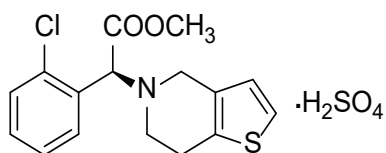
Trên thế giới đã có nhiều quy trình nghiên cứu tổng hợp clopidogrel [2-8]. Tuy nhiên, hầu hết các quy trình này chưa phù hợp với điều kiện trong nước (nguyên liệu hóa dược vẫn phải nhập khẩu với giá cao). Ở nước ta, cho đến nay chưa có một công trình nghiên cứu tổng hợp hoạt chất này. Trong khuôn khổ một đề tài khoa học cấp nhà nước giai đoạn 2011-2015, đây là lần đầu tiên công bố kết quả nghiên cứu tổng hợp (S)-clopidogrel bisulfat đi từ nguyên liệu thương mại DL-2-chlorophenyl glycin làm thuốc điều trị bệnh tim với một số cải tiến phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam.

Đối tượng, hóa chất và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Clopidogrel bisulfat có tên khoa học (S)-(+)-methyl 2-(4,5,6,7-tetrahydrothieno [3,2-c]pyridin-5-yl)-2-(2-chlorophenyl) acetat hydrogensulfat, có công thức phân tử là $C_{16}H_{16}ClNO_2S.H_2SO_4$, ở điều kiện thường là tinh thể màu trắng, nhiệt độ nóng chảy $184 \pm 3^\circ C$, và công thức cấu tạo là:

*Tác giả liên hệ: Tel: 04.38252644



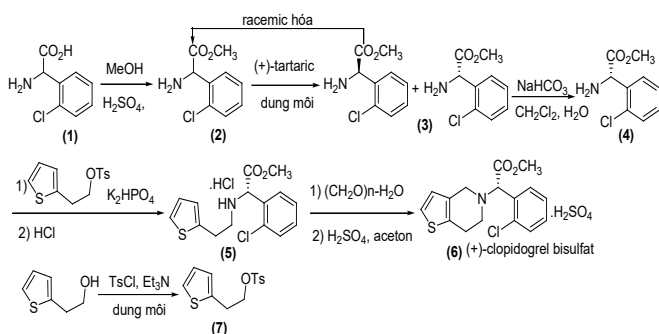
Công thức cấu tạo của (S)-clopidogrel bisulfat

Hóa chất và thiết bị nghiên cứu

Dung môi và hóa chất được cung cấp bởi các hãng: Merck, Fisher, AK Scientific hoặc Trung Quốc, được sử dụng trực tiếp mà không cần tinh chế thêm. Sắc ký lớp mỏng được tiến hành trên bản mỏng silica gel GF₂₅₄ (Merck, 40-63 μ m). Điểm chảy được đo trên máy Stuart SMP3. Phổ cộng hưởng từ ¹H-NMR và ¹³C-NMR được đo trên máy Bruker AV500. Phổ hồng ngoại IR được đo trên máy quang phổ hồng ngoại Impact 410 Nicolet. Phổ khối lượng ESI-MS được đo trên máy AutoSpec Premier.

Phương pháp nghiên cứu

Theo Sunil Sadanand Nadkarni và cộng sự [7], để tổng hợp (S)-clopidogrel bisulfat, các tác giả đã thực hiện theo theo Sơ đồ tổng hợp (S)-clopidogrel bisulfat. Bằng việc đi từ DL-2-clorophenyl glycine (1) là nguyên liệu thương mại có giá thấp, bước 1 là thực hiện phản ứng este hóa với MeOH trong môi trường H₂SO₄ thu được sản phẩm este racemic (2). Bước 2 là thực hiện phản ứng tách đồng phân (S)-(+)-2-clorophenyl glycine methyl este bằng việc sử dụng (L)-tartric thu được sản phẩm (S)-(+)-2-clorophenyl glycine methyl este (L)-tartrat (3). Bước 3 thực hiện phản ứng chuyển về dạng base tự do bằng cách sử dụng NaHCO₃ 5% trong dung môi DCM thu được sản phẩm (4). Bước 4 là thực hiện phản ứng thế S_N2 với thiophen-2-ethanol tosylat đồng thời tạo muối với HCl để tạo thành (S)-methyl 2-(2-(thiophen-2-yl)ethylamino)-2-(2-clorophenyl) acetat hydroclorid (5). Bước 5 là thực hiện phản ứng đóng vòng để tạo thành sản phẩm trung gian clopidogrel ở dạng base và tạo muối clopidogrel base với H₂SO₄ để tạo thành clopidogrel bisulfat (6).



Sơ đồ tổng hợp (S)-clopidogrel bisulfat

Thực nghiệm

Tổng hợp DL-2-clorophenyl glycine methyl este (2)

Thêm vào bình cầu đáy tròn hai cổ 1 l, chứa DL-2-clorophenyl glycine (1; 10,00 g; 53,8 mmol), thêm tiếp 400 ml MeOH và Na₂SO₄ (4,6 g; 32,3 mmol), nhỏ từ từ H₂SO₄ đặc (11,2 ml) vào bình phản ứng. Hỗn hợp được đun hồi lưu trong thời gian 24 h, kết thúc phản ứng. Thêm vào đó dung môi DCM, trung hòa hỗn hợp bằng dung dịch NH₄OH 25% đến pH=8. Chiết sản phẩm với dung môi DCM, pha hữu cơ được làm khan bằng Na₂SO₄, cô cạn dung môi dưới áp suất giảm, thu được 9,53 g sản phẩm (2) ở dạng dầu [7] với hiệu suất thu được là 89,1%.

IR (KBr, ν cm⁻¹): 3383 (NH₂); 2951 (CH₃); 1738 (C=O este); 1593; 1478; 1440 (C=C); 758 (=CH)

ESI-MS: [M+23]⁺ = 223,99

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 3,702 (3H, s, CH₃); 5,1 (1H; s, H-7); 7,35 (3H, m, H-4,5,6); 7,37 (1H, m, H-3)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ ppm): 52,4 (C-CH₃); 55,9 (C-7); 127,2 (C-5); 128,4 (C-6); 129,1 (C-4); 129,8 (C-3); 133,2 (C-1); 138,0 (C-2); 173,7 (C=O).

Tổng hợp (S)-(+)-2-clorophenyl glycine methyl este (3)

Trong bình cầu đáy tròn hai cổ 2 l, DL-2-clorophenyl glycine methyl este (2; 150 g; 746 mmol) được hòa tan bằng 1,5 l MeOH, thêm vào hỗn hợp phản ứng (L)-tartaric (112,78 g; 751 mmol), tiếp tục khuấy hỗn hợp trong thời gian 20 phút để hòa tan hoàn toàn (L)-tartaric. Làm lạnh hỗn hợp về 3-4°C trong 2,5 h, thu được kết tủa màu trắng, lọc hút chân không thu được sản phẩm thô. Kết tinh lại sản phẩm thô trong MeOH thu được 84,05 g muối (S)-(+)-2-clorophenyl glycine methyl este (L)-tartaric (3) ở dạng tinh thể màu trắng [6]. Hiệu suất 32%, độ tinh khiết quang học 99,2% (tính theo diện tích HPLC).

T_{nc}: 170-173°C [6]

IR(KBr, ν cm⁻¹): 3484 (OH), 3088 (=CH), 2934 (CH₃), 1756 (C=O este); 1668 (C=O acid), 1524, 1441 (C=C), 1070 (C-O-C)

ESI-MS: [M+H]⁺ = 202,27

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, δ ppm): 3,77 (3H, s, CH₃); 4,44 (2H, s, H-8,9); 5,6 (1H, s, H-7); 7,4 (2H, m, H-4,5); 7,45 (1H, dt, J = 6,75; 8 Hz); 7,5 (1H, d, J

= 8 Hz)

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O , δ ppm): 54,1 (CH_3); 54,2 (C-7); 72,9 (C-1',2'); 128,4 (C-4); 129,0 (C-1); 130,4 (C-5); 130,7 (C-6); 132,3 (C-3); 133,7 (C-2); 169,2 (COCH_3); 176,4 (2x C=O).

Tổng hợp (S)-(+)-2-clorophenyl glycin methyleste từ (S)-(+)-2-clorophenyl glycin

Trong bình cầu đáy tròn 1 l, có que khuấy từ, (S)-(+)-2-clorophenyl glycin methyl este (L)-tartrat (**3**, 50 g; 143 mmol) được hòa tan hoàn toàn trong 250 ml H_2O ở nhiệt độ phòng khuấy cho hỗn hợp phản ứng đồng thể, tiếp tục thêm vào đó 250 ml DCM. Hỗn hợp được làm lạnh về nhiệt độ $3-5^\circ\text{C}$, dung dịch NaHCO_3 5% được thêm vào đến khi hỗn hợp phản ứng đạt pH = 7,5-8. Kết thúc phản ứng chiết sản phẩm với dung môi DCM, làm khan pha hữu cơ bằng Na_2SO_4 , cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 26,5 g sản phẩm (S)-(+)-2-clorophenyl glycin methyl este (**4**) ở dạng dầu màu trắng, hiệu suất 92,7%.

IR (KBr, ν cm^{-1}): 3382 (NH_2), 3062 ($=\text{CH}$), 2963 (CH_3), 1736 (C=O), 1584, 1474, 1438 (C=C), 1042 (C-O-C)

ESI-MS: $[\text{M}+23]^+ = 223,99$

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2,05 (2H, s, NH_2); 3,65 (3H, s, CH_3); 4,97 (1H, s, H-7); 7,2 (2H, m, H-4,5,6); 7,34 (1H, d, $J = 7,5$, H-3)

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 51,9 (C- CH_3), 55,5 (C-7); 126,9 (C-4); 128,1 (C-5); 128,7 (C-6); 129,8 (C-3); 132,8 (C-1); 137,8 (C-2); 173,4 (C=O).

Tổng hợp thiophen-2-ethanol tosylat (7)

Trong bình cầu đáy tròn 2 cổ dung tích 1 l, có lắp sinh hàn và que khuấy từ, thêm vào đó TsCl (150 g; 787 mmol) và 350 ml DCM, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh về 5°C , thiophen-2-ethanol (71,5 ml; 637 mmol) được thêm vào và khuấy cho hỗn hợp đồng thể, thêm vào hỗn hợp phản ứng Et_3N (150 ml; 1076 mmol). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 16 h. Kết thúc phản ứng, lọc bỏ phần chất rắn không tan. Phần dịch lọc được rửa với H_2O đến pH 7-8, làm khan dung môi hữu cơ bằng Na_2SO_4 , cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 170,4 g sản phẩm thiophen-2-ethanol tosylat (**7**) ở dạng dầu [6] màu trắng, hiệu suất 93,8%.

IR(KBr, ν cm^{-1}): 3107 ($=\text{CH}$), 2958 (CH_3), 1373 (SO_2), 1601, 1459 (C=C), 1181 (C-S), 826 ($=\text{CH}$)

ESI-MS: $[\text{M}]^+ = 282$

^1H (500MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2,439 (3H, s, CH_3); 3,17 (2H,td, $J = 0,5$; 7 Hz, H-2'); 4,22 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1'); 6,79 (1H, m, H-4); 6,90 (1H, q, $J = 3,5$; 5 Hz, H-3); 7,13 (1H, dd, $J = 1$; 5 Hz, H-5); 7,31 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-3'',5''); 7,73 (2H, dd, $J = 1,5$; 6,5 Hz, H-2'',6'')

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 21,6 (C- CH_3); 29,6 (C-1'); 70,1 (C-2'); 124,4 (C-3); 126,1 (C-4); 126,9 (C-5); 127,9 (C-2'',6''); 129,8 (C-3'',5''); 133,0 (C-2); 138,1 (C-4''); 144,8 (C-1'')

Tổng hợp (S)-methyl-2-(2-(thiophen-2-yl)ethylamino)-2-(2-clorophenyl)acetat hydroclorid từ (S)-(+)-2-clorophenylglycin methyl este (5)

Trong bình cầu đáy tròn 500 ml, có lắp sinh hàn, que khuấy từ, (S)-(+)-2-clorophenylglycin methyl este (**4**; 26,5 g; 132 mmol) và thiophen-2-ethanol tosylat (48,7 g; 159 mmol) được hòa tan trong 50 ml toluen và K_2HPO_4 (69,4 g; 396 mmol) được thêm vào. Khuấy cho hỗn hợp đồng thể, tiếp tục nâng dần nhiệt độ của phản ứng lên nhiệt độ hồi lưu của hỗn hợp trong thời gian 30 h. Kết thúc phản ứng, thêm vào đó 160 ml H_2O , chiết sản phẩm với toluen thu được pha hữu cơ. Làm lạnh pha hữu cơ xuống 10°C , nhỏ từ từ dung dịch acid HCl 37% (22,5 ml) vào hỗn hợp thấy xuất hiện kết tủa, duy trì nhiệt độ này trong thời gian 1 h. Kết thúc phản ứng lọc hút chân không thu được sản phẩm thô, hòa tan sản phẩm thô trong 198 ml aceton và 12 ml HCl 37%. Nâng dần nhiệt độ của hỗn hợp lên 55°C và giữ ở nhiệt độ này trong thời gian 15 phút, làm lạnh hỗn hợp phản ứng về 15°C , thu được 29,83 g (S)-methyl-2-(2-(thiophen-2-yl)ethylamino)-2-(2-clorophenyl)acetat hydroclorid (**5**) tinh thể màu trắng, hiệu suất 67,4%.

T_{nc} : $175-178^\circ\text{C}$ [6]

$[\alpha]_{\text{D}/20} = 109,5^0$ (C = 1, MeOH) [6]

IR (KBr, ν cm^{-1}): 3434 (NH); 2897 (CH_3); 1749 (C=O); 1594; 1492 (C=C); 759 ($=\text{CH}$)

ESI-MS: $[\text{M}+2\text{H}]^+ = 311,01$

^1H -NMR (500MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,04 (1H, m, H-1'); 3,15 (1H, m, H-1'); 3,30 (2H, m, H-2'); 3,74 (3H, s, H- CH_3); 5,61 (1H, s, H-3'); 6,91 (1H, dd, $J = 3$ Hz, H-4); 6,96 (1H, q, $J = 3,5$ Hz, H-3); 7,37 (1H, dd, $J = 1$; 5 Hz, H-H-5); 7,51 (2H, m, H-4'',6''); 7,63 (1H, dd, $J = 1,5$; 7,5 Hz, H-3''); 7,77 (1H, dd, $J = 2$; 7,5 Hz, H-5'')

^{13}C -NMR (125 MHz; CDCl_3 , δ ppm): 25,8 (C- CH_3); 47,6 (C-1'); 54,4 (C-2'); 60,2 (C-3'); 125,5 (C-4); 126,7 (C-3); 127,1 (C-2); 127,7 (C-5); 128,6 (C-4''); 130,4 (C-1''); 130,9 (C-3''); 132,8 (C-5''); 134,4 (C-6''); 138,0 (C-2''); 168,4 (C=O).

Tổng hợp (+)-(S)-clopidogrel bisulfat từ (+)-methyl-2-(2-(thiophen-2-yl)ethylamino)-2-(2-clorophenyl)acetat clohidrid (6)

Trong bình cầu đáy tròn hai cổ 2 l, (+)-methyl-2-(2-(thiophen-2-yl)ethylamino)-2-(2-clorophenyl)acetat clohidric (**5**; 82,2 g; 237 mmol) và HCHO (1,23 l; 1336 mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 22 h. Thêm vào hỗn hợp phản ứng dung môi DCM, lọc bỏ phần tạp không tan, tiếp tục làm lạnh dịch lọc xuống $5-10^\circ\text{C}$ và trung hòa bằng dung dịch NaHCO_3 5% đến pH = 7-8. Chiết sản phẩm với dung môi DCM, làm khan pha hữu cơ bằng Na_2SO_4 , cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 72,5 g sản phẩm (+)-(S)-clopidogrel dầu màu vàng. Hòa tan dầu trong 1,44 l aceton, làm lạnh hỗn hợp xuống $0-5^\circ\text{C}$, thêm từ từ H_2SO_4 đặc (11,23 ml) vào hỗn hợp phản ứng, khuấy ở nhiệt độ $25-30^\circ\text{C}$ trong thời gian 30 h thấy xuất hiện tủa màu trắng, lọc và rửa kết tủa bằng aceton lạnh, thu được 73,6 g (+)-(S)-clopidogrel bisulfat (**6**) ở dạng bột màu trắng, hiệu suất 73,3%, có độ tinh khiết 99,53% tính theo diện tích pic HPLC.

T_{nc} : $184-186^\circ\text{C}$ [6]

$[\alpha]_{\text{D}/20} = 55,5^\circ$ (C=1, MeOH) [6]

IR(KBr, v cm^{-1}): 3064 (=CH); 2965 (CHO); 1740 (C=O este); 1570 (C=C); 755 (=CH)

ESI-MS: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 322,1$

^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,20 (2H, m, H-3', 4'); 3,60 (1H, d, $J = 14$ Hz, H-2'); 3,71 (3H, s, H- CH_3); 3,74 (1H, d, $J = 14$ Hz, H-2'); 4,93 (1H, s, H-5'); 6,67 (1H, d, $J = 5$ Hz, H-4); 7,05 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-5); 7,27 (2H, m, H-4'', 5''); 7,4 (1H, dd, $J = 1,5$; 7,5 Hz, H-6''); 7,71 (1H, dd, $J = 1,5$; 7,5 Hz, H-3)

^{13}C -NMR (125 MHz; CDCl_3 , δ ppm): 21,6 (C-3'); 48,2 (C-4'); 50,6 (C-2'); 52,0 (C- CH_3); 67,8 (C-5'); 122,6 (C-4); 125,1 (C-5); 127,1 (C-4''); 129,3 (C-5''); 129,7 (C-6''); 129,9 (C-3''); 131,2 (C-3); 132,3 (C-2); 133,8 (C-2''); 134,6 (C-1'').

Kết quả và bàn luận

Theo Sunil Sadanand Nadkarni và cộng sự [7],

(S)-clopidogrel bisulfat có thể được tổng hợp từ DL-2-clorophenyl glycin thông qua 5 bước. Bước 1 là thực hiện phản ứng este hóa giữa DL-2-clorophenyl glycin với MeOH vừa là tác nhân tham gia phản ứng, đồng thời cũng là dung môi để hòa tan chất đầu, trong môi trường acid H_2SO_4 đặc nhằm thúc đẩy cho phản ứng este hóa xảy ra dễ dàng hơn. Quá trình phản ứng có một phần H_2O được sinh ra, do đó để hạn chế điều này chúng tôi đã sử dụng tác nhân hút nước khá mạnh là Na_2SO_4 khan làm chuyển dịch cân bằng sang bên tạo thành sản phẩm nhằm làm tăng hiệu suất của phản ứng. Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ hồi lưu của dung môi trong thời gian 24 h, thu được sản phẩm (**2**) với hiệu suất phản ứng đạt khá cao (89,1%).

Bước 2 là thực hiện phản ứng tách đồng phân sản phẩm DL-2-clorophenyl glycin methyl este (**2**) để thu được sản phẩm (S)-(+)-2-clorophenyl glycin methyl este (**3**). Ở đây do sản phẩm (**2**) là hỗn hợp este racemic của acid amin, do đó việc tách đồng phân có thể thực hiện bằng cách sử dụng một acid yếu có thể tạo muối với acid amin thường được sử dụng là acid tartric, hơn nữa ở đây có thể dựa vào độ tan khác nhau của hai đồng phân khi tạo muối với acid tartric trong dung môi MeOH, cụ thể là với đồng phân (S)-(+)-2-clorophenyl glycin methyl este tạo muối L-tartrat ở dạng kết tủa trong dung môi MeOH ở nhiệt độ $0-5^\circ\text{C}$, đồng phân còn lại (S)-(-)-2-clorophenyl glycin methyl este tạo muối với L-tartric ở cùng nhiệt độ này. Đây cũng là một phương pháp tách đồng phân quang học phổ biến hiện nay, hiệu suất phản ứng thu được khá thấp (đạt 32%), để hạn chế việc mất mát một phần sản phẩm (**3**) còn lại trong nước cái, chúng tôi đã tiến hành thu hồi phần nước cái sau khi lọc và đã thu được sản phẩm (S)-(+)-2-clorophenyl glycin methyl este (**3**). Mặc dù ở đây hiệu suất của phản ứng tách đồng phân còn thấp, nhưng điều đặc biệt là phản ứng tổng hợp theo giai đoạn này có độ tinh khiết quang học là 99,2% (tính theo diện tích pic, HPLC).

Bước 3 là thực hiện phản ứng kiềm hóa muối acid (**3**) vừa thu được ở trên bằng cách sử dụng một số base yếu để có thể chuyển (S)-(+)-2-clorophenyl glycin methyl este về dạng base tự do. Do liên kết giữa L-tartrat và (S)-(+)-2-clorophenyl glycin methyl este (**3**) là liên kết của một acid yếu với một base yếu, do đó để thu được sản phẩm (S)-(+)-2-clorophenyl glycin methyl este ở dạng base, chỉ cần thực hiện phản ứng trong môi trường kiềm yếu. Việc sử dụng một số dung dịch base đã được chúng tôi sử dụng như là NaHCO_3

5%, Na_2CO_3 5%, NH_4OH 25% [3]. Quá trình tiến hành phản ứng được đưa về pH = 7,5-8, sản phẩm được chiết với dung môi hữu cơ là DCM, thu được (S)-(+)-2-chlorophenyl glycine methyl ester (**4**) ở dạng dầu. Kết quả khảo sát với các base trên cho thấy, với base là NaHCO_3 5% đã thu được sản phẩm với hiệu suất cao nhất là 92,7%, độ tinh khiết quang học đạt 99% (tính theo diện tích pic HPLC). Hai dung dịch kiểm còn lại cho hiệu suất phản ứng cao hơn chút ít, lần lượt là 94,5 và 94,2%, tuy nhiên độ tinh khiết quang học chỉ đạt dưới 90% (tính theo diện tích pic HPLC), điều này có thể là do hai dung dịch này có tính base mạnh hơn NaHCO_3 , quá trình kiểm hóa sản phẩm (**3**) sẽ bị racemic hóa và ảnh hưởng đến hiệu suất của phản ứng và độ tinh khiết quang học của sản phẩm.

Sản phẩm trung gian thiophen-2-ethanol tosylat (**7**) được nhóm tác giả tổng hợp thông qua phản ứng thế nucleophilin giữa thiophen-2-ethanol với 4-Toluenesulfonyl clorid (TsCl), trong dung môi DCM, xúc tác là base hữu cơ triethylamin (Et_3N), ở nhiệt độ phòng trong thời gian là 16 h, thu được sản phẩm với hiệu suất 93,8%. Ở đây, Et_3N có vai trò trung hòa phần acid HCl được sinh ra trong phản ứng tạo thành muối của $\text{Et}_3\text{N.HCl}$, làm chuyển dịch cân bằng sang bên tạo thành sản phẩm, do đó sẽ làm tăng hiệu suất của phản ứng.

Bước 4 là thực hiện phản ứng giữa thiophen-2-ethanoltosylat (**7**) với (S)-(+)-2-chlorophenyl glycine methyl ester (**4**) tạo sản phẩm (S)-methyl 2-(2-(thiophen-2-yl)ethylamino)-2-(2-chlorophenyl)acetat (**5**), phản ứng được thực hiện trong dung môi toluen, với xúc tác base KH_2PO_4 ở nhiệt độ hồi lưu trong thời gian là 30 h, thu được sản phẩm (S)-methyl 2-(2-(thiophen-2-yl)ethylamino)-2-(2-chlorophenyl)acetat (**5**) ở dạng base. Sản phẩm được acid hóa với HCl đặc thu được sản phẩm ở dạng muối, quá trình chuyển hóa sang muối sẽ tạo điều kiện dễ dàng hơn nhiều cho việc tinh chế sản phẩm vì có thể trong phản ứng vẫn còn lẫn một phần chất đầu thiophen-2-ethanoltosylat (**7**).

Bước 5 là thực hiện phản ứng ngưng tụ sản phẩm (**5**) vừa thu được với HCHO 40% đồng thời đóng vòng thu được sản phẩm clopidogrel ở dạng base, quá trình acid hóa sản phẩm clopidogrel ở dạng base bằng acid H_2SO_4 đặc trong dung môi aceton được thực hiện ngay sau đó thu được sản phẩm clopidogrel bisulfat (**6**). Ở giai đoạn này, việc tạo thành muối được thực hiện bằng cách sử dụng acid đặc H_2SO_4 . Vì thế, cần phải thực hiện ở nhiệt độ 0-5°C (vì nếu thực hiện phản ứng ở

nhiệt độ quá cao có thể làm sản phẩm bị racemic hóa và có thể sản phẩm sẽ bị than hóa trong quá trình nhỏ giọt H_2SO_4 đặc. Điều này sẽ ảnh hưởng tới chất lượng của sản phẩm cuối cùng thu được, cụ thể là gây khó khăn cho việc tinh chế sau này). Kết thúc quá trình nhỏ giọt phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 h, thu được sản phẩm clopidogrel bisulfat với hiệu suất phản ứng đạt 73,3%, có độ tinh khiết quang học 99,53% tính theo diện tích pic HPLC.

Kết luận

Từ DL-2-chlorophenyl glycine (**1**), nhóm tác giả đã tổng hợp thành công (S)-clopidogrel bisulfat (**6**), thông qua 5 bước, hiệu suất toàn bộ quy trình là 12,2%. Quá trình tổng hợp được thực hiện đơn giản, có thể áp dụng ở quy mô lớn.

Tài liệu tham khảo

- [1] Tổng quan về bệnh thiếu máu cơ tim, http://songkhoe.vn/bac-si-tu-van_tong-quan-ve-benh-thieu-mau-co-tim_480-521-50726.html (3.2.2015).
- [2] A. Burgos, I. Simpson, J.M. Herbert (2000), "Preparation of [benzene-U-C-13]-rac-clopidogrel", *J Label Compd Radiopharm*, **43**(9), p.891.
- [3] Jagadeeshwar Rao, Harikrishna Nandam, Anjireddy Redamalla, Buchi Reddy Reguri (2011), "An improved process for the preparation of clopidogrel bisulfate", *WO 2011012961A1*.
- [4] S. Kashimura, F. Kuwata, O. Ishige, H. Uyama, T. Shono, Y. Yamaguchi (1987), "Formation of a novel acyl anion equivalent by the electroreduction of oxazolinium salts", *Chem Lett*, p.1511.
- [5] V.B. Lohray, B.B. Lohray, B. Pandey (Zydu-Cadila Group) (2002), "Process for preparing clopidogrel", *WO 2002059128 A3*.
- [6] Raghumitra Alla, Venkat Reddy Alla, Ranadheer Reddy Billa, Srinivas Reddy Bodapati, Saikrishna Reddy Gudibandi, Aruna Kumari Sirigiri, Kameswara Rao Vyakaranam (2007), "Process for preparation of clopidogrel bisulfate form 1", *WO 2007094006 A1*.
- [7] Sunil Sadanand Nadkarni, Hasmukh Mathurbhai Patel (2004), "Process for preparation of clopidogrel, its salts and pharmaceutical compositions", *WO2004074215A1*.
- [8] Venkat Reddy ALLA, Kameswara Rao VYAKARANAM, Aruna Kumari SIRIGIRI, Srinivas Reddy BODAPATI, Ranadheer Reddy BILLA, Saikrishna Reddy GUDIBANDI, Raghumitra ALLA (2007), "Process for preparation of clopidogrel bisulphate form-1", *US 20070191609 A1*.

Phân lập một số hợp chất taxoid trong phân đoạn cao methanol 100% từ lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Lâm Đồng

Nguyễn Thị Nhài^{1*}, Nguyễn Thị Trúc Phương¹, Bùi Thế Vinh², Trần Công Luận²,
Hứa Hoàng Oanh³, Nguyễn Phương Dung³

¹Khoa Hóa, Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh

²Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh

³Khoa Y học Cổ truyền, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 21/12/2015, ngày chuyển phản biện 25/12/2015, ngày nhận phản biện 28/1/2016, ngày chấp nhận đăng 16/2/2016

Mục đích của nghiên cứu này là phân lập một số hợp chất taxoid trong phân đoạn cao methanol 100% từ lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở tỉnh Lâm Đồng bằng sắc ký cột với các dung môi thông thường. Từ 75 g cao methanol 100% đã phân lập được các taxoid là taxinine B (425 mg), taxuspin F (732 mg), taxchinin B (703 mg), taxuspin D (83 mg). Các taxoid được xác định cấu trúc hóa học dựa trên phân tích phổ UV-Vis, MS, NMR và so sánh với các tài liệu tham khảo.

Từ khóa: lá Thông đỏ lá dài, phân lập, taxoid.

Chỉ số phân loại 3.4

Isolation of taxoids in 100% methanol extract from the needles of *Taxus wallichiana* Zucc. cultivated in Lam Dong province

Summary

The aim of this study was to isolate taxoids in 100% methanol extract from the needles of *Taxus wallichiana* Zucc. cultivated in Lam Dong province by column chromatography with usual solvents. From 75 g of 100% methanol extract, the isolated taxoids were identified as taxinine B (425 mg), taxuspin F (732 mg), taxchinin B (703 mg), and taxuspin D (83 mg). The chemical structure of taxoids was elucidated by means of UV-Vis, IR, MS, NMR spectroscopies and comparison with reference data.

Keywords: isolate, taxoids, *Taxus wallichiana* Zucc.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Ở Việt Nam, triển vọng phát triển Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) không những trở thành một sản phẩm tốt phục vụ cho điều trị và chăm sóc sức khỏe, mà còn là một sản phẩm mang lại nguồn lợi kinh tế lớn cho đất nước. Vì vậy, việc xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm và đánh giá chất lượng Taxol® (paclitaxel) và các hợp chất taxoid làm nguyên liệu để sản xuất thuốc điều trị ung thư [1, 2] được chiết tách từ Thông đỏ Việt Nam là hết sức quan trọng và cấp bách. Đó là lý do để tiến hành nghiên cứu: “Phân lập một số hợp chất taxoid trong phân đoạn cao methanol 100% từ lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Lâm Đồng”.

Tiếp nối các nghiên cứu trước đây [3], mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất taxoid với đủ số lượng để làm chất chuẩn tập trong kiểm định Taxol® được dùng chiết xuất từ Thông đỏ Việt Nam.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Cao chiết methanol phân đoạn 100% (gọi tắt là cao MeOH 100%) từ lá Thông đỏ lá dài được trồng ở Lâm Đồng. Nguồn dược liệu đã được tiêu chuẩn hóa và được Trung tâm Trồng và chế biến cây thuốc Đà Lạt cung cấp.

Cao methanol 100% đã được chiết theo quy trình như sau: làm ẩm bột lá dược liệu và ngâm 24 giờ, chiết ngâm

*Tác giả liên hệ: Tel: 08.38352020

kiệt bằng methanol (tỷ lệ 1:6) thu được dịch chiết. Cô giảm áp dịch chiết thành dạng cao sệt, thu được cao methanol thô. Dùng cao methanol thô hòa với nước, lắc với dicloromethan, sau khi cô giảm áp dịch dicloromethan thu được cao CH_2Cl_2 . Nạp cao CH_2Cl_2 vào cột diaion HP-20 (15 x 110 cm), rửa giải lần lượt với các dung môi: nước, MeOH 10%, MeOH 60%, MeOH 80%, MeOH 100%. Dịch chiết MeOH 100% được cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao MeOH 100%.

Phương pháp nghiên cứu

Loại tạp trong cao: cao methanol 100% chiết từ lá chứa nhiều tạp chất: nhựa, diệp lục tố... Để loại tạp kém phân cực, cao methanol 100% được lắc phân bố với ether dầu hỏa nhiều lần.

Phân lập hợp chất: cao đã loại tạp được tiến hành sắc ký cột silicagel với hệ dung môi giải ly CH_2Cl_2 - acetone có độ phân cực tăng dần, thu được 5 phân đoạn. Ở phân đoạn II (hệ dung môi CH_2Cl_2 - acetone với tỷ lệ 10:5) thu được kết tinh T1. Phân đoạn III với hệ dung môi giải ly CH_2Cl_2 - acetone (100:5) thu được kết tinh T2. Phân đoạn IV với cùng hệ giải ly trên có kết tinh T3. Và ở phân đoạn V cùng hệ giải ly CH_2Cl_2 - acetone (100:5) thu được kết tinh T4. Sau đó, các kết tinh được tái kết tinh nhiều lần để tinh sạch và kiểm tra độ tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng, phát hiện bằng thuốc thử H_2SO_4 10%/EtOH 96%.

Xác định cấu trúc: dựa vào các kết quả phân tích phổ UV-Vis, MS, NMR và so sánh với tài liệu tham khảo để xác định cấu trúc các hợp chất **T1**, **T2**, **T3** và **T4**.

Kết quả và bàn luận

Phân lập hợp chất

Từ 75 g cao methanol 100% đã phân lập được 720 mg phân đoạn giàu hợp chất **T1**, 935 mg phân đoạn giàu hợp chất **T2**, 950 mg phân đoạn giàu hợp chất **T3** và 103 mg phân đoạn giàu hợp chất **T4** bằng phương pháp sắc ký cột cổ điển. Sau khi được tinh khiết hóa bằng kỹ thuật tái kết tinh nhiều lần thu được 425 mg hợp chất **T1**, 732 mg hợp chất **T2**, 703 mg hợp chất **T3** và 83 mg hợp chất **T4**.

Xác định cấu trúc

Hợp chất T1:

Hợp chất T1 kết tinh dạng tinh thể nhỏ, mịn, không màu, có ánh lấp lánh, dễ tan trong cloroform, acetonitril,

ethyl acetat, ít tan trong methanol. Sắc ký lớp mỏng bằng hệ dung môi CHCl_3 -MeOH (9:1) cho vết tắt quang ở bước sóng UV 254 nm. Hiện màu bằng H_2SO_4 10%/EtOH 96%, xuất hiện vết tròn màu nâu.

Phổ UV của **T1** trong MeOH cho đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 217 và 279,4 nm. Điều này phù hợp với các taxoid vì các taxoid có đỉnh hấp thụ cực đại trong khoảng 190-300 nm (1). Các băng hấp thụ đáng chú ý trên phổ IR của **T1**: 1684 cm^{-1} (C=O), 1634 cm^{-1} (C=C), 1132 cm^{-1} và 1070 cm^{-1} (C-O-C). Điều này phù hợp với các taxoid vì trong cấu trúc của các taxoid đều có sự hiện diện của nhóm carbonyl ester ở vị trí C5, nhóm ceton (C=O) ở vị trí C13 (1). Phổ MS - ES+ trong MeOH cho thấy ion có m/z = 687,28 với cường độ cao nhất, đây là mảnh $[\text{M}+\text{Na}]^+$, do vậy **T1** có khối lượng phân tử là 664 Dalton, có khả năng tương ứng với công thức phân tử của một hợp chất taxoid là taxinin B ($\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{O}_{11}$) [4].

Phổ ^1H -NMR cho tín hiệu cộng hưởng ứng với sự hiện diện của bốn nhóm methyl δH [1,15 (3H, s, 16-Me); 1,77 (3H, s, 17-Me); 2,38 (3H, s, 18-Me) và 1,03 (3H, s, 19-Me)] đặc trưng cho khung taxan diterpen. Bốn nhóm -OAc δH [2,08 (3H, s, 2-OAc); 2,08 (3H, s, 7-OAc); 2,08 (3H, s, 9-OAc) và 2,08 (3H, s, 10-OAc)], năm nhóm δH [1,293 (3H, s, 10-OAc)], năm proton oxymethin δH [5,63 (1H, dd, 1,5, 6,5, H-2); 5,39 (1H, s, H-5); 5,45 (1H, s, H-7); 5,94 (1H, d, 11, H-9) và 6,25 (1H, d, 10,5, H-10)], hai nhóm methylen δH [1,77 (1H, s), 2,08 (1H, m) (H-6a, H-6b)] và [2,39 (1H, s), 2,85 (1H, dd, 7, 20) (H-14a, H-14b)], hai nhóm proton methin δH [2,25 (1H, d, 7, H-1) và 3,33 (1H, d, 6)], một nhóm methylen gần carbon mang oxygen δH [4,92 (1H, s, H-20a), 5,45 (1H, s, H-20b)] và một nhóm cinnamoyl δH [6,45 (1H, d, 16, H-22), 7,69 (1H, d, 16, H-23), 7,44 (1H, m, H-4'), 7,78 (2H, d, 7, H-2', H-4' và H-3', H-5')].

Phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phổ DEPT 90 và DEPT 135 cho các mũi cộng hưởng ứng với 35 carbon bao gồm một carbon carbonyl [δC 199,3 (C-13)], bốn carbon carbonyl ester [δC 169, 3 (2-OAc); 169,7 (7-OAc); 169,7 (9-OAc); 169,2 (10-OAc)], hai nhóm carbon olefin bậc bốn [δC 150,5 (C-11) và 139,8 (C-12)], một carbon olefin bậc hai [δC 118,8 (C-20)], năm carbon bậc ba mang oxygen [δC 68,0 (C-2); 76,2 (C-5); 69,6 (C-7); 75,0 (C-9); 72,8 (C-10)], hai carbon bậc ba [δC 48,7 (C-1) và 42,0 (C-3)] và carbon bậc bốn [δC 139,8 (C-4)]. So sánh dữ liệu phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của **T1** với các chất đã được công bố thì dữ liệu

phổ của **T1** hoàn toàn trùng khớp với dữ liệu phổ của taxinin B [4].

Từ các kết quả phổ nghiệm UV-Vis, IR, MS, NMR và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất T1 được xác định là **taxinin B**.

Taxinin B còn có tên gọi khác là 7 β -acetat-*O*-taxinin A được M.C. Woods cùng các cộng sự phân lập lần đầu tiên vào năm 1968 từ lá *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. [4]. Sau đó, vào năm 1988, M.K. Yeh cùng các cộng sự cũng đã phân lập được hợp chất này từ gỗ của *Taxus mairei* [4].

Hợp chất T2:

Hợp chất T2 có dạng rắn vô định hình, màu trắng, tan trong methanol, acetonitril, cloroform. Sắc ký lớp mỏng bằng hệ dung môi CHCl₃-MeOH (9:1) cho vết tắt quang ở bước sóng UV₂₅₄ nm. Hiện màu bằng H₂SO₄ 10%/EtOH 96%, xuất hiện vết tròn màu hồng nhạt.

T2 có cực đại hấp thu tại bước sóng 266,7 nm; phù hợp với phổ UV của taxuspin F đã công bố [5, 6]. Phổ hồng ngoại của **T2** tương tự như taxuspin F [3, 5], có các đỉnh hấp thu tương ứng với các nhóm chức: 3450 cm⁻¹ (nhóm -OH), 1747 cm⁻¹ và 1679 cm⁻¹ (C=O), 1199 cm⁻¹ (C-O-C). Trên phổ MS, **T2** cho pic cao nhất tương ứng với $m/z = 557,22$ phù hợp với mảnh $[M+Na]^+$. Do vậy, **T2** có khối lượng phân tử là 534,2 Dalton, tương ứng với công thức phân tử có thể là C₂₈H₃₈O₁₀, cùng công thức phân tử với taxuspin F [5, 6].

Phổ ¹H NMR có sự hiện diện của bốn nhóm methyl [δ_H 1,74 (3H, s, 16-Me); 1,12 (3H, s, 17-Me); 2,31 (3H, s, 18-Me) và 0,98 (3H, s, 19-Me)] đặc trưng cho khung taxan diterpen. Bốn nhóm methyl của -OAc [δ_H 2,02 (3H, s, 10-OAc); 2,05 (3H, s, 7-OAc); 2,05 (3H, s, 2-OAc); 2,08 (3H, s, 9-OAc)], năm proton oxymethin [δ_H 5,6 (1H, dd, H-2); 4,22 (1H, d, H-5); 5,50 (1H, dd, H-7); 5,90 (1H, d, H-9); 6,26 (1H, dd, H-10)], hai nhóm methylen [δ_H 1,61, 1,94 (H-6a, H-6b) và 2,33, 2,77 (H-14a, H-14b)], hai proton methyl [δ_H 2,20 (1H, dd, H-1) và 3,53 (1H, d, H-3)] và một nhóm exometylen [δ_H 4,82 (1H, s, H-20a) và 5,23 (1H, s, H-20b)] tại C-4.

Phổ ¹³C-NMR, DEPT-90 và DEPT-135 cho các tín hiệu cộng hưởng với sự hiện diện của 28 nhóm tín hiệu carbon bao gồm 8 CH₃, 3 CH₂, 7 CH và 10 C bậc bốn trong đó có một carbon carbonyl [δ_C 199,4 (s, C-13)], bốn nhóm carbon carbonyl ester [δ_C 169,2 (s); 169,4 (s); 169,8 (s); 169,8 (s)], hai nhóm carbon olefin bậc bốn [δ_C 149,8 (s, C-11) và 144,7 (s, C-12)] và năm

carbon bậc ba mang oxygen [δ_C 68,9 (d, C-2); 74,5 (d, C-5); 69,5 (d, C-7); 75,1 (d, C-9) và 72,8 (d, C-10)], hai carbon bậc ba [δ_C 48,8 (C-1); 39,7 (C-3)] và carbon bậc bốn [δ_C 139,2 (C-4)]. So sánh dữ liệu phổ ¹H NMR và ¹³C NMR của **T2** với các chất đã được công bố cho thấy cấu trúc của **T2** hoàn toàn trùng khớp với cấu trúc của taxuspin F [5, 6]. Dựa vào các kết quả phổ UV-Vis, IR, MS, NMR và tài liệu tham khảo, hợp chất **T2** được xác định là **taxuspin F**.

Taxuspin F đã được phân lập từ *Taxus cupidata* Sieb. et Zucc năm 1995 [5] và từ *Taxus wallichiana* Zucc bởi Nguyễn Thị Thanh Tâm năm 2007 [6].

Hợp chất T3:

Hợp chất T3 là kết tinh dạng tinh thể nhỏ, mịn, không màu, có ánh lấp lánh, dễ tan trong cloroform, dichloromethan, ethyl acetat, ít tan trong methanol. Sắc ký lớp mỏng bằng hệ dung môi ether dầu-aceton (6:4) cho vết tắt quang ở bước sóng UV₂₅₄ nm. Hiện màu bằng H₂SO₄ 10%/EtOH 96%, xuất hiện vết tròn màu xanh lá đậm.

Phổ UV của T3 trong MeOH cho các đỉnh hấp thu cực đại ở bước sóng 219 nm và 279 nm. Điều này phù hợp vì các taxoid có đỉnh hấp thu cực đại trong khoảng 190-300 nm [7]. Phổ MS - ES⁺ trong MeOH có pic m/z 825,05 là mảnh $[M+Na]^+$, do vậy hợp chất T3 có mảnh khối lượng phân tử $[M]^+$ là 802, tương ứng với công thức nguyên có thể là C₄₄H₄₈O₁₃.

Phổ ¹H NMR cho tín hiệu cộng hưởng ứng với sự hiện diện của: bốn nhóm methyl δ_H [1,19 (3H, s, 16-Me); 1,23 (3H, s, 17-Me); 2,01 (3H, s, 18-Me)] và 1,72 (3H, s, 19-Me) đặc trưng cho khung taxan diterpen. Bốn nhóm -OAc dH [2,01 (3H, s, 2-OAc); 2,01 (3H, s, 4-OAc); 2,1 (3H, s, 7-OAc); 1,76 (3H, s, 9-OAc)]. Bốn proton oxymethin dH [6,17 (1H, d, 7,5, H-2); 5,01 (1H, d, 8, H-5); 5,62 (1H, d, 11, H-7); 6,22 (1H, d, 11, H-9) và 6,61 (1H, d, 11, H-10)]. Hai nhóm methylen dH [1,92 (1H, dd, 9, 15,5), 2,6 (m), (H-6a và H-6b) và 1,72 (1H, m), 2,45 (1H, dd, 7,5, 14,8), (H-14a và H-14b)]. Một nhóm proton methin dH [3,04 (1H, d, 8, H-3)]. Nhóm methylen gắn trên carbon mang oxygen dH [4,39 (1H, d, 8, H-20a) và 4,5 (1H, d, 8, H-20b)]. Một nhóm cinnamoyl dH [6,5 (1H, d, 16, H-22); 7,7 (1H, d, 16, H-23); 7,56 (1H, m, H-4'); 7,8 (2H, d, 8, H-2', H-6') và 7,56 (2H, m, H-3', H-5')]. Một proton của nhóm -OH alcol [2,67 (1H, s)].

Phổ ¹³C NMR kết hợp với phổ DEPT 90 và DEPT

135 cho các mũi cộng hưởng ứng với 39 carbon bao gồm: bốn carbon carbonyl ester [δ_C 170,3 (2-OAc); 169,2 (4-OAc); 169,8 (7-OAc); 169,8 (9-OAc)]. Hai nhóm carbon olefin bậc bốn [δ_C 135,9 (C-11) và 148,2 (C-12)]. Sáu carbon bậc ba mang oxygen [δ_C 67,9 (C-2); 84,8 (C-5); 70,6 (C-7); 76,4 (C-9); 68,7 (C-10); 79,1 (C-13)]. Một carbon bậc bốn mang oxygen [δ_C 79,4 (C-4)]. Ba carbon bậc bốn [δ_C 68,2 (C-1); 43,7 (C-8); 75,7 (C-15)] và carbon bậc ba [δ_C 44,7 (C-3)]. Bảy carbon đặc trưng cho vòng thơm [δ_C 134,1 (C-1'); δ_C 129 (C-2', C-6'); δ_C 130,7 (C-3', C-5'); δ_C 129,1; 129,5; 128,2; 133,4 (-Ph)].

T3 có chứa khung 11(15 $\rightarrow$ 1)-*abeo*-taxoid thể hiện ở δ_C 68,2 (C-1) và δ_C 75,7 (C-15). T3 còn có một vòng oxetan [4,50 (1H, d, 7,5, H-20a); 4,39 (1H, d, 8,0, H-20b) và δ_C 74,7 (C-20)]. Từ phổ 1H -NMR có thêm một nhóm benzoyl C_6H_5CO và một nhóm cinnamoyl $C_6H_5CH=CHCO$, bốn nhóm acetyl CH_3CO .

So sánh dữ liệu phổ 1H NMR và ^{13}C NMR của hợp chất T3 với các chất đã được công bố thì dữ liệu của hợp chất T3 hoàn toàn trùng khớp với cấu trúc của **taxchinin B** [7]. Dựa vào các kết quả phổ UV-Vis, IR, MS, NMR và tài liệu tham khảo, hợp chất **T2** được xác định là **taxchinin B**.

Hợp chất T4:

Hợp chất T4 là kết tinh dạng tinh thể nhỏ, mịn, không màu, lấp lánh, dễ tan trong cloroform, dicloromethan, ethyl acetat, ít tan trong MeOH. Sắc ký lớp mỏng bằng hệ dung môi ether dầu-aceton (6:4) cho vết tắt quang ở bước sóng UV₂₅₄ nm. Hiện màu bằng H_2SO_4 10%/EtOH 96%, xuất hiện vết tròn màu nâu.

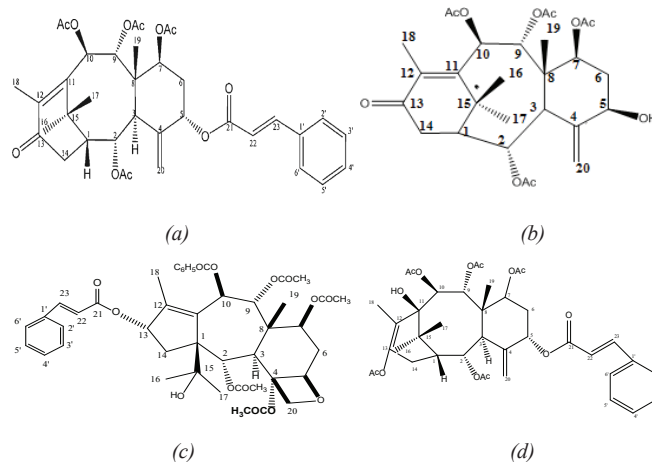
Phổ UV-Vis của hợp chất T4 trong methanol cho các đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 217 và 278 nm, tương ứng với các taxoid [4]. Phổ khối cho pic có m/z 747,05 $[M+Na]^+$ với cường độ cao nhất, do vậy hợp chất T4 có mảnh khối lượng phân tử $[M]^+$ là 724 đơn vị khối tương ứng với công thức nguyên có thể là $C_{39}H_{48}O_{13}$ [8].

Phổ 1H NMR cho tín hiệu cộng hưởng ứng với sự hiện diện của: bốn nhóm methyl δ_H [1,49 (3H, s, 16-Me); 1,17 (3H, s, 17-Me); 1,6 (3H, s, 18-Me) và 1,53 (3H, s, 19-Me)] đặc trưng cho khung taxan diterpen. Năm nhóm -OAc δ_H [1,96 (3H, s, 2-OAc); 2,1 (3H, s, 7-OAc); 2,0 (3H, s, 9-OAc); 2,02 (3H, s, 10-OAc) và 2,2 (3H, s, 13-OAc)]. Năm proton oxymethine δ_H [5,8 (1H, dd, 7, H-2); 4,85 (1H, m, H-5); 4,85 (1H, m, H-7); 5,6 (1H, d, 5, H-9) và 6,25 (1H, d, 10,5, H-10)]. Hai

nhóm methylene δ_H [2,06 (1H, m, H-6) và 2,36 (1H, d, 18,5), 2,57 (1H, m), (H-14a và H-14b)]. Hai nhóm proton methine δ_H [1,89 (1H, m, H-1) và 3,7 (1H, d, 7, H-3)]. Nhóm methylene gắn trên carbon olefin δ_H [5,08 (1H, s, H-20a) và 5,2 (1H, s, H-20b)]. Một nhóm cinnamoyl δ_H [6,46 (1H, d, 16, H-22), 7,7 (1H, d, 16, H-23), 7,4 (1H, m, H-4'), 7,54 (2H, m, H-2', H-6'), 7,4 (2H, m, H-3', H-5')]. Một proton của nhóm -OH alcol [2,1 (1H, s)].

Phổ ^{13}C NMR kết hợp với phổ DEPT 90 và DEPT 135 cho các mũi cộng hưởng ứng với 39 carbon bao gồm: năm carbon carbonyl ester [δ_C 170,6 (2-OAc); 170,2 (7-OAc); 169,3 (9-OAc); 170,4 (10-OAc); 168,5 (13-OAc)]. Hai nhóm carbon olefin bậc bốn [δ_C 124,3 (C-12) và 144,2 (C-13)]. Một carbon olefin bậc hai [δ_C 110,9 (C-20)]. Năm carbon bậc ba mang oxygen [δ_C 68,4 (C-2); 67,4 (C-5); 70,4 (C-7); 76,7 (C-9); 78,5 (C-10)]. Một carbon bậc bốn mang oxygen [δ_C 77,3 (C-11)]. Hai carbon bậc ba [δ_C 50,4 (C-1) và 40,8 (C-3)] và carbon bậc bốn [δ_C 142,6 (C-4)]. Ba carbon đặc trưng cho vòng thơm [δ_C 134,2 (C-1'); δ_C 128,1 (C-2', C-6'); δ_C 128,9 (C-3', C-5')].

So sánh dữ liệu phổ của hợp chất T4 với các chất đã được công bố thì dữ liệu của hợp chất T4 hoàn toàn trùng khớp với cấu trúc của **taxuspin D**, một chất đã được tìm thấy trong loài *Taxus cuspidata* [8].



Hình 1: cấu trúc hóa học của (a) T1: taxinin B; (b) T2: taxuspin F; (c) T3: taxchinin B; (d) T4: taxuspin D

Kết luận

Nghiên cứu đã áp dụng phương pháp sắc ký cột cổ điển đơn giản và sử dụng những dung môi thông dụng để phân lập các hợp chất taxoid trong cao methanol 100% chiết từ lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.). Cấu trúc của các hợp chất được xác định dựa vào các kết quả phân tích phổ UV-Vis, IR, MS, NMR so sánh

với tài liệu đã công bố. Nghiên cứu đã phân lập được 4 hợp chất taxoid là taxinin B, taxupin F, taxchinin B và taxuspin D, tạo tiền đề cho việc xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm Taxol® được dụng chiết xuất từ Thông đỏ lá dài trồng ở Lâm Đồng.

Tài liệu tham khảo

[1] L. Brambilla, A. Romanelli, M. Bellinva, S. Ferrucci, M. Vinci, V. Boneschi, A. Miedico, L. Tedeschi (2008), “Weekly paclitaxel for advanced aggressive classic Kaposi sarcoma: experience in 17 cases”, *Br J Dermatol*, **158**, pp.1339-1344.

[2] T. Dhillon, J. Stebbing, M. Bower (2005), “Paclitaxel for AIDS-associated Kaposi’s sarcoma”, *Expert Rev Anticancer Ther*, **5**, pp.215-219.

[3] Trần Công Luận, Bùi Thế Vinh, Vương Chí Hùng, Nguyễn Tiến Hùng (2014), “Nghiên cứu quy trình chiết xuất, tinh chế 10-deacetyl baccatin III, taxol và các taxoid khác từ Thông đỏ lá dài

(*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Đà Lạt trên quy mô pilot”, *Tạp chí Y - dược học quân sự*, **số 2**, tr.16-23.

[4] E. Baloglu, D.G.I. Kingston (1999), “The Taxane Diterpenoids”, *J. Nat. Prod.*, **62**, pp.1448-1472.

[5] J. Kobayashi, A. Inubushi, H. Hosoyama, N. Yoshida, T. Sasaki, H. Shigemori (1995), “Taxuspines E-H and J, New Taxoids from the Japanese Yew *Taxus cuspidata*”, *Tetrahedron*, **51**, pp.5971-5978.

[6] Tam Nguyen Thi Thanh, Nhan Nguyen Trung (2009), “The study on chemical constituents from the needles of *Taxus wallichiana* Zucc. (Taxaceae)”, *Journal Science and Technology Development*, **12(10)**, pp.53-57.

[7] K. Fujii, K. Tanaka, B. Li, et al (1993), “Novel diterpenoids from *Taxus chinensis*”, *J. Nat. Prod.*, **56(9)**, pp.1520-1531.

[8] H. Itokawa, K.H. Lee (2003), In: Itokawa H, Lee K.H. (eds.) *Taxus, The genus Taxus*, pp.180-205, Taylor and Francis Group, London.

Điều chế và phân tích tính chất hệ phân tán nanoliposome paclitaxel

Nguyễn Quang Trí^{1*}, Nguyễn Lan Chi¹, Dương Chí Toàn¹,
Trương Công Trí², Nguyễn Thị Ánh Nguyệt², Lê Quan Nghiệm², Nguyễn Minh Đức²

¹Công ty Cổ phần Dược Danapha-Nanosome

²Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 1/2/2016, ngày chuyển phản biện 4/2/2016, ngày nhận phản biện 29/2/2016, ngày chấp nhận đăng 18/3/2016

Trong nghiên cứu này, công thức nanoliposome chứa 90 mg paclitaxel đã được lựa chọn để thực hiện điều chế với 4 g phospholipid, 2 g polyoxylglycerids và 0,6 g cholesterol. Hệ phân tán nanoliposome paclitaxel được điều chế bằng phương pháp hydrat hóa lớp màng phim lipid kết hợp với phương pháp phân tán sủi bọt. Việc giảm kích thước hạt được thực hiện bằng quá trình đồng nhất hóa dưới áp suất cao (HPH).

Các tính chất hóa lý của hệ phân tán nanoliposome paclitaxel đã được nghiên cứu, phân tích về kích thước, phân bố kích cỡ tiểu phân, hình thể học, thế zeta, khả năng nang hóa hoạt chất, hàm lượng hoạt chất, thử nghiệm giải phóng hoạt chất, độ ổn định của hệ phân tán nanoliposome. Kích thước trung bình của tiểu phân nanoliposome paclitaxel là $171,4 \pm 3,9$ nm và chỉ số đa phân tán PDI là $0,07 \pm 0,02$.

Các hình ảnh TEM đã cho thấy, tiểu phân nanoliposome paclitaxel tạo thành hình cầu có cấu trúc dạng SUV hoặc LUV, kích thước nhỏ hơn 500 nm, thấy khá rõ lớp màng lipid kép bao bọc xung quanh tiểu phân nanoliposome. Hệ phân tán nanoliposome paclitaxel có sự ổn định về mặt hóa học và vật lý theo thời gian bảo quản ở nhiệt độ 4-8°C ít nhất 90 ngày, đồng thời đã cải thiện đáng kể tính tan và bảo vệ hoạt chất paclitaxel tránh sự phân hủy trong môi trường nước.

Từ khóa: hydrat hóa lớp màng phim lipid, nanoliposome, paclitaxel.

Chỉ số phân loại 3.4

Đặt vấn đề

Paclitaxel là hoạt chất được phân lập từ vỏ cây thông đỏ *Taxus brevifolia*, sử dụng nhiều trong các phác đồ điều trị ung thư vú, ung thư buồng trứng và ung thư phổi [1, 2]. Tuy nhiên, paclitaxel có độc tính cao, rất kém bền và kém tan (<10 µg/ml) trong môi trường nước [3, 4]. Để khắc phục các hạn chế trên, hướng nghiên cứu nhiều triển vọng hiện nay là nang hóa hoạt chất paclitaxel vào trong các giá mang nanoliposome để đưa thuốc vào bên trong cơ thể. Liposome là hệ tiểu phân phân tán dạng túi, cấu tạo bởi một hoặc nhiều lớp màng lipid kép của các phân tử lưỡng tính, bao quanh một lõi chứa nước. Với cấu trúc đặc biệt này, liposome có khả năng nang hóa paclitaxel giúp tăng tính tan, bảo vệ hoạt chất tránh sự phân hủy và tăng tính thấm thuốc qua các hàng rào sinh học. Ngoài ra, liposome có khả năng kiểm soát sự giải phóng hoạt chất và hướng đích tác dụng. Liposome được điều chế trên nền tảng các tá dược phân hủy sinh học và tương thích sinh học nên rất an toàn khi sử dụng và giảm độc tính cũng như các tác dụng phụ của thuốc [4-7]. Trên thế giới, hệ phân tán

liposome được điều chế bằng nhiều phương pháp khác nhau như: hydrat hóa lớp màng phim lipid, bốc hơi pha đảo, tiêm dung môi và phân tán sủi bọt [4-7]. Ở nước ta, nghiên cứu về liposome ứng dụng trong ngành dược chỉ mới ở giai đoạn tiếp cận ban đầu. Chính vì thế, đề tài hướng đến nghiên cứu hệ phân tán nanoliposome paclitaxel có kích thước trung bình nhỏ hơn 200 nm và đây phân bố kích thước hẹp trên nền tảng các tá dược phospholipid và polyoxylglycerid đạt tiêu chuẩn dùng cho đường tiêm nhằm hướng đến nang hóa các hoạt chất điều trị ung thư kém tan, kém bền và đưa thuốc vào cơ thể bằng đường tiêm.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Paclitaxel (99,9%) được cung cấp từ Fujian South Pharmaceutical, Trung Quốc; paclitaxel chuẩn (100,2%) theo tiêu chuẩn châu Âu được cung cấp từ Council of Europe-EDQM CS, Pháp; phospholipid được cung cấp từ Lipoid GmbH, Đức; polyoxylglycerid được cung cấp từ SEPPIC, Pháp; cholesterol được

*Tác giả liên hệ: Tel: 0511.3757676

Preparation and analysis of the properties of paclitaxel nanoliposomes

Summary

In this study, the nanoliposomal formulations containing 90 mg paclitaxel were made from 4 g of phospholipids, 2 g of polyoxylglycerids, and 0.6 g of cholesterol. They were prepared using thin film hydration method in combination with the effervescent dispersion technique. The particle size reduction was achieved by high pressure homogenization (HPH). The properties of the nanodispersions had been investigated regarding size analysis, zeta potential measurement, drug payload, morphology, stability, and in vitro dissolution. The paclitaxel nanoliposomes had the size of 171.4 ± 3.9 nm with a unimodal narrow distribution and the polydispersity index (PDI) of 0.07 ± 0.02 . The TEM images of paclitaxel nanoliposomes demonstrated the formation of small unilamellar vesicles (SUV) or large unilamellar vesicles (LUV). The encapsulation efficiency of paclitaxel was nearly 100%. The paclitaxel-loaded nanoliposomes had a good in vitro release compared with coarse paclitaxel suspensions. The zeta potential was from -1 mV to -4 mV, suggesting a steric stabilization. The paclitaxel nanoliposomes were physically and chemically stable at least 90 days at 4-8°C. The results confirmed that nanoliposomes improved the solubility and the chemical stability of paclitaxel considerably.

Keywords: nanoliposome, paclitaxel, thin film hydration method.

Classification number 3.4

cung cấp từ Brenntag, Đức. Các tá dược phospholipid và polyoxylglycerid đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất dùng cho đường tiêm và các dung môi, hóa chất khác đều đạt tiêu chuẩn dược dụng của nhà sản xuất.

Phương pháp nghiên cứu

Định lượng paclitaxel bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): định lượng paclitaxel trên hệ thống HPLC Shimadzu LC-10AD với cột Kyatech C18 (250 x 4,6 mm), cỡ hạt 5 μ m. Pha động là acetonitril-nước (51:49, v/v). Phát hiện bởi detector SPD-M10AVP ở bước sóng phát hiện 227 nm. Thể tích tiêm mẫu là 30 μ l. Tốc độ dòng là 0,7 ml/phút. Mẫu được pha trong dung môi methanol, rồi lọc qua màng lọc Milipore 0,22 μ m trước khi bơm mẫu vào hệ thống HPLC. Quy trình định lượng được thẩm định về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng.

Điều chế nanoliposome paclitaxel: cân các thành phần nguyên liệu gồm paclitaxel, phospholipid, polyoxylglycerid và cholesterol theo công thức bào chế. Hòa tan hoàn toàn các thành phần vào 50 ml ethanol tuyệt đối, khuấy bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng tạo dung dịch lipid. Cô quay dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 45-50°C, loại dung môi hữu cơ hình thành lớp phim lipid bám trên thành dụng cụ. Sấy lớp phim lipid dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 45-50°C trong 24 giờ bằng tủ sấy chân không để loại hoàn toàn dung môi. Thêm 50 g dung dịch acid citric 5% vào bình cô quay, cô quay ở nhiệt độ 45-50°C trong 30 phút để hydrat hóa lớp phim lipid. Phân tán đều hệ phân tán sau hydrat hóa vào ly thủy tinh chứa sẵn 43,31 g dung dịch natri hydrocarbonat 5% vừa phân tán vừa khuấy với tốc độ 15.000 vòng/phút bằng thiết bị Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Đức) trong 15 phút. Tiếp tục cho hệ phân tán thu được qua máy đồng nhất hóa dưới áp suất cao (HPH, APV 2000, Đức) ở áp suất 800 bar, qua 5 chu kỳ. Đóng chai, dán nhãn và bảo quản mẫu ở nhiệt độ 4-8°C.

Phân tích tính chất hệ phân tán nanoliposome paclitaxel tạo thành: nanoliposome paclitaxel tạo thành được phân tích các chỉ tiêu: tính chất cảm quan; quan sát dưới kính hiển vi quang học (CH20, Olympus, Nhật); đo kích thước tiểu phân bằng phương pháp khuếch tán ánh sáng và đo thế zeta bằng phép đo gió bởi Doppler laser (NanoZS 90, Malvern, Pháp); quan sát hình thể học dưới kính hiển vi điện tử truyền

qua TEM (JEM 1400, JEOL, Nhật); xác định hiệu suất nang hóa bằng phương pháp siêu ly tâm 20.000 vòng/phút kết hợp siêu lọc qua bộ kit Microcon 3000 Da (Millipore, Mỹ) và khảo sát khả năng giải phóng hoạt chất qua màng thẩm tách Spectra/Por MWCO 6-8.000 Da (Divbio Science Europe, Hà Lan) trong môi trường natri laurylsulfat 1%.

Đánh giá độ ổn định vật lý: liposome được bảo quản ở điều kiện 4-8°C trong ngăn mát tủ lạnh, đánh giá độ ổn định sau 3 tháng dựa trên tính chất cảm quan, kích thước tiểu phân đo bởi phương pháp khuếch tán ánh sáng (NanoZS 90, Malvern, Pháp) và định lượng hàm lượng paclitaxel theo thời gian bằng phương pháp HPLC.

Kết quả và bàn luận

Thẩm định quy trình định lượng paclitaxel bằng phương pháp HPLC

Quy trình định lượng bằng phương pháp HPLC đạt tính tương thích hệ thống về thời gian lưu của pic (khoảng 24 phút), các hệ số đối xứng, độ lệch chuẩn tương đối RSD = 0,121% của 6 lần tiêm mẫu chuẩn và RSD = 0,227% của 6 lần tiêm mẫu thử. Trên các sắc ký đồ HPLC, phương pháp thể hiện tính đặc hiệu cao với thời gian lưu của pic paclitaxel trong mẫu thử và thử thêm chuẩn tương đương thời gian lưu của pic paclitaxel trong mẫu chuẩn, đồng thời dung môi, pha động và mẫu trắng không có pic trùng với pic của paclitaxel. Phương trình hồi quy tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của các mẫu chuẩn có dạng $y = 46,363x + 2,191$ với khoảng nồng độ tuyến tính từ 0,75-51 µg/ml và $R^2 = 0,9998$. Quy trình định lượng paclitaxel bằng phương pháp HPLC đạt yêu cầu về độ lặp lại với RSD = 1,28%. Phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đúng với tỷ lệ phục hồi trung bình là 100,19% và RSD = 0,65%.

Nghiên cứu điều chế hệ phân tán nanoliposome paclitaxel

Sau khi nghiên cứu tối ưu hóa các thành phần công thức và các thông số kỹ thuật để tạo ra các giá mang nanoliposome chưa nang hóa paclitaxel ổn định sau 3 tháng bảo quản ở 4-8°C (các công thức bào chế được trình bày trong bảng 1). Hệ phân tán điều chế từ công thức 1 và 2 có kích thước trung bình nhỏ hơn 200 nm với kiểu phân bố 1 đỉnh và dãy phân bố kích thước hẹp ($PdI < 0,25$), có cấu trúc tiểu phân hình cầu dạng SUV hoặc LUV khi quan sát dưới TEM.

Bảng 1: các công thức bào chế giá mang nanoliposome chưa nang hóa paclitaxel

Thành phần	Công thức 1	Công thức 2
Phospholipid	2 g	4 g
Polyoxylglycerid	4 g	2 g
Cholesterol	0,6 g	0,6 g
Dung dịch acid citric 5%	50 g	50 g
Dung dịch NaHCO ₃ 5% vđ	100 g	100 g

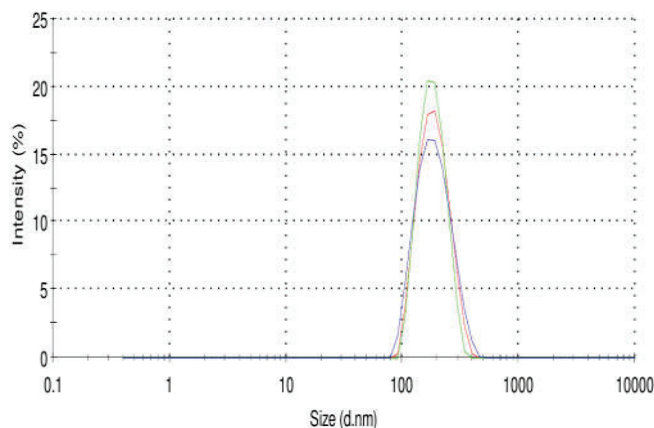
Từ hai công thức trên, đề tài tiến hành nang hóa paclitaxel với hàm lượng đưa vào mỗi công thức lần lượt 60, 90, 120 và 150 mg. Kết quả cho thấy, công thức 2 với tỷ lệ phospholipid-polyoxylglycerid (2:1) nang hóa paclitaxel có độ ổn định tốt hơn so với công thức 1. Công thức 1 nang hóa paclitaxel sau 1 tuần có hiện tượng tách lớp, trong khi đó công thức 2 nang hóa paclitaxel vẫn ổn định tốt. Ở công thức 2, với hàm lượng paclitaxel 60 mg và 90 mg, hệ phân tán thu được quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 1.600 lần cho thấy các tiểu phân nhỏ hình cầu, đều và khá đồng nhất. Trong khi đó, công thức 2 khi nang hóa 120 mg và 150 mg paclitaxel quan sát dưới kính hiển vi thấy có nhiều tinh thể kết tinh hình kim của paclitaxel xuất hiện. Do đó, hàm lượng paclitaxel phối hợp vào công thức 2 được chọn là 90 mg. Dựa trên công thức 2 nang hóa 90 mg paclitaxel, đề tài tiến hành điều chế 3 mẫu, mỗi mẫu 100 g để phân tích tính chất hóa lý và theo dõi độ ổn định của sản phẩm ở 4-8°C trong điều kiện tránh ánh sáng.

Phân tích tính chất hóa lý hệ phân tán nanoliposome paclitaxel

Tính chất: hệ phân tán nanoliposome paclitaxel lỏng, màu trắng đục, đồng nhất, không có xảy ra các hiện tượng kém bền như: kết bông, nổi kem, sa lắng và tách pha. Ngoài ra, hệ phân tán nanoliposome paclitaxel rất dễ dàng phân tán hoàn toàn vào trong môi trường nước.

Kích thước và phân bố kích cỡ tiểu phân: hệ phân tán có kích thước tiểu phân phân bố kiểu 1 đỉnh với dải phân bố hẹp nằm trong vùng từ 80-500 nm. Kích thước trung bình của tiểu phân nanoliposome paclitaxel là $171,4 \pm 3,9$ nm và chỉ số đa phân tán PdI là $0,07 \pm 0,02$ (hình 1).

Hình thể học: quan sát dưới TEM (hình 2), tiểu phân nanoliposome paclitaxel tạo thành hình cầu có cấu trúc dạng SUV hoặc LUV, kích thước nhỏ hơn 500 nm, thấy khá rõ lớp màng lipid kép bao bọc xung quanh tiểu phân nanoliposome.



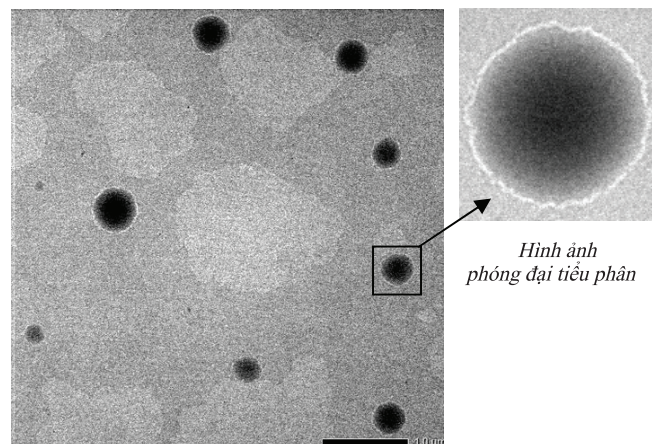
Hình 1: kích thước và phân bố kích cỡ hệ phân tán nanoliposome paclitaxel

Thế zeta: giá trị thế zeta đo được ở các mẫu đều rất thấp ($-3,46 \pm 2,41$ mV) so với khoảng giá trị cần đạt được để tạo ra sự ổn định tĩnh điện học khi trị tuyệt đối thế zeta lớn hơn 30 mV. Tuy nhiên, khi theo dõi mẫu trong thời gian bảo quản ở nhiệt độ $4-8^{\circ}\text{C}$, hệ tiểu phân vẫn ổn định. Như vậy, hệ phân tán nanoliposome paclitaxel ổn định nhờ hiệu ứng cản trở không gian bề mặt của lớp PEG linh động thân nước có trong tá dược polyoxylglycerid bao phủ trên bề mặt tiểu phân.

Khả năng nang hóa hoạt chất: định lượng hoạt chất tự do trong dịch lọc bằng phương pháp HPLC sau khi siêu ly tâm kết hợp siêu lọc, tín hiệu pic của paclitaxel rất thấp so với nồng độ thấp nhất trong khoảng tuyến tính ($0,75 \mu\text{g/ml}$). Điều này chứng tỏ paclitaxel được nang hóa gần như hoàn toàn trong giá mang nanoliposome.

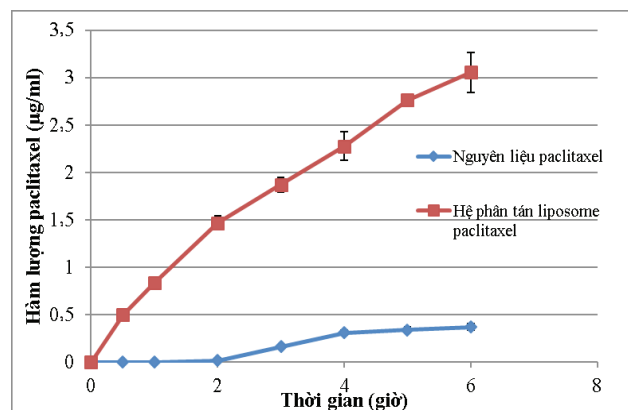
Hàm lượng hoạt chất: hàm lượng hoạt chất paclitaxel trong hệ phân tán nanoliposome định lượng bằng phương pháp HPLC: $88,25 \pm 1,13$ mg/100 g mẫu.

Thử nghiệm giải phóng hoạt chất: sự phóng thích hoạt chất của hệ phân tán nanoliposome paclitaxel được khảo sát trong môi trường natri laurylsulfat 1%. Quá trình giải phóng hoạt chất trong hệ phân tán nanoliposome paclitaxel không xảy ra hiện tượng chậm phóng thích (lag-time) hoặc phóng thích ào ạt (burst-effect) trong thời gian đầu. Trong khoảng thời gian từ 1 giờ đến 6 giờ, sự giải phóng hoạt chất gần như tuyến tính ($R^2 = 0,979$) thể hiện quá trình phóng thích có kiểm soát (hình 3). So với mẫu hỗn dịch paclitaxel, khả năng giải phóng hoạt chất ở hệ phân tán liposome paclitaxel tăng nhiều. Điều này có thể giải thích do hệ liposome phân tán dễ dàng trong môi trường, còn hỗn



Hình 2: hình ảnh quan sát dưới TEM của hệ phân tán nanoliposome paclitaxel ở thang đo 1

dịch paclitaxel rất khó phân tán và sa lắng dưới đáy của màng phóng thích.



Hình 3: sự giải phóng hoạt chất của hệ phân tán nanoliposome paclitaxel và hỗn dịch paclitaxel

Độ ổn định của hệ phân tán nanoliposome

Tính chất, kích thước và phân bố kích cỡ: sau 3 tháng bảo quản ở nhiệt độ $4-8^{\circ}\text{C}$ và tránh ánh sáng, hệ phân tán lỏng đồng nhất, màu trắng đục, không xảy ra các hiện tượng kém bền. Kích thước trung bình $173,2 \pm 2,6$ nm, dải phân bố kích cỡ hẹp một đỉnh với $PdI = 0,09 \pm 0,04$, kích thước thay đổi không đáng kể so với thời điểm ban đầu.

Hàm lượng paclitaxel: hàm lượng paclitaxel trong hệ phân tán nanoliposome paclitaxel giảm không đáng kể, còn $96,24 \pm 0,40\%$ so với ban đầu sau 3 tháng ở nhiệt độ $4-8^{\circ}\text{C}$, tránh ánh sáng. Điều này chứng tỏ, hệ phân tán liposome paclitaxel đã cải thiện đáng kể độ ổn định hóa học của paclitaxel ở điều kiện phân tán trong môi trường nước. Cơ chế ổn định có thể giải thích nhờ sự bao phủ của các chất hoạt động bề mặt xung quanh tiểu

phân liposome paclitaxel và sự định vị của paclitaxel bên trong lớp màng lipid kép của nanoliposome.

Kết luận

Hệ phân tán nanoliposome paclitaxel được điều chế bằng phương pháp hydrat hóa lớp màng phim lipid kết hợp với phương pháp phân tán sỏi bọt và giảm kích thước bằng đồng nhất hóa dưới áp suất cao. Hệ phân tán có kích thước trung bình dưới 200 nm với dãy phân bố kích thước hẹp phù hợp, điều chế từ các thành phần tá dược phospholipid và polyoxylglycerid đạt tiêu chuẩn dùng cho đường tiêm IV. Hệ nanoliposome paclitaxel ổn định theo thời gian bảo quản ở nhiệt độ 4-8°C sau 3 tháng. Hệ phân tán nanoliposome paclitaxel đã cải thiện đáng kể tính tan và bảo vệ hoạt chất paclitaxel tránh sự phân hủy trong môi trường nước.

Tài liệu tham khảo

- [1] G. Bocci, D.A. Paolo, R. Danesi (2013), "The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel", *Angiogenesis*, **16**, pp.481-492.
- [2] M.T. Huizing and V.H. Sewberath (1995), "Taxanes: a new class of antitumor agents", *Cancer Investigation*, **13**(4), pp.381-404.
- [3] T. Jiaher and J.S. Valentino (2008), "Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: epimerization", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(3), pp.1224-1235.
- [4] S. Koudelka and J. Turánek (2012), "Liposomal paclitaxel formulations", *J Control Release*, **163**(3), pp.322-334.
- [5] K.A. Singla, A. Garg, D. Aggarwal (2002), "Paclitaxel and its formulations", *International Journal of Pharmaceutics*, **235**, pp.179-192.
- [6] Y. Wei, Z. Xue, Y. Ye, Y. Huang, L. Zhao (2014), "Paclitaxel targeting to lungs by way of liposomes prepared by the effervescent dispersion technique", *Arch Pharm Res.*, **37**(6), pp.728-737.
- [7] X. Xu, L. Wang, H.Q. Xu, X.E. Huang, Y.D. Qian, J. Xiang (2013), "Clinical Comparison between Paclitaxel Liposom (Lipusu®) and Paclitaxel for Treatment of Patients with Metastatic Gastric Cancer", *Journal of Cancer Prevention*, **14**, pp.2591-2594.

Các hợp chất alkaloid phân lập từ lá cây Thuốc thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban)

Nguyễn Trung Tường^{1*}, Phạm Thanh Kỳ², Phan Văn Kiệt³, Nguyễn Xuân Nhiệm³

¹Viện Dược liệu

²Trường Đại học Dược Hà Nội

³Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 1/9/2016, ngày chuyển phản biện 5/9/2016, ngày nhận phản biện 29/9/2016, ngày chấp nhận đăng 10/10/2016

Trong nghiên cứu, 3 hợp chất alkaloid đã được phân lập từ lá của cây Thuốc thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban), bao gồm: N-methylcorydaldin (PVS-11B), thalipholin (PVS-7A1), moupinamid (PVS-7A3). Trong đó, 2 hợp chất thalipholin (PVS-7A1), moupinamid (PVS-7A3) lần đầu tiên được công bố phân lập từ cây Thuốc thượng. Các hợp chất phân lập đã được xác định cấu trúc dựa trên các thông số vật lý và phương pháp phổ: điểm chảy, phổ hồng ngoại, phổ cộng hưởng từ hạt nhân và phổ khối lượng.

Từ khóa: alkaloid, cây Thuốc thượng, moupinamid, N-methylcorydaldin, thalipholin.

Chỉ số phân loại 3.4

Alkaloids isolated from the leaves of *Phaeanthus vietnamensis* Ban

Summary

Three alkaloids were isolated from the leaves of *Phaeanthus vietnamensis* Ban. Their structures were elucidated as N-methylcorydaldine (PVS-11B), thalipholine (PVS-7A1), and moupinamid (PVS-7A3) by NMR and MS spectra as well as comparison with those reported in the literature.

Keywords: alkaloid, moupinamid, N-methylcorydaldine, *Phaeanthus vietnamensis*, thalipholine.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Cây Thuốc thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban) thuộc họ Na (Annonaceae), là một loài đặc hữu của Việt Nam, được phân bố tại Thừa Thiên - Huế, Quảng Nam, Đà Nẵng. Dân gian dùng nước của lá non nhỏ mắt chữa đau mắt đỏ; vỏ rễ, vỏ thân, lá đem nấu cao dán chỗ mụn nhọt sưng tấy; dùng chữa đau bụng, tiêu chảy, kiết lỵ, cầm máu vết thương ngoài da [1]. Nghiên cứu về thành phần hóa học của loài này cho biết sự có mặt của các alkaloid [2]. Bài báo này trình bày kết quả phân lập và xác định cấu trúc 3 hợp chất alkaloid từ lá loài Thuốc thượng, góp phần định hướng nghiên cứu tác dụng dược lý của loài cây này.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu: cây Thuốc thượng được thu hái tại Hòa Vang, Đà Nẵng. Tên khoa học được xác định là *Phaeanthus vietnamensis* Ban, họ Na-Annonaceae bởi TS Bùi Văn Thanh - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. Mẫu tiêu bản (PV152206) được lưu trữ tại Phòng Thực vật dân tộc học, Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật.

Nguyên liệu dùng chiết xuất là lá cây Thuốc thượng, sau khi thu hái được phơi, tán thành bột thô, bảo quản nơi khô, mát.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập và xác định cấu trúc: phân lập các hợp chất bằng sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản

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

mỏng trắng sẵn silicagel 60 F₂₅₄ (Merck). Thuốc thử hiện màu là dung dịch acid sulfuric 10% và đèn tử ngoại bước sóng 254 và 365 nm. Sắc ký cột được thực hiện bởi chất hấp phụ là silicagel pha thường (0,040-0,063 mm, Merck), pha đảo RP-18 (30-50 µm, Fuji Silysia Chemical Ltd).

Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý và phương pháp phổ bao gồm: điểm chảy, phổ hồng ngoại, phổ cộng hưởng từ hạt nhân và phổ khối lượng. Điểm chảy được đo trên máy Yanaco MP-S3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-, ¹³C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC được ghi trên máy Varian MR-400 FT-NMR. Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy AGILENT 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS system.

Chiết xuất và phân lập các hợp chất tinh khiết: lá loài Thuốc thượng được phơi khô, xay thành bột thô (3,5 kg), sau đó chiết siêu âm với methanol (3 lần×8 L, 2h ở 50°C). Cát loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 210 g cặn chiết methanol. Cặn chiết này sau đó được phân bố đều trong dung dịch acetic acid 5% (2,0 L) rồi chiết lần lượt với *n*-hexan, chloroform và EtOAc; cát loại dung môi được các cặn chiết tương ứng, *n*-hexan (PL1, 14,0 g), chloroform (PL2, 25,0 g), EtOAc (PL3, 3,0 g), và H₂O (PL4, 168,0 g). Lớp nước sau đó được trung hòa bằng dung dịch NH₃, rồi chiết với chloroform, cát loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chloroform (PL4A, 30,0 g). Cặn chiết PL4A được phân tách trên cột silicagel với hệ dung môi CHCl₃-MeOH (20:1→2,5:1, v/v) thu được 4 phân đoạn, PL4A1 (1,4 g), PL4A2 (0,6 g), PL4A3 (2,3 g) và PL4A4 (3,5 g). Phân đoạn PL4A1 được phân tách tiếp trên cột sắc ký silicagel pha đảo RP-18, rửa giải với hệ dung môi MeOH-H₂O (4:1, v/v) thu được 3 phân đoạn PL4A1A-PL4A1C. Phân đoạn PL4A1A phân tách tiếp trên cột sắc ký silicagel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan-CHCl₃-EtOAc (1:1:1, v/v/v) thu được hợp chất **PVS-11B** (9,5 mg). Phân đoạn PL4A2 được phân tách trên cột sắc ký silicagel pha đảo RP-18, rửa giải với hệ dung môi MeOH-H₂O (4:1, v/v) thu được 3 phân đoạn, PL4A2A-PL4A2C. Tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn PL4A2A trên hệ thống hệ thống HPLC sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 250×20 mm, pha động 30% acetonitrile, tốc độ dòng 4 mL/phút thu được các hợp chất **PVS-7A1** (26,0 mg) và **PVS-7A3** (40,0 mg).

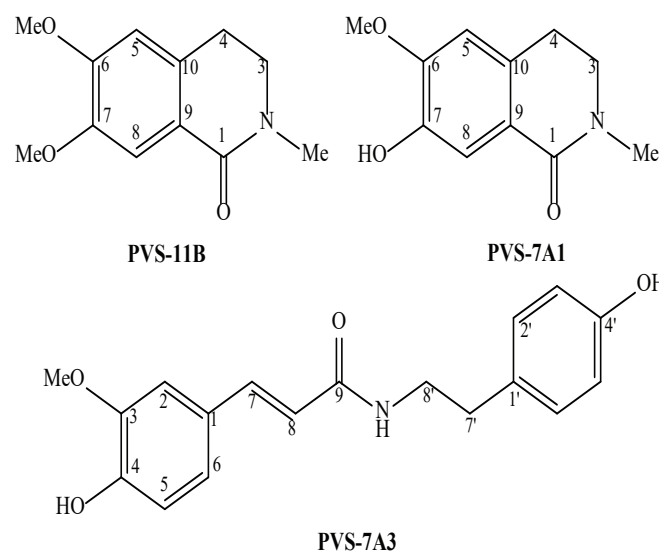
***N*-methylcorydaldin (PVS-11B):** chất bột màu vàng nhạt; điểm chảy: 125-127°C; HR-ESI-MS *m/z* 222,1113 (tính toán lý thuyết cho công thức

[C₁₂H₁₅NO₃]⁺, 222,1125 [M+H]⁺); ¹H- và ¹³C-NMR (xem bảng 1).

Thalipholin (PVS-7A1): chất bột màu vàng nhạt; điểm chảy: 210-211°C; HR-ESI-MS *m/z* 208,0968 (tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₁H₁₃NO₃]⁺, 208,0968 [M+H]⁺); ¹H- và ¹³C-NMR (bảng 1).

Moupinamid (PVS-7A3): chất bột màu vàng nhạt; điểm chảy: 146-147°C; HR-ESI-MS *m/z* 314,1370 (tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₈H₂₀NO₄]⁺, 314,1387 [M+H]⁺); ¹H- và ¹³C-NMR (bảng 2).

Kết quả và bàn luận



Hình 1: cấu trúc hóa học của các hợp chất

Hợp chất **PVS-11B** thu được dưới dạng chất bột màu vàng nhạt; điểm chảy: 125-127°C. Công thức phân tử được xác định là C₁₂H₁₅NO₃ dựa trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại *m/z* 222,1113 (tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₂H₁₅NO₃]⁺, 222,1125 [M+H]⁺). Phổ ¹H-NMR của **PVS-11B** cho biết sự có mặt của 2 proton thơm tại δ_H 6,79 (s) và 7,44 (s), 1 nhóm N-methyl tại δ_H 3,09 (s) và 2 nhóm methoxy tại δ_H 3,82 (s) và 3,85 (s), gợi ý sự có mặt của alkaloid có một vòng thơm. Phổ ¹³C-NMR và DEPT của **PVS-11B** cho thấy tín hiệu của 12 carbon gồm có: 1 carbon carbonyl tại δ_C 167,0; 4 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 122,4; 149,3; 153,8 và 134,2; 2 nhóm methin tại δ_C 111,0 và 111,4; 2 nhóm methylen tại δ_C 28,2 và 49,5; 3 nhóm methyl tại δ_C 35,3 và 56,5×2. Phân tích số liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của **PVS-11B** nhận thấy số liệu phổ của hợp chất này giống với số liệu phổ của N-methylcorydaldin [3]. Để xác định chính xác cấu trúc hóa học của hợp chất này, chúng tôi đã tiến hành đo thêm các phổ HSQC

và HMBC. Phổ HSQC cho biết thông tin về tín hiệu của các liên kết trực tiếp giữa H và C trong phân tử. Tương tác HMBC giữa proton *N*-Me (δ_{H} 3,09) và C-1 (δ_{C} 167,0)/C-3 (δ_{C} 49,5); giữa H-3 (δ_{H} 3,56) và C-1 (δ_{C} 167,0)/*N*-methyl (δ_{C} 35,3) gợi ý sự có mặt của nhóm carbonyl tại C-1 và nhóm methyl tại nguyên tử nitơ. Thêm vào đó, các tương tác HMBC giữa H-5 (δ_{H} 6,79) và C-4 (δ_{C} 28,2)/C-6 (δ_{C})/C-7 (δ_{C})/C-9 (δ_{C}); giữa H-8 (δ_{H} 7,44) và C-1 (δ_{C} 167,0)/C-6 (δ_{C} 153,8)/C-7 (δ_{C} 149,3)/C-10 (δ_{C} 134,1); và 2 nhóm methoxy tại (δ_{H} 3,85 và 3,82 lần lượt có tương tác HMBC với C-6 (δ_{C} 153,8) và C-7 (δ_{C} 149,3) đã gợi ý sự có mặt của 2 nhóm methoxy tại C-6 và C-7. Dựa vào các bằng chứng phổ trên và kết hợp so sánh số liệu phổ NMR của hợp chất *N*-methylcorydaldin cho phép xác định cấu trúc của hợp chất **PVS-11B** là *N*-methylcorydaldin. Hợp chất này đã được Zaima và cộng sự công bố có mặt ở loài *Phaeanthus crassipetalus* [4]. Hợp chất này đã được N.T. Nghĩa và cộng sự công bố có mặt ở loài *P. vietnamensis* [2].

Bảng 1: số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **PVS-11B** và **PVS-7A1**

			PVS-11B		PVS-7A1
C	$^{\#}\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a)}$ (mult., J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a)}$ (mult., J, Hz)
1	165,0	167,0	-	167,1	-
3	48,4	49,5	3,56 (t, 6,8)	49,6	3,52 (t, 8,4)
4	27,5	28,2	2,92 (t, 6,8)	28,2	2,89 (t, 8,4)
5	109,3	111,0	6,79 (s)	110,8	6,75 (s)
6	152,0	153,8	-	152,4	-
7	148,0	149,3	-	146,5	-
8	110,5	111,4	7,44 (s)	115,1	7,33 (s)
9	121,9	122,4	-	122,6	-
10	131,6	134,1	-	132,7	-
<i>N</i> -Me	35,2	35,3	3,09 (s)	35,3	3,06 (s)
6-OMe	56,1	56,5	3,85 (s)	56,4	3,86 (s)
7-OMe	56,0	56,5	3,82 (s)		

^{a)}Đo trong CD_3OD , $^{\#}\delta_{\text{C}}$ của *N*-methylcorydaldin [3]

Hợp chất **PVS-7A1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng, vô định hình; điểm chảy: 210-211°C. Công thức phân tử của hợp chất **PVS-7A1** được xác định là $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ dựa trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS m/z 208,0968 (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3]^+$, 208,0968 $[\text{M}+\text{H}]^+$). Phổ ^1H -NMR của **PVS-7A1** cho biết sự có mặt của 2 proton thơm tại δ_{H} 6,75 (s) và 7,33 (s), 1 nhóm *N*-methyl tại δ_{H} 3,06 (s) và 1 nhóm methoxy tại δ_{H} 3,86 (s). Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của **PVS-7A1** cho thấy tín hiệu của 11 carbon, bao gồm: 1 carbon carbonyl, 4 carbon không liên kết

trực tiếp với hydro, 2 nhóm methin, 2 nhóm methylen và 2 nhóm methyl. Phân tích số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **PVS-7A1** cho thấy số liệu phổ của **PVS-7A1** giống với của *N*-methylcorydaldin [3] ngoại trừ sự vắng mặt của 1 nhóm methoxy tại C-7. Để khẳng định chính xác vị trí của các nhóm chức trong phân tử, chúng tôi đã tiến hành đo phổ HSQC và HMBC. Tương tác HMBC giữa proton *N*-Me (δ_{H} 3,06) và C-1 (δ_{C} 167,1)/C-3 (δ_{C} 49,6); giữa H-3 (δ_{H} 3,52) và C-1 (δ_{C} 167,1)/*N*-Me (δ_{C} 35,3) đã xác định vị trí của nhóm carbonyl tại C-1 và nhóm methyl tại nguyên tử nitơ. Các tương tác HMBC từ H-5 (δ_{H} 6,75) đến C-4 (δ_{C} 28,2)/C-6 (δ_{C} 152,4)/C-7 (δ_{C} 146,5)/C-9 (δ_{C} 122,6); từ H-8 (δ_{H} 7,33) đến C-1 (δ_{C} 167,1)/C-6 (δ_{C} 152,4)/C-7 (δ_{C} 146,5)/C-10 (δ_{C} 132,7); từ methoxy (δ_{H} 3,86) đến C-6 (δ_{C} 152,4) cho phép xác định vị trí của nhóm methoxy và hydroxyl lần lượt tại C-6 và C-7. Dựa vào các bằng chứng phổ nêu trên, hợp chất **PVS-7A1** được xác định là thalipholin. Hợp chất này đã được phân lập từ loài *Phaeanthus saccopetaloides* [5]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên phân lập được từ loài *P. vietnamensis*.

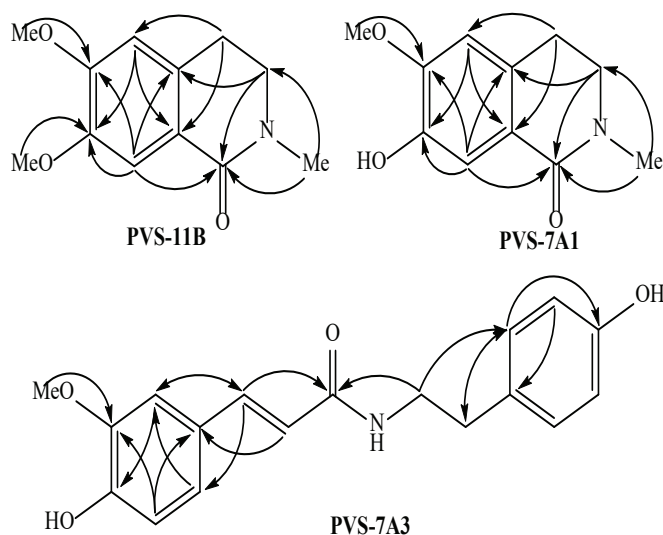
Hợp chất **PVS-7A3** thu được dưới dạng chất bột màu vàng nhạt; điểm chảy: 146-147°C. Công thức phân tử của hợp chất **PVS-7A3** được xác định là $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ dựa trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS m/z 314,1370 (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NO}_4]^+$, 314,1387 $[\text{M}+\text{H}]^+$). Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PVS-7A3** cho biết sự có mặt của các proton tại δ_{H} 6,77 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 6,99 (1H, dd, $J = 2,0$; 8,0 Hz), và 7,07 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) đặc trưng cho sự có mặt của vòng thơm hệ ABX, các proton tại δ_{H} 6,70 (2H, d, $J = 8,0$ Hz) và 7,02 (2H, d, $J = 8,0$ Hz) đặc trưng cho sự có mặt của vòng benzen thế para, một liên kết đôi ($-\text{CH}=\text{CH}-$) có cấu hình *E* tại δ_{H} 6,38 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) và 7,41 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) và một nhóm methoxy tại δ_{H} 3,83 (3H, s). Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PVS-7A3** cho biết sự xuất hiện tín hiệu của 18 nguyên tử carbon trong đó có 1 carbon carbonyl, 5 carbon không liên kết trực tiếp với proton; 9 methin, 2 methylen và 1 methoxy. Phân tích số liệu phổ của **PVS-7A3** cho thấy cấu trúc của **PVS-7A3** giống với của hợp chất moupinamid [6]. Thêm vào đó, số liệu phổ của các hợp chất được xác định dựa vào phân tích phổ HSQC và HMBC. Tương tác HMBC giữa H-2 (δ_{H} 7,07) và C-4 (δ_{C} 149,8)/C-6 (δ_{C} 123,2)/C-7 (δ_{C} 142,0); giữa H-6 (δ_{H} 6,99) và C-2 (δ_{C} 111,5)/C-4 (δ_{C} 149,8)/C-7 (δ_{C} 142,0) đã chứng minh sự có mặt của nhóm feruloyl. Các tương tác HMBC giữa H-2'/H-6' (δ_{H} 7,02) với C-4' (δ_{C} 156,9)/C-7' (δ_{C} 35,8) đã gợi ý sự

có mặt của nhóm hydroxyl tại C-4'. Nhóm feruloyl và tyramine liên kết thông qua cầu nitơ được xác định dựa trên tương tác HMBC giữa H-8' (δ_H 3,44) và C-9 (δ_C 169,1). Từ các dữ liệu phổ trên và kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất **PVS-7A3** được xác định là moupinamid. Hợp chất này đã được phân lập từ loài *Phaeanthus saccopetaloides* [5].

Bảng 2: số liệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **PVS-7A3**

C	δ_C^a	δ_H^a	δ_H^a (mult., J, Hz)
1	128,2	128,2	-
2	111,5	111,5	7,07 (d, 2,0)
3	149,3	149,2	-
4	149,9	149,8	-
5	116,6	116,4	6,77 (d, 8,0)
6	126,5	123,2	6,99 (dd, 2,0, 8,0)
7	142,0	142,0	7,41 (d, 16,0)
8	118,8	118,7	6,38 (d, 16,0)
9	169,5	169,1	-
1'	131,3	131,2	-
2', 6'	130,7	130,7	7,02 (d, 8,0)
3', 5'	116,2	116,2	6,70 (d, 8,0)
4'	156,9	156,9	-
7'	35,8	35,8	2,72 (t, 7,6)
8'	42,5	42,5	3,44 (t, 7,6)

^aĐo trong CD_3OD , ^b δ_C của moupinamid [6]



Hình 2: các tương tác HMBC chính của các hợp chất

N-methylcorydaldin, thalipholin, moupinamid có trong thành phần của nhiều loài cây với tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa, chống kết tập tiểu cầu, ức chế tiết dịch vị dạ dày trên động vật thực nghiệm [7-9].

Kết luận

Từ lá cây Thuộc thượng *Phaeanthus vietnamensis* Ban thu hái ở Đà Nẵng đã phân lập được 3 alkaloid. Dựa vào số liệu phổ thu được, so với các tài liệu đã công bố, ba alkaloid được nhận dạng là: N-methylcorydaldin (**PVS-11B**), thalipholin (**PVS-7A1**), moupinamid (**PVS-7A3**). Trong đó hợp chất thalipholin (**PVS-7A1**), moupinamid (**PVS-7A3**) lần đầu tiên được công bố phân lập từ cây Thuộc thượng.

Tài liệu tham khảo

- [1] V.V. Chi (1997), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Hà Nội, NXB Y học, tr.485
- [2] N.T. Nghĩa, I. Valka, E. Weigl, V. Simanek, D. Cortes, A. Cave (1991), "Alkaloids from leaves of *Phaeanthus vietnamensis*", *Fitoterapia*, **62**, pp.315-318.
- [3] I.M. Said, N.A.A. Hamid, J. Latif, L.B. Din, B.M. Yamin (2005), "6,7-Dimethoxy-2-methyl-3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one", *Acta Crystallographica Section E*, **61**, pp.o797-o798.
- [4] K. Zaima, Y. Takeyama, I. Koga, A. Saito, H. Tamamoto, S. Azziz, M. Mukhtar, K. Awang, A.H. Hadi, H. Morita (2012), "Vasorelaxant effect of isoquinoline derivatives from two species of *Popowia perakensis* and *Phaeanthus crassipetalus* on rat aortic artery", *Journal of Natural Medicines*, **66**, pp.421-427.
- [5] T. Qian, S. Yang, L. Xu (1997), "Study on chemical constituents of *Phaeanthus saccopetaloides* (I)", *Natural Product Research and Development*, **9**, pp.32-34.
- [6] J. Ma, S.H. Jones, S.M. Hecht (2004), "Phenolic acid amides: a new type of DNA strand scission agent from *Piper caninum*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12**, pp.3885-3889.
- [7] Y.-S. Jin, J.-L. Du, Y. Yang, L. Jin, Y. Song, W. Zhang, H.-S. Chen (2011), "Chemical and biologically active constituents of *Salsola collina*", *Chemistry of Natural Compounds*, **47**, pp.257-260.
- [8] L.-Z. Xu, N.-J. Sun (1984), "Studies on chemical constituents of *Aristolochia moupinensis* Franch [J]", *Acta Pharmaceutica Sinica*, **1**, p.8.
- [9] D.K. Yadav, N. Singh, K. Dev, R. Sharma, M. Sahai, G. Palit, R. Maurya (2011), "Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs", *Fitoterapia*, **82**, pp.666-675.

Nghiên cứu cải thiện đường kính và độ cứng lóng thân các giống lúa nếp NK2, CK92 và CK2003

Nguyễn Thị Thuở^{1*}, Phan Thị Hồng Trang², Võ Công Thành², Lê Văn Hòa²

¹Trường Cao đẳng Cộng đồng Sóc Trăng

²Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 2/2/2016, ngày chuyển phản biện 4/2/2016, ngày nhận phản biện 22/2/2016, ngày chấp nhận đăng 20/5/2016

Nhằm tăng tính cứng cây và giảm đổ ngã cho các giống lúa nếp, 3 tổ hợp lai đơn giữa nếp NK2, CK92 và CK2003 (*Oryza sativa* var. *indica*) với lúa Nhật (*O. sativa* var. *japonica*) cứng cây lần lượt được thực hiện. Ở mỗi tổ hợp lai, các thế hệ con được tiếp tục trồng và chọn lọc qua từng thế hệ từ F₁ đến F₄ bằng cách đánh giá đường kính và độ cứng của lóng thân thứ nhất đến thứ tư. Kết quả cho thấy, đường kính và độ cứng lóng thân của các dòng nếp lai đã được cải thiện đáng kể. Đến thế hệ F₄ đã tuyển chọn được 8 dòng từ 3 tổ hợp lai trên, có đường kính lóng thân 2,23-2,67 mm; 3,47-4,27 mm; 4,83-5,20 mm và 5,80-6,30 mm; độ cứng lóng 2,05-3,26 N/cm²; 5,54-6,60 N/cm²; 8,77-10,16 N/cm² và 13,79-14,76 N/cm², theo thứ tự từ lóng thứ nhất đến lóng thứ tư. Đường kính và độ cứng lóng thân của các dòng lai đều cao hơn so với giống nếp mẹ, do vậy các dòng có triển vọng này đang được khảo nghiệm ngoài đồng để sớm đưa vào sản xuất.

Từ khóa: độ cứng lóng, đường kính lóng, kháng đổ ngã, lúa nếp, lúa Nhật, tổ hợp lai đơn.

Chỉ số phân loại 4.1

Improving the internode diameter and breaking strength of glutinous rice genotypes as NK2, CK92 and CK2003

Summary

To enhance lodging resistance through increasing the stem stiffness of sticky rice, three single crosses were performed between three sticky rice genotypes as NK2, CK92 and CK2003 (*O. sativa* sp. *indica*) and Japanese rice genotype (*O. sativa* sp. *japonica*). Progenies were selected from F₁ to F₄ segregant populations of each single cross. Accordingly, internode diameter and breaking strength were assessed as two target traits. The results showed that the internode diameter and breaking strength of segregants had been improved significantly. From F₄ generation, eight selected lines were noticed with the average diameter of first, second, third and fourth internodes varied 2.23-2.67, 3.47-4.27, 4.83-5.20, and 5.80-6.30 mm, respectively. The breaking strength of first, second, third and fourth internodes was varied in the ranges of 2.05-3.26, 5.54-6.60, 8.77-10.16, and 13.79-14.76 N/cm², respectively. The promising lines expressed their larger diameter and better breaking strength as compared to their parents. They would be tested under field condition before releasing.

Keywords: breaking strength, glutinous rice, internode diameter, Japanese rice, lodging resistance, single-cross hybrid.

Classification number 4.1

Đặt vấn đề

An Giang là vùng canh tác lúa nếp chủ yếu ở Đồng bằng sông Cửu Long, trong đó, riêng huyện Phú Tân đã có khoảng 32.000 ha gieo trồng với năng suất 6-8 tấn/ha [1]. Thực tế canh tác cho thấy, cây lúa nếp thuộc dạng yếu rạ nên dễ bị đổ ngã vào cuối vụ, nhất là vào mùa mưa bão. Đây là một thực trạng khó khăn cho nghề trồng lúa nói chung và lúa nếp nói riêng, trong khi diện tích lúa tăng vụ vào mùa mưa bão ngày càng tăng lên. Bên cạnh đó, do tác động của biến đổi khí hậu nên thời tiết thay đổi thất thường, mưa bão ngày càng phức tạp, làm tăng nguy cơ đổ ngã đối với cây lúa.

Đổ ngã không chỉ làm giảm và thất thoát năng suất mà còn ảnh hưởng nghiêm trọng và làm mất chất lượng vốn có của lúa gạo, gây trở ngại lớn cho nghề nông. Theo nhiều kết quả nghiên cứu, tình trạng đổ ngã ở cây lúa nói chung có liên quan nhiều đến đường kính và độ cứng lóng thân cây lúa [2-5]. Do đó, việc chọn tạo những giống nếp mới có khả năng kháng

*Tác giả liên hệ: Email: ntthuo@stcc.edu.vn

đổ ngã tốt bằng cách cải thiện độ cứng và đường kính lóng thân của những giống nếp truyền thống là rất cần thiết.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu sử dụng lai tạo

Các giống nếp NK2, CK92 và CK2003 là những giống nếp đặc sản của huyện Phú Tân, tỉnh An Giang, với những đặc tính nông học được trình bày ở bảng 1. Những giống nếp này nở bụi khá tốt, nhưng yếu rạ nên dễ bị đổ ngã. Lúa Nhật là giống lúa hạt bầu tròn được thu thập tại Nhật Bản năm 2010, có thời gian sinh trưởng ngắn, nở bụi ít, năng suất không cao, nhưng cứng cây nên có khả năng kháng đổ ngã tốt.

Bảng 1: một số đặc điểm nông học và chất lượng của các giống lúa bố mẹ

Tên giống	TGST (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Năng suất (tấn/ha)		A (%)	P (%)
			Đồng xuân	Hè thu		
Nhật	85-90	95-98	6-7	5-6	13-15	10,4
NK2	100-105	110-115	6,5-7	6	1,82	10,7
CK92	102-107	105-108	7-8	6-7	2,63	10,2
CK2003	100-105	100-102	6-7	5-6	2,56	10,0

TGST: thời gian sinh trưởng; A: hàm lượng amylose; P: hàm lượng protein

(Nguồn: Phòng thí nghiệm chọn giống và ứng dụng công nghệ sinh học, Bộ môn Di truyền - Giống nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ)

Phương pháp nghiên cứu

Để tạo vật liệu nghiên cứu, phương pháp lai sử dụng là lai đơn, các tổ hợp lai (THL) được ký hiệu như sau: THL01: nếp NK2 x lúa Nhật; THL02: nếp CK92 x lúa Nhật; THL03: nếp CK2003 x lúa Nhật. Các thế hệ phân ly từ thế hệ F_1 đến F_4 được trồng trong điều kiện nhà lưới (khoảng cách trồng 20 x 20 cm) và chọn lọc qua các thế hệ dựa trên đường kính và độ cứng của các lóng thân gồm lóng thứ nhất (I), lóng thứ hai (II), lóng thứ ba (III) và lóng thứ tư (IV), thứ tự lóng được tính từ cổ bông trở xuống phía gốc lúa. Đường kính lóng được đo bằng thước kẹp và đo ở giữa lóng. Độ cứng lóng được đo bằng máy đo độ cứng IMADA Model ZP-50N (Torque gauges IMADA, Nhật), khoảng cách giữa hai điểm của giá đỡ là 5 cm, thân lúa được đo khi đã loại bỏ hết bẹ lá.

Tỷ lệ phần trăm độ cứng của dòng lai so với cây bố mẹ (x) được tính theo công thức sau:

$$x = \frac{a}{A} \times 100\%$$

a: độ cứng lóng thân của dòng lai
A: độ cứng lóng thân của cây bố/mẹ

Thí nghiệm lai tạo, đánh giá và chọn lọc từ thế hệ F_1

đến F_4 được tiến hành từ năm 2010 đến năm 2012; sau đó tiếp tục nhân dòng thuần từ năm 2013-2014. Đến năm 2015, khảo sát về mặt giải phẫu lóng đối với các dòng F7 được tuyển chọn. Các thí nghiệm được tiến hành tại nhà lưới của Phòng thí nghiệm chọn giống và ứng dụng công nghệ sinh học, Bộ môn Di truyền - Giống nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

Kết quả và thảo luận

Độ cứng lóng

Kết quả ghi nhận, độ cứng lóng thân của các tổ hợp lai ở thế hệ F_1 đều cao hơn cây mẹ, tuy nhiên so với cây bố thì độ cứng lóng I và lóng II thấp hơn, còn lóng III và lóng IV không khác biệt ($p \leq 1\%$) (bảng 2).

Bảng 2: độ cứng lóng thân của các tổ hợp lai ở thế hệ F_1

Dòng/giống	Độ cứng lóng (N/cm ²)			
	Lóng I	Lóng II	Lóng III	Lóng IV
THL01	2,68 ab	4,41 b	11,30 a	16,62 a
THL02	2,35 b	3,37 c	9,18 a	14,18 a
THL03	2,38 b	4,71 b	9,74 a	17,31 a
Nhật (bố)	3,13 a	6,32 a	10,29 a	15,72 a

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê

Đến thế hệ F_2 , nhìn chung các dòng ưu tú ở các tổ hợp lai đều có độ cứng lóng cao hơn so với cây mẹ tương ứng ở tất cả các lóng, nhưng so với cây bố thì dao động ở mức tương đương hoặc thấp hơn (bảng 3). Trong đó, THL01 có độ cứng lóng II tương đương cây bố, các lóng khác đều thấp hơn; còn THL02 và THL03 thì đa số đều thấp hơn cây bố.

Bảng 3: độ cứng lóng thân của các cá thể được chọn ở thế hệ F_2

Dòng/giống	Độ cứng lóng (N/cm ²)			
	Lóng I	Lóng II	Lóng III	Lóng IV
THL01-05	2,61 b	5,56 abc	9,05 b	13,69 b
THL01-07	2,47 bc	5,86 ab	8,84 bc	13,35 b
THL01-08	2,62 b	5,67 ab	8,85 bc	13,55 b
THL02-02	2,79 a	5,39 b	9,07 b	13,51 b
THL02-06	2,25 b	5,47 b	8,61 b	14,04 b
THL02-10	2,32 b	5,40 b	8,74 b	14,58 ab
THL03-01	2,83 abc	5,28 bc	8,04 b	13,29 b
THL03-02	2,46 bcd	5,70 b	7,76 b	13,96 ab
THL03-07	2,37 cd	5,71 b	9,99 a	14,29 ab
Nhật (bố)	3,13 a	6,40 a	10,57 a	15,62 a

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê

Đến thế hệ F_3 , các dòng được chọn ở mỗi tổ hợp lai cũng có độ cứng các lóng đều cao hơn cây mẹ và đa số

tương đương với cây bố (bảng 4). Riêng độ cứng lóng IV của đa số các dòng (9/10 dòng) biến thiên từ 13,67-15,53 N/cm² và tương đương với cây bố.

Bảng 4: độ cứng lóng thân của các cá thể được chọn ở thế hệ F_3

Dòng/giống	Độ cứng lóng (N/cm ²)			
	Lóng I	Lóng II	Lóng III	Lóng IV
THL01-05-02	2,82 ab	5,54 bc	9,59 b	15,53 a
THL01-05-03	3,12 a	6,02 ab	9,58 b	14,98 a
THL01-07-01	2,46 abc	5,30 bcd	10,01 ab	14,32 a
THL01-08-02	2,68 abc	6,01 ab	10,13 ab	15,02 a
THL02-02-02	2,62 abc	5,73 ab	9,29 b	14,36 ab
THL02-02-03	2,75 ab	5,27 bc	9,25 b	13,67 b
THL02-10-02	2,47 bcd	5,80 ab	9,23 b	14,88 ab
THL03-02-02	2,76 ab	5,16 bcd	9,74 ab	15,20 a
THL03-07-01	2,50 abc	5,45 bc	9,40 b	14,49 a
THL03-07-02	2,33 bc	5,78 ab	10,08 ab	15,41 a
Nhật (bố)	3,08 a	6,40 a	10,72 a	15,65 a

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê

Đến thế hệ F_4 , độ cứng của các lóng đều cao hơn cây mẹ, lóng I cao hơn từ 101% đến 199%, lóng II cao hơn 142-179%, lóng III cao hơn 137-181%, lóng IV cao hơn 167-204% (bảng 5). Mặc dù độ cứng lóng của các giống nếp mẹ qua các vụ trồng còn biến thiên, nhưng không dao động nhiều và đều khá thấp. Điều này minh chứng rằng đã cải thiện được tính yếu rạ của các dòng lai một cách đáng kể, đặc biệt là ở lóng IV độ cứng của các dòng lai cao hơn cây mẹ rất nhiều, có dòng cao hơn gấp hai lần (THL02-02-02-04 và THL02-02-03-01). Riêng so với cây bố, độ cứng lóng I của các dòng lai đến thế hệ F_4 đã được cải thiện nhiều so với từ thế hệ F_1 , các lóng II, III và IV không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 1\%$) so với cây bố. Tức là các dòng nếp lai đã được cải thiện theo hướng cứng cây của lúa bố.

Bảng 5: độ cứng lóng thân của các dòng ưu tú ở thế hệ F_4

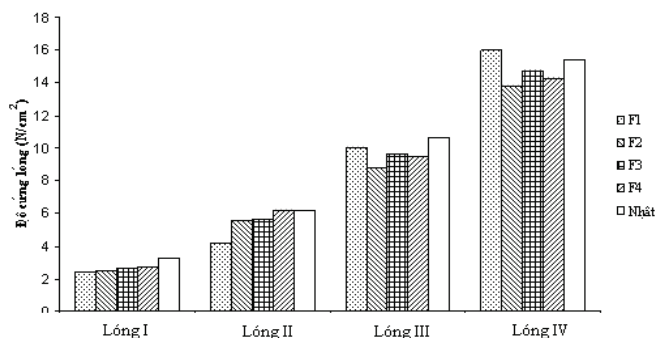
Dòng	Lóng I			Lóng II			Lóng III			Lóng IV		
	ĐC	%♀	%♂	ĐC	%♀	%♂	ĐC	%♀	%♂	ĐC	%♀	%♂
THL01-05-02-01	3,26	172	101	6,05	142	97	8,77	137	82	14,64	178	95
THL01-05-03-02	2,97	157	92	6,08	143	98	9,30	145	87	13,69	167	89
THL01-07-01-02	2,92	154	90	6,60	155	106	9,67	151	91	14,54	177	94
THL01-07-01-03	3,06	162	95	6,44	151	104	9,83	154	92	14,76	180	96
THL01-08-02-02	2,77	147	86	6,41	150	103	9,30	145	87	13,79	168	89
THL02-02-02-02	2,97	199	92	6,33	179	102	9,18	164	86	14,20	198	92
THL02-02-02-04	2,77	186	86	6,49	183	104	10,16	181	95	14,50	202	94
THL02-02-03-01	2,31	155	72	6,30	178	101	9,97	178	93	14,66	204	95
THL03-02-02-02	2,05	118	63	5,54	143	89	9,24	149	87	14,33	173	93
THL03-07-01-02	2,73	157	85	6,14	158	99	9,54	154	89	13,81	167	89
THL03-07-01-03	1,75	101	54	5,83	150	94	9,19	148	86	14,22	172	92
NK2 (mẹ)	1,89			4,26			6,40			8,21		
CK92 (mẹ)	1,49			3,54			5,60			7,18		
CK2003 (mẹ)	1,74			3,88			6,19			8,27		
Nhật	3,23			6,22			10,67			15,45		

ĐC: độ cứng lóng (N/cm²); %♀: phần trăm của dòng lai so với cây mẹ (%); %♂: phần trăm của dòng lai so với cây bố (%)

Kết quả đánh giá còn cho thấy, độ cứng các lóng thân của cây lúa Nhật qua 4 vụ trồng khác nhau rất ổn

định. Cụ thể, độ cứng lóng thân từ lóng I đến lóng IV ở vụ thứ nhất là 3,13; 6,32; 10,29 và 15,72; vụ thứ hai là 3,13; 6,40; 10,57 và 15,62; vụ thứ ba là 3,08; 6,40; 10,72 và 15,65; vụ thứ tư là 3,23; 6,22; 10,67 và 15,45 (N/cm²). Điều này cho thấy, tính cứng cây của lúa bố đã là một đặc tính ổn định và được duy trì tốt qua các thế hệ. Do vậy, có thể sử dụng nguồn vật liệu này vào việc lai tạo để cải thiện tính yếu rạ của những giống địa phương.

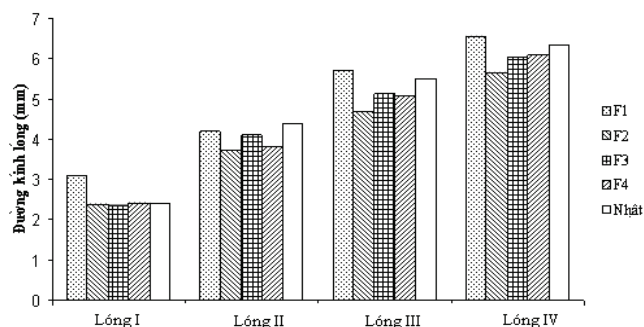
Nhìn chung, độ cứng lóng thân của các dòng nếp lai ở cả 3 tổ hợp lai và cả cây lúa bố và cây lúa mẹ đều tăng từ lóng I đến lóng IV. Trong đó, độ cứng của lóng I và lóng II của các dòng lai có chiều hướng tăng nhẹ và đều qua các thế hệ, riêng lóng III và lóng IV có sự dao động tương đối (hình 1). Điều này có thể do các dòng lai đang trong quá trình được tuyển chọn còn phân ly và có thể bị ảnh hưởng bởi các điều kiện môi trường.



Hình 1: trung bình độ cứng lóng thân qua các thế hệ từ F_1 - F_4 so với cây bố

Đường kính lóng thân

Đánh giá trung bình của cả 3 tổ hợp lai cho thấy, đường kính lóng thân của con lai và cây bố mẹ đều giảm dần từ những lóng ngọn xuống phía các lóng gốc. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây [5-7]. Ở thế hệ F_1 , đường kính lóng thân tăng vượt trội so với bố mẹ ở các lóng I, III và IV. Nhưng sau đó, kết quả này giảm xuống thấp hơn cây bố ở thế hệ F_2 , rồi ổn định và tăng nhẹ cho đến F_4 (hình 2).



Hình 2: trung bình đường kính lóng thân của các thế hệ nếp lai từ F_1 - F_4

Để đánh giá sự ổn định của tính trạng đường kính lóng thân, nhóm nghiên cứu đã tập hợp kết quả về đường kính các lóng thân của cây lúa bố qua các vụ trồng khác nhau. Cụ thể, đường kính các lóng thân từ lóng I đến lóng IV ở vụ thứ nhất là 2,43; 4,40; 5,50 và 6,37; vụ thứ hai là 2,43; 4,37; 5,50 và 6,23; vụ thứ ba là 2,67; 4,40; 5,53 và 6,47; vụ thứ tư là 2,73; 4,47; 5,60 và 6,57 (cm). Đường kính các lóng của cây lúa bố đã ổn định và được duy trì tốt qua các thế hệ, ít bị ảnh hưởng bởi môi trường.

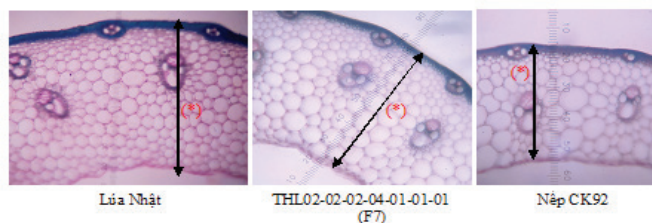
Ở thế hệ F_4 , xét riêng ở từng tổ hợp lai, đường kính các lóng của các dòng lai được chọn đều cao hơn cây mẹ từ 1,03-1,67 lần, đặc biệt ở hai lóng gốc (lóng III và IV) cao hơn từ 1,32-1,51 lần ở cả 3 tổ hợp lai, còn so với cây bố đạt khoảng 0,88-0,96 lần và không khác biệt về mặt thống kê (bảng 6).

Bảng 6: đường kính lóng thân của các dòng ưu tú ở thế hệ F_4 so với lúa bố mẹ

Dòng	Lóng I			Lóng II			Lóng III			Lóng IV		
	ĐK	ss♀	ss♂	ĐK	ss♀	ss♂	ĐK	ss♀	ss♂	ĐK	ss♀	ss♂
THL01-05-02-01	2,53	1,38	0,93	3,73	1,35	0,83	5,07	1,45	0,91	5,90	1,37	0,90
THL01-05-03-02	2,43	1,33	0,89	3,73	1,35	0,83	5,10	1,46	0,91	6,03	1,40	0,92
THL01-07-01-02	2,57	1,40	0,94	3,80	1,37	0,85	5,10	1,46	0,91	6,07	1,41	0,92
THL01-07-01-03	2,50	1,37	0,92	3,60	1,30	0,81	5,00	1,43	0,89	5,83	1,36	0,89
THL01-08-02-02	2,47	1,35	0,90	3,47	1,25	0,78	4,83	1,38	0,86	6,07	1,41	0,92
THL02-02-02-02	2,57	1,61	0,94	3,80	1,50	0,85	5,20	1,49	0,93	6,27	1,43	0,95
THL02-02-02-04	2,67	1,67	0,98	4,23	1,67	0,95	5,30	1,51	0,95	6,33	1,44	0,96
THL02-02-03-01	2,30	1,44	0,84	4,27	1,69	0,96	5,30	1,51	0,95	6,27	1,43	0,95
THL03-02-02-02	2,23	1,13	0,82	3,73	1,33	0,83	5,10	1,40	0,91	6,27	1,43	0,95
THL03-07-01-02	2,33	1,18	0,85	3,80	1,36	0,85	4,87	1,34	0,87	5,80	1,32	0,88
THL03-07-01-03	2,03	1,03	0,74	3,77	1,35	0,84	4,87	1,34	0,87	6,33	1,44	0,96
NK2	1,83			2,77			3,50			4,30		
CK92	1,60			2,53			3,50			4,40		
CK2003	1,97			2,80			3,63			4,40		
Nhất	2,73			4,47			5,60			6,57		

ĐK: đường kính lóng (mm); ss♀: so sánh với cây mẹ; ss♂: so sánh với cây bố

Khi quan sát phẫu diện ngang của lóng thân cho thấy, ở thân lúa Nhật có đường kính lớn hơn thường kèm theo thành lóng cũng dày hơn (hình 3). Điều này là do lượng tế bào nhu mô nhiều hơn và về mặt cấu trúc thành lóng thì những tế bào nhu mô trong thân cây có đường kính lớn hơn cũng đồng đều hơn so với cây lúa có đường kính thân nhỏ hơn.



Hình 3: tiết diện ngang của lóng thân thứ ba (ở vật kính 40, nhuộm với thuốc nhuộm son phèn-lục iod, (*) độ dày thành lóng)

Như vậy, đường kính thân của các dòng nếp lai đã được cải thiện đáng kể và đây chính là yếu tố quan trọng góp phần làm tăng độ cứng thân và tăng khả năng kháng đổ ngã cho các dòng nếp lai này, vì đường kính thân có tương quan thuận với khả năng kháng lại lực đẩy nên là một tính trạng quan trọng để kháng lại sự đổ ngã [5-8].

Mối tương quan giữa đường kính và độ cứng lóng thân

Ở thế hệ F_1 , mối tương quan dương chỉ thể hiện ở 1 tổ hợp lai là THL03; các thế hệ sau cho thấy có sự tương quan dương khá chặt chẽ giữa đường kính và độ cứng lóng thân (bảng 7). Điều này cho thấy, đường kính thân đã góp phần làm nên độ cứng thân, giúp các dòng nếp này kháng lại sự đổ ngã tốt hơn. Do vậy, tăng đường kính thân là yếu tố quan trọng để giúp cây lúa nếp nói riêng và cây lúa nói chung đạt được sự cứng cây kháng lại đổ ngã. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây cho rằng, nên cải thiện đường kính thân để tăng độ cứng cho cây lúa [4] và lúa kháng đổ ngã tốt cần có được sự kết hợp giữa đường kính thân to và độ cứng lóng thân lớn [9].

Bảng 7: tương quan giữa độ cứng và đường kính lóng

Mối quan hệ	Thế hệ	Giá trị tương quan		
		THL01	THL02	THL03
Đường kính lóng - Độ cứng lóng	F1	-	-	(+)**
	F2	(+)**	(+)**	(+)**
	F3	(+)*	(+)*	(+)**
	F4	(+)**	(+)**	(+)**

(+): tương quan thuận; -: không tương quan;

*: mức ý nghĩa 5%; **: mức ý nghĩa 1%

Kết luận và đề xuất

Kết luận

Căn cứ trên đường kính và độ cứng lóng thân, trong thế hệ F_4 nhóm tác giả đã tuyển chọn được 8 dòng nếp mới từ 3 tổ hợp lai, đó là các dòng THL01-05-02-01, THL01-07-01-02, THL01-07-01-03, THL01-08-02-02, THL02-02-02-02, THL02-02-02-04, THL03-02-02-02 và THL03-07-01-02. Các dòng này có lóng thân thứ tư đạt giá trị đường kính 5,8-6,3 mm lớn hơn cây mẹ, độ cứng 13,79-14,76 N/cm² cao hơn cây mẹ và tương đương cây bố cứng cây. Chúng được chuẩn bị thực hiện nội dung khảo nghiệm để phát triển trong sản xuất.

Đường kính và độ cứng lõi thân ở tất cả các lõi của cây bố đều ổn định qua các vụ trồng khác nhau cho thấy những tính trạng này được duy trì một cách bền vững, có thể được ứng dụng trong lai tạo chọn giống.

Đề xuất

Tiếp tục đánh giá, chọn lọc và khảo nghiệm ngoài đồng để tuyển chọn được giống nếp mới phục vụ cho sản xuất.

Sử dụng những dòng cứng cây để làm vật liệu lai tạo, cải thiện khả năng kháng đổ ngã cho các giống lúa *indica*.

Tài liệu tham khảo

- [1] Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh An Giang (2010), *Nếp Phú Tân*, <http://www.sonongnghiep.angiang.gov.vn>.
- [2] I.M. Atkins (1938), "Relation of certain plant characters to strength of straw and lodging in winter wheat", *J Agric Res*, **56**, pp.99-120.
- [3] U. Zuber, H. Winzeler, M.M. Messmer, M. Keller, B. Keller, J.E. Schmid, P. Stamp (1999), "Morphological traits associated with

lodging resistance of spring wheat (*Triticum aestivum* L.)", *J Agron Crop Sci*, **182**, pp.17-24.

[4] T. Kashiwagi, E. Togawa, N. Hirotsu, K. Ishimaru (2008), "Improvement of lodging resistance with QTLs for stem diameter in rice (*Oryza sativa* L.)", *Theor Appl Genet*, **117**, pp.749-757.

[5] T. Ookawa, T. Hobo, M. Yano, K. Murata, T. Ando, H. Miura, K. Asano, Y. Ochiai, M. Ikeda, R. Nishitani, T. Ebitani, H. Ozaki, E.R. Angeles, T. Hirasawa, M. Matsuoka (2010a), "New approach for rice improvement using a pleiotropic QTL gene for lodging resistance and yield", *Nature communications*, **1**(132), pp.1-11.

[6] K. Hirano, A. Okuno, T. Hobo, R. Ordonio, Y. Shinozaki, K. Asano, H. Kitano, M. Matsuoka (2014), "Utilization of stiff culm trait of rice *smos1* mutant for increased lodging resistance", *Plos one*, **9**(7), pp.1-9.

[7] T. Kashiwagi (2014), "Identification of quantitative trait loci for resistance to bending-type lodging in rice (*Oryza sativa* L.)", *Euphytica*, **198**, pp.353-367.

[8] L.L. Wu, Z.L. Liu, J.M. Wang, C.Y. Zhou, K.M. Chen (2011), "Morphological, anatomical, and physiological characteristics involved in development of the large culm trait in rice", *Australian Journal of Crop Science*, **5**(11), pp.1356-1363.

[9] T. Ookawa, K. Yasuda, H. Kato, M. Sakai, M. Seto, K. Sunaga, T. Motobayashi, S. Tojo, T. Hirasawa (2010b), "Biomass Production and Lodging Resistance in 'Leaf Star', a New Long-Culm Rice Forage Cultivar", *Plant Prod. Sci*, **13**(1), pp.58-66.

Một số kết quả nghiên cứu về hội chứng chổi rồng hại nhãn tại Đồng Tháp

Trịnh Xuân Hoạt*, Mai Văn Quân, Lã Văn Hào, Lê Đức Trung, Nguyễn Như Cường

Viện Bảo vệ thực vật

Ngày nhận bài 11/4/2016, ngày chuyển phản biện 13/4/2016, ngày nhận phản biện 9/5/2016, ngày chấp nhận đăng 1/6/2016

Nhện chổi rồng (*Eriophyes dimocarpi* Kuang) phân bố tập trung chủ yếu ở phần ngọn non và các bộ phận biểu hiện triệu chứng chổi rồng nhãn. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhện *E. dimocarpi* Kuang và triệu chứng chổi rồng luôn xuất hiện cùng nhau trên đồng ruộng; sự xuất hiện của nhện *E. dimocarpi* Kuang liên quan chặt chẽ đến các đợt ra cơi lộc của cây nhãn, đặc biệt là đợt lộc thứ nhất và thứ hai ra cơi 1 và cơi 2 trong năm. Đốn tỉa là phương pháp tốt nhất để loại bỏ nguồn nhện ra khỏi đồng ruộng và được kết hợp với biện pháp bón phân để kích thích sự phát triển của chồi và hoa một cách đồng loạt và vượt qua giai đoạn mẫn cảm nhất đối với nhện. Các loại hoạt chất Hexythiazox, Fibronil và Quinalphos có hiệu lực trừ nhện *E. dimocarpi* Kuang cao.

Từ khóa: chổi rồng nhãn, nhện chổi rồng.

Chỉ số phân loại 4.1

Some study results of longan witches broom syndrome in Dong Thap

Summary

Eriophyes dimocarpi Kuang exists mainly on young shoots and other longan witches broom (LgWB) - showing parts of longan. The appearance of *E. dimocarpi* closely relates to the newly emerging shoots; especially the first and the second new shoots. *E. dimocarpi* and LgWB always appear together in the field condition, especially in March and April. The pruning method is the best way to remove *E. dimocarpi* Kuang resource out of the field and to promote the development of new-emerging shoots and flowers. Pruning in combination with fertilizing support new-emerging shoots to rapidly grow, develop and overcome the most susceptible period. Hexythiazox, Fibronil and Quinalphos have high efficacy on *E. dimocarpi* Kuang.

Keywords: *Eriophyes dimocarpi* Kuang, Longan Witches Broom.

Classification number 4.1

Mở đầu

Nhãn (*Dimocarpus longan* Lour.) là một trong những cây ăn quả có giá trị tiêu thụ nội địa và xuất khẩu của Việt Nam. Tuy nhiên, hội chứng chổi rồng nhãn xuất hiện đã gây hại nghiêm trọng tại các vùng sản xuất nhãn trên cả nước, đặc biệt là các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Cho đến nay, chổi rồng nhãn lây lan rất nhanh làm cho diện tích bị nhiễm tăng nhanh, gây thiệt hại lớn đến năng suất, ảnh hưởng đến thu nhập của người trồng nhãn. Tại Đồng bằng sông Cửu Long, sau Vĩnh Long, Đồng Tháp có diện tích trồng nhãn trên 4.000 ha (tập trung chủ yếu ở huyện Châu Thành với diện tích trên 3.000 ha), trong đó có trên 3.000 ha bị nhiễm chổi rồng ở các mức độ khác nhau [1]. Trong nhiều vườn, 100% số cây bị nhiễm nặng với 100% số chồi trên cây biểu hiện triệu chứng dẫn đến không cho thu hoạch. Tính riêng trong năm 2015, đã có 14.581,46 ha trong tổng số 27.045,6 ha nhãn trên cả nước bị nhiễm bệnh, trong đó giống nhãn Tiêu da bò ở miền Nam và giống Hương chi ở miền Bắc là những giống nhiễm bệnh nặng nhất.

Triệu chứng chổi rồng nhãn tương tự cũng đã được ghi nhận tại Trung Quốc, Thái Lan với nhiều nguyên nhân khác nhau như do virus [2-5] và phytoplasma được lan truyền bằng nhện chổi rồng *Aceria dimocarpi* Mite [6]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu mới nhất tại Trung Quốc đã chứng minh nhện chổi rồng *E. dimocarpi* Kuang

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

là nguyên nhân gây ra hội chứng chổi rồng [7]. Kết quả nghiên cứu tại Việt Nam cho thấy, nhện chổi rồng là nguyên nhân trực tiếp gây ra triệu chứng chổi rồng trên nhãn [8].

Nhện chổi rồng là nhóm dịch hại có mức độ đa dạng cao [9]. Vết thương cơ giới do nhện tạo ra trong quá trình chích vào mô cây trồng thường gây ra nhiều dạng triệu chứng khác nhau như: làm cho hoa mất màu, đốt thân ngắn lại, phát sinh nhiều chồi, nhiều búp, sinh ra dạng chổi rồng, cây thấp lùn... [10]. Một số nghiên cứu khác đã ghi nhận một số hoạt chất do nhện *Aceria caulobia* sinh ra có tác dụng giống như chất điều hòa sinh trưởng cây trồng như indole-3-acetic acid (IAA) và cytokinin [11]. Các hormone này có trong tuyến nước bọt của nhện và khi chúng được tiêm vào trong tế bào biểu bì của cây trồng thì kích thích sự phát triển không bình thường của mô cây [9, 12].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu nhện chổi rồng và hội chứng chổi rồng nhãn tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp trong năm 2013-2015.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu là nguồn nhện chổi rồng (*E. dimocarpi* Kuang), giống nhãn Tiêu da bò trồng tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp.

Phương pháp nghiên cứu

Diễn biến mật độ của nhện *E. dimocarpi* Kuang và tỷ lệ chổi rồng nhãn: diễn biến mật độ quần thể nhện được theo dõi trên các giống nhãn khác nhau tại Châu Thành, Đồng Tháp theo phương pháp của Viện Bảo vệ thực vật [13]. Điều tra định kỳ 7 ngày/lần, trên giống nhãn Tiêu da bò. Trên mỗi vườn điều tra theo 5 điểm, mỗi điểm điều tra một cây, mỗi cây điều tra 4 hướng, mỗi hướng điều tra 3 tầng (cao, giữa, thấp), mỗi tầng thu 3 ngọn và 4 hướng mang về phòng thí nghiệm đếm số lượng nhện trên ngọn. Mật độ nhện (con/ngọn) được tính theo công thức:

$$\text{Mật độ (con/ngọn)} = \frac{\text{Tổng số nhện điều tra}}{\text{Tổng số ngọn điều tra}}$$

$$\text{Tỷ lệ bị nhện hại (\%)} = \frac{\text{Tổng số búp/lá có nhện}}{\text{Tổng số búp/lá điều tra}}$$

Ảnh hưởng của biện pháp cắt tỉa đến nhện *E. dimocarpi* Kuang và chổi rồng nhãn: thí nghiệm trên giống nhãn Tiêu da bò được thực hiện trên cùng một vườn, một giống tại mỗi địa điểm, cùng tuổi cây và điều kiện canh tác giống nhau. Thí nghiệm gồm 3 công thức, mỗi công thức nhắc lại 3 cây: CT1: đốn nhẹ (20-25 cm); CT2: đốn sâu (50-55 cm); CT3: đối chứng (không đốn). Chỉ tiêu đánh giá: tỷ lệ chổi rồng (%); năng suất (kg).

$$\text{Tỷ lệ chổi rồng (\%)} = \frac{\text{Tổng số chồi bị chổi rồng}}{\text{Tổng số chồi điều tra}} \times 100$$

Ảnh hưởng của phân bón hữu cơ đến sự phát sinh phát triển của bệnh chổi rồng nhãn: thí nghiệm bố trí gồm 3 công thức theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh. Mỗi công thức 3 lần nhắc, mỗi lần nhắc 10 cây. Phân bón được sử dụng ở thời kỳ chuẩn bị ra lộc theo liều lượng sử dụng như khuyến cáo. Đối với phân bón gốc, trộn đều với NPK rải dưới gốc, đối với phân bón lá pha vào nước phun ướt đều tán cây. Các biện pháp canh tác khác được áp dụng như nhau ở các công thức thí nghiệm và theo quy chuẩn của Cục Bảo vệ thực vật ban hành.

Công thức thí nghiệm:

CT1: Risopla V bón gốc (5 kg/ha) + phân bón lá Risopla II (5 ml/8 lít nước).

CT2: Super - Humic bón gốc (5 kg/ha) + phân bón lá Super - Humic (10 g/8 lít nước).

CT3: bón phân hữu cơ và hóa học thông thường.

Đánh giá hiệu lực của một số loại thuốc hoá học đối với nhện *E. dimocarpi* Kuang: thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên tuần tự, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 1 cây. Lượng nước sử dụng 800 l/ha. Phun thuốc đều trong và ngoài bề mặt tán lá. Mỗi công thức điều tra 4 hướng, mỗi hướng 3 tầng (cao, giữa, thấp), mỗi tầng 3 ngọn, đếm trực tiếp trên kính lúp soi nổi OPTIKA số lượng nhện trước và sau phun 1, 3 và 7 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: mật độ nhện trước phun và sau phun thuốc 1, 3 và 7 ngày (con/ngọn). Hiệu lực của thuốc được tính theo công thức Henderson - Tilton [3]:

$$\text{HL(\%)} = \left(1 - \frac{T_a \times C_b}{C_a \times T_b}\right) \times 100$$

Trong đó: HL là hiệu lực của thuốc; T_a là số cá thể sống ở công thức thí nghiệm sau xử lý; T_b là số cá thể sống ở công thức thí nghiệm trước xử lý; C_a là số cá thể sống ở công thức đối chứng sau xử lý; C_b là số cá thể sống ở công thức đối chứng trước xử lý.

Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Office Excel và xử lý theo phương pháp ANOVA chạy trên phần mềm MSTATC.

Kết quả và thảo luận

Sự phân bố của nhện *E. dimocarpus* Kuang trên các bộ phận của cây

Chối rồng nhãn gây hại chủ yếu trên chồi non, phát sinh nhiều chồi, bị biến dạng, mọc xít nhau; lá non biến dạng, kích thước nhỏ, mọc xít nhau tạo thành búi trên phần đỉnh cành, lớp lông mịn xuất hiện ở cả 2 mặt lá. Nhện *E. dimocarpus* Kuang sống trong lớp lông mịn này. Các chùm bông bị hại hình thành nhiều nhánh bông nhỏ xếp xít nhau, không thể đậu quả hoặc số lượng quả đậu rất ít.

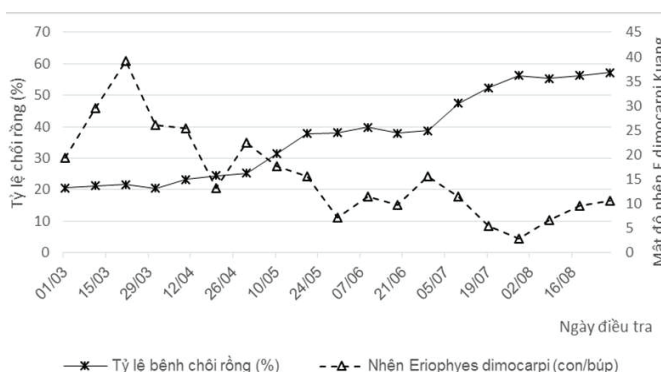
Nhện *E. dimocarpus* Kuang phân bố tập trung chủ yếu trên đợt (ngọn) và phần lá già biểu hiện triệu chứng, hiếm khi bắt gặp nhện trên lá già không có biểu hiện triệu chứng chối rồng. Trong tổng số búp thu thập, có 63,6% ghi nhận sự có mặt của nhện *E. dimocarpus* Kuang, tiếp đến là số lá già biểu hiện triệu chứng. Trong khi đó, con số này trên lá non và lá già không biểu hiện triệu chứng là 5,3 và 3,7%. Việc ghi nhận sự có mặt của nhện *E. dimocarpus* Kuang trên lá non không biểu hiện triệu chứng có thể được giải thích là ngoài búp, nhện *E. dimocarpus* Kuang có thể tấn công lá non. Tuy nhiên, có thể do giai đoạn tấn công muộn, hoặc do mật độ nhện không đủ nhiều để gây ra triệu chứng, do đó triệu chứng không thể hình thành. Số lá già biểu hiện triệu chứng là những lá đã bị nhiễm nhện, biểu hiện triệu chứng từ giai đoạn lá non cho đến giai đoạn lá già.

Như vậy, nhện *E. dimocarpus* Kuang có thể tồn tại trên búp, lá non, lá già. Đây cũng là cơ sở giải thích tại sao khi cắt bỏ những chồi biểu hiện triệu chứng sau một khoảng thời gian ngắn (1-2 tuần), chồi mới mọc lên vẫn biểu hiện triệu chứng chối rồng và ghi nhận sự có mặt của nhện *E. dimocarpus* Kuang là do nhện từ các bộ phận khác của cây di chuyển và tấn công các chồi non mới mọc.

Bảng 1: mật độ nhện theo các tuổi lá khác nhau trên giống nhãn Tiêu da bò (Đồng Tháp, 2014)

STT	Tuổi lá	Tỷ lệ có nhện (%)	Mật độ nhện trung bình (con/đơn vị)
1	Búp	63,6	22,16 ^a
2	Lá non không bị biểu hiện triệu chứng	5,3	0,68 ^c
3	Lá già không biểu hiện triệu chứng	3,7	0,10 ^c
4	Lá già biểu hiện triệu chứng	31,4	13,71 ^b
	CV		17,4
	LSD		11,42

Sự phát sinh và gây hại của chối rồng đi kèm với các đợt ra lộc non của cây, đặc biệt gây hại nặng ở đợt lộc thứ nhất và thứ hai. Nhện chối rồng có kích thước rất nhỏ, không nhìn thấy được bằng mắt thường; thường phát sinh, phát triển mạnh vào các tháng mùa khô (tháng 2, 3, 4 và tháng 11, 12). Nhện và chối rồng nhãn luôn luôn tồn tại trên đồng ruộng, nhện xuất hiện nhiều trùng với sự phát triển của các lộc đợt/bông, cao nhất là vào tháng 3-4 (lộc đợt 1). Chối rồng có mức độ gây hại tăng dần từ đợt lộc thứ nhất đến thứ 2 và lộc bông. Tỷ lệ cao nhất trên lộc bông (hình 1).



Hình 1: diễn biến mật độ nhện *E. dimocarpus* Kuang và diễn biến chối rồng (Đồng Tháp, 2014)

Ảnh hưởng của biện pháp cắt tỉa đến chối rồng nhãn

Biện pháp cắt tỉa khác nhau đã ảnh hưởng đến tỷ lệ chối rồng, biện pháp cắt tỉa nhẹ (20 cm) để lại 2-3 cặp lá và cắt tỉa sâu (50 cm) vào giữa đoạn cành 1 để lại 1-2 cặp lá có tỷ lệ trung bình lần lượt là 15,75 và 11,52%, trong khi đó công thức đối chứng (không cắt tỉa) là 39,75% (bảng 2).

Biện pháp cắt tia đã ảnh hưởng tích cực đến kích thước của chồi và số chồi mới ra tại các đợt ra lộc khác nhau, công thức cắt tia sâu chồi phát triển mạnh hơn so với công thức cắt tia nhẹ và tạo được số chồi nhiều hơn so với cắt tia nhẹ. Chiều dài của bông có ảnh hưởng lớn đến năng suất thu hoạch, ở công thức cắt tia có chiều dài bông hơn hẳn so với đối chứng không cắt tia. Do vậy, biện pháp cắt tia nên được áp dụng để tăng chiều dài bông, tăng năng suất thu hoạch.

Bảng 2: ảnh hưởng của biện pháp cắt tia đến chồi rồng nhãn (Đồng Tháp, 2015)

Công thức	Chi tiêu theo dõi	Giai đoạn sinh trưởng	Số chồi	Chiều dài chồi (cm)	Tổng chiều dài trung bình (cm)	Tỷ lệ chồi rồng (%)	Tỷ lệ trung bình (%)
1. Cắt nhẹ: cắt tại giữa đoạn cành 2 để lại 2-3 cặp lá của năm trước		Đợt lộc 1	2,7	17,3	29,13 ^b	15,21	15,75 ^b
		Đợt lộc 2		28,5		18,72	
		Hoa (bông)		41,6		13,31	
2. Cắt sâu: cắt tại giữa đoạn cành 1 để lại 1-2 cặp lá của năm trước		Đợt lộc 1	3,9	22,1	32,43 ^b	7,63	11,52 ^a
		Đợt lộc 2		31,5		15,62	
		Hoa (bông)		43,7		11,31	
3. Không cắt tia		Đợt lộc 1	1,1	8,6	15,27 ^a	34,42	39,75 ^a
		Đợt lộc 2		11,6		39,67	
		Hoa (bông)		25,6		45,15	
LSD					8,74		4,11
CV					15,1		8,1

Ảnh hưởng của biện pháp sử dụng phân bón đến chồi rồng

Tại các công thức sử dụng phân bón lá, tỷ lệ chồi rồng từ 32,47 đến 32,97%, trong khi đó, ở công thức đối chứng tỷ lệ chồi rồng là 44,24%. Phân bón có tác dụng tăng kính thước chồi, giúp chồi phát triển tốt hơn và nhanh hơn để vượt qua giai đoạn miễn cảm nhất của chồi đối với nhện *E. dimocarp*i Kuang. Khi sử dụng phân bón lá, năng suất trái cũng có sự khác nhau. Cụ thể, khi sử dụng phân bón lá Risopla 2 và Humic, năng suất của các công thức sử dụng phân bón lá lần lượt là 0,92 và 0,89 tấn/công, công thức đối chứng là 0,67 tấn/công (bảng 3).

Bảng 3: ảnh hưởng của các biện pháp sử dụng phân bón lá đến tỷ lệ chồi rồng (Đồng Tháp, 2013)

Công thức	Chi tiêu theo dõi	Giai đoạn sinh trưởng	Kích thước đợt (cm)	Kích thước trung bình	Màu lá	Tỷ lệ chồi rồng (%)	Tỷ lệ chồi rồng trung bình	Năng suất (tấn/công)
CT1		Đợt lộc 1	8,03	13,39 ^a	Xanh	28,65	32,47 ^a	0,92 ^a
		Đợt lộc 2	13,07		Xanh	33,91		
		Đợt lộc 3	19,06		Xanh	34,84		
CT2		Đợt lộc 1	7,62	13,07 ^a	Xanh	29,04	32,97 ^a	0,89 ^a
		Đợt lộc 2	12,78		Xanh	34,83		
		Đợt lộc 3	18,83		Xanh	35,06		
CT3		Đợt lộc 1	5,01	10,07 ^b	Xanh	41,34	44,24 ^b	0,67 ^b
		Đợt lộc 2	10,36		Xanh	45,03		
		Đợt lộc 3	16,03		Xanh	46,36		
LSD				2,6			7,2	0,15
CV				9,5			15,4	7,9

Hiệu lực của một số loại thuốc bảo vệ thực vật phòng trừ nhện *E. dimocarp*i Kuang

Trong các loại hoạt chất thử nghiệm, hoạt chất Hexythiazox kết hợp với dầu khoáng cho hiệu lực trừ nhện cao nhất, đạt 87,6%; tiếp đến là hoạt chất Fibronil, đạt 83,8% và thấp nhất là Quinalpos nhưng vẫn đạt hiệu lực khá cao (82%) (bảng 4). Như vậy, có thể sử dụng cả 3 loại hoạt chất nêu trên để phòng trừ nhện *E. dimocarp*i Kuang.

Bảng 4: hiệu lực phòng trừ nhện *E. dimocarp*i Kuang của một số loại thuốc hóa học và sinh học trên vườn nhãn 5 năm tuổi (Đồng Tháp, 2015)

Công thức	Tên thuốc	Hoạt chất	Hiệu lực phòng trừ nhện (%)		
			3 NSP	7 NSP	14 NSP
1	Kinalux 25EC	Quinalphos	74,2 ^a	80,2 ^a	82,0 ^a
2	Regent 800WG	Fipronil	71,5 ^d	82,7 ^b	83,8 ^b
3	Nissorun 25EC + Dầu khoáng SK Enspray 99EC	Hexythiazox	82,1 ^a	85,7 ^a	87,6 ^a
4	ĐC (phun nước)		-	-	-
CV (%)			8,1	7,5	7,4

Ghi chú: NSP: ngày sau phun

Kết luận

- Nhện *E. dimocarp*i Kuang phân bố tập trung chủ yếu trên ngọn và lá biểu hiện triệu chứng.
- Sự phát sinh và gây hại của chồi rồng nhãn đi kèm với các đợt ra lộc non của cây, đặc biệt gây hại nặng ở đợt lộc thứ nhất và thứ hai.
- Tại Đồng Tháp, nhện *E. dimocarp*i Kuang phát triển mạnh vào các tháng mùa khô (tháng 2, 3, 4 và tháng 11, 12 hàng năm).
- Nhện *E. dimocarp*i Kuang và chồi rồng nhãn luôn tồn tại trên đồng ruộng, đỉnh cao của nhện trùng với sự phát triển của lộc đợt/bông, cao nhất là vào tháng 3, 4 (lộc đợt 1). Chồi rồng có mức độ gây hại tăng dần từ đợt lộc thứ 1 đến thứ 2 và lộc bông.
- Biện pháp cắt tia giúp loại bỏ nguồn nhện, giúp cây ra lộc, hoa tập trung.
- Việc kết hợp biện pháp đốn tia và bón phân hữu cơ có tác dụng tăng kính thước chồi, giúp chồi phát triển nhanh, vượt qua được giai đoạn miễn cảm với nhện.
- Hoạt chất Hexythiazox, Fibronil và Quinalphos đều cho hiệu quả trừ nhện cao.

Tài liệu tham khảo

- [1] Mai Văn Trị, Hồ Thanh Nam, Lê Thị Thu Hồng, Nguyễn Văn Hòa (2005), “Kết quả khảo sát ban đầu bệnh chổi rồng (Witches’ Broom) trên cây nhãn tại miền Đông Nam Bộ”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **2(2)**, pp.33-35.
- [2] J.Y. Chen, K.B. Li, G.C. Fan (1996), “A preliminary study on litchi witches’ broom and its relation to longan witches’ broom”, *Acta Phytopath. Sin.*, **26**, pp.1-335.
- [3] J.Y. Chen, X.D. Xu (2001), “Advances in research of longan witches’ broom disease”, *Acta Hort.*, **558**, pp.413-416.
- [4] V. So, S.Y. Zee (1972), “A new virus of longan (*Euphoria longana* Lam.) in Hong Kong”, *Agriculture and Fisheries Department*, **18**, pp.283-285.
- [5] X. Ye, J. Chen, K. Chong (1990), “Partial purification of a filamentous virus from longan (*Dimocarpus longana* Lam.) witches’ broom disease trees”, *Chinese J. Virol.*, **6**, pp.284-286.
- [6] J. Visitpanich, C. Sittigul, V. Sardud (1996), “Longan leaf curl symptoms in Chiang Mai and Lam Phun”, *J. Agricul.*, **12**, pp.203-218.
- [7] D.P. He, B.P. Zhou, M.L. Zeng, S.X. Lin, J.X. Peng, J.Y. Li, W.M. Huang (2001), “Occurrence, cause and control of longan witches’ broom in Guangdong Province”, *Acta Hort.*, **558**, pp.407-412.
- [8] T.X. Hoat, M.V. Quan, L.V. Hao, T.T. Chi, L.D.T. Anh, P.V. Son, N.N. Cuong, A. Bertaccini (2016), “Association of *Eriophyes dimocarpi* (Acari: Eriophyidae) with longan witches’ broom disease in Vietnam”, *Archives of Phytopathology and Plant Protection* (submitted).
- [9] E. Westphal (1992), “Ceccidogenesis and resistance phenomena in mite-induced galls”, In: Biology of insect-induced galls, J.D. Shorthouse and O Rohfritsch (eds.), *Oxford University Press*, Oxford, pp.141-156.
- [10] R. Petanović, M. Kielkiewicz (2010) “Plant-eriphyoidmite interactions: cellular biochemistry and metabolic responses induced in mite-injured plant”, *Part I. Exp. Appl. Acarol.*, **51**, pp.61-80.
- [11] E. De Lillo, R. Monfreda (2004), “Salivary secretions’ of eriophyids (Acari: Eriophyoidea): first results of an experimental model”, *Exp. Appl. Acarology*, **34**, pp.291-306.
- [12] J. Boczek, D.A. Griffiths (1994), “Structure and systematic of eriophyid mites (Acari: Eriophyoidea) and their relationship to host plants”, In: Williams MAJ (ed) Plant galls, systematics association special volume 49”, *Clarendon Press*, Oxford, pp.119-129.
- [13] Viện Bảo vệ thực vật (1997), *Phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật, Tập I. Phương pháp điều tra cơ bản dịch hại nông nghiệp và thiên địch của chúng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến năng suất và phẩm chất giống thanh long ruột tím hồng LD5

Nguyễn Trịnh Nhất Hằng*, Đoàn Thị Cẩm Hồng

Viện Cây ăn quả miền Nam

Ngày nhận bài 11/1/2016, ngày chuyển phản biện 20/1/2016, ngày nhận phản biện 17/2/2016, ngày chấp nhận đăng 22/2/2016

Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) thực vật đến năng suất và phẩm chất giống thanh long ruột tím hồng LD5 được thực hiện tại Trại thực nghiệm của Viện Cây ăn quả miền Nam. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ hoàn toàn ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức và 4 lần lặp lại. Kết quả nghiên cứu ghi nhận, khi phun NAA 30 ppm + GA₃ 40 ppm và NAA 40 ppm + GA₃ 40 ppm vào giai đoạn nụ hoa được 10 ngày và các thời điểm sau khi hoa nở 5, 10, 15 và 20 ngày trên thanh long ruột tím hồng LD5 giúp gia tăng độ chắc thịt quả (1,49-1,54 kg/cm²), trọng lượng quả (413,50-445,63 g/quả) và năng suất (30,65-34,85 kg/trụ) so với đối chứng không phun. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, phun NAA 30 ppm + GA₃ 40 ppm và NAA 40 ppm + GA₃ 40 ppm giúp gia tăng độ sáng vỏ quả thanh long ruột tím hồng LD5.

Từ khóa: chất điều hòa sinh trưởng, giống LD5, ruột tím hồng, thanh long.

Chỉ số phân loại 4.1

The effect of plant regulators on the yield and fruit quality of LD5 pinkish purple flesh dragon fruit variety

Summary

The study into the effect of plant growth regulators on the yield and fruit quality of LD5 pinkish flesh dragon fruit variety has been carried out at Southern Horticultural Research Institute. The experiment has been arranged under Randomized Completely Block Design (RCBD) with six concentrations of NAA + GA₃ and four replications. The results have shown that the applications of 30 ppm NAA + 40 ppm GA₃ and 40 ppm NAA + 40 ppm GA₃ on LD5 dragon fruit variety at different stages (10-day flower bud and 5, 10, 15, 20 days after blooming) have increased firmness (1.49 and 1.54 kg/cm² corresponding to each application), fruit weight (413.50 and 445.63 g/fruit), yield (30.65 and 34.85 kg/plant (post)) as compared to the control variety. Using of 30 ppm NAA + 40 ppm GA₃ and 40 ppm NAA + 40 ppm GA₃ has also improved the bright colour of fruit peel.

Keywords: dragon fruit, growth regulators, LD5 variety, pinkish flesh.

Classification number 4.1

Đặt vấn đề

Giống thanh long ruột tím hồng LD5 do Viện Cây ăn quả miền Nam lai tạo giữa giống thanh long ruột đỏ LD1 với giống thanh long ruột trắng địa phương vào năm 2010. Kết quả lai tạo đã chọn được dòng lai T9 (H14 x CG-005) có ưu điểm nhất trong số 11 dòng lai khảo nghiệm so sánh với 2 giống thanh long ruột đỏ và ruột trắng địa phương. Dòng này sinh trưởng khá mạnh, ra hoa thụ phấn tự nhiên, quả hình trứng đến trứng thuôn, màu vỏ khá đẹp, bóng; tai quả thường xanh; vỏ quả chắc, thịt quả màu tím hồng, khá chắc, ít nước, hạt cỡ trung bình đến khá, ưu thế hơn giống ruột đỏ LD1 [1]. Dòng T9 đã được Cục Trồng trọt (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn) công nhận tạm thời là giống thanh long ruột tím hồng LD5, cho phép sản xuất thử tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) và miền Đông Nam Bộ.

Một số kết quả nghiên cứu trên cây

*Tác giả liên hệ: Email: nguyennhathang68@gmail.com

ăn quả ghi nhận rằng, kích thước và chất lượng quả của các loại cây có thể bị ảnh hưởng bởi tập quán canh tác, như việc sử dụng chất ĐHST thực vật [2]. Chất naphthaleneacetic acid (NAA) thường được tổng hợp ở các tế bào non và có tác dụng kéo dài kích thước tế bào. Gibberellic acid (GA_3) có tác dụng kích thích sự phân chia tăng trưởng tế bào [3]. Trên cây thanh long ruột trắng khi kết hợp xử lý 20 ppm NAA + 40-50 ppm GA_3 làm tăng năng suất quả, trọng lượng quả, đường kính quả và độ chắc thịt quả [4]. Xử lý NAA 20 ppm với 2 lần phun: khi phát hoa dài 10 cm và khi phát hoa nở những bông đầu tiên có tác dụng hạn chế sự rụng quả non trên cây xoài cát Hòa Lộc vào các giai đoạn 14, 21, 28, 35 và 41 ngày sau đậu quả đã làm tăng năng suất xoài. Đối với cây quýt hồng, khi xử lý GA_3 ở nồng độ 10-20 ppm 2 tháng trước khi thu hoạch có tác dụng trì hoãn tiến trình chín, kéo dài thời gian tồn trữ đến 4 tuần trong điều kiện phòng thí nghiệm (nhiệt độ 28°C và ẩm độ 68%) mà chất lượng vẫn chấp nhận được. Đồng thời, ở nồng độ 10-20 ppm giúp quả sáng bóng hơn, trị số màu sắc quả luôn cao, tỷ lệ hao hụt về trọng lượng quả thấp và phẩm chất quả luôn ổn định [5]. Sử dụng GA_3 (25 ppm) và NAA (25 ppm) giúp tăng đậu quả, giảm rụng quả, tăng số quả trên chùm, số quả trên cây, trọng lượng quả, năng suất và cải thiện phẩm chất quả xoài Keitt [6]. Trên cây mận, khi sử dụng GA_3 với liều lượng 50 mg/l làm tăng đậu quả, tăng kích thước quả, trọng lượng quả, năng suất cũng như cải thiện màu sắc quả đáng kể so với nghiệm thức đối chứng [7].

Từ những kết quả trên cho thấy, các chất ĐHST thực vật như NAA, GA_3 đã ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, năng suất, phẩm chất trên nhiều loại cây ăn quả, trong đó có cây thanh long. Giống thanh long ruột tím hồng LD5 là giống mới, chưa có những nghiên cứu về ảnh hưởng của chất NAA, GA_3 đến năng suất, phẩm chất quả. Vì vậy, nghiên cứu “Ảnh hưởng của liều lượng chất ĐHST đến năng suất, phẩm chất quả thanh long ruột tím hồng LD5” được thực hiện nhằm tìm ra nồng độ chất NAA kết hợp với GA_3 thích hợp, giúp nâng cao năng suất, phẩm chất thanh long ruột tím hồng LD5.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

- Thí nghiệm được tiến hành tại Trại thực nghiệm của Viện Cây ăn quả miền Nam, xã Long Định, huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang (vụ I: từ tháng 6 đến 9/2013; vụ II: từ tháng 6 đến 9/2014).

- Các chỉ tiêu phẩm chất quả được phân tích tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Kỹ thuật canh tác (Viện Cây ăn quả miền Nam).

- Tuổi cây: 2-3 năm tuổi.

- Giống: thanh long ruột tím hồng LD5.

- Khoảng cách trồng: 3,5 x 4 m.

- Chất ĐHST: GA_3 chứa hoạt chất 10% GA_3 và 90% chất phụ gia. NAA nguyên chất dạng bột, màu trắng ngà, khó hòa tan trong nước.

- Sản phẩm thương mại TNo (hoạt chất 2% α -NAA, 0,5% β -NAA và 0,1% GA_3) do Công ty Hóa phẩm thiên nông sản xuất.

Phương pháp thí nghiệm

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ hoàn toàn ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức (NT) và 4 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 2 trụ.

Các NT: NT1: NAA 30 ppm + GA_3 30 ppm; NT2: NAA 30 ppm + GA_3 40 ppm; NT3: NAA 40 ppm + GA_3 30 ppm; NT4: NAA 40 ppm + GA_3 40 ppm; NT5: TNo + GA_3 40 ppm; NT6: đối chứng (không phun).

Thời điểm xử lý: lần 1: 10 ngày sau ra nụ; lần 2: 5 ngày sau hoa nở; lần 3: 10 ngày sau hoa nở; lần 4: 15 ngày sau hoa nở; lần 5: 20 ngày sau hoa nở.

Chỉ tiêu theo dõi:

- Tổng số quả trên trụ: sau khi hoa nở 10 ngày, đếm toàn bộ số quả trên mỗi trụ và lấy trung bình cho mỗi NT.

- Trọng lượng trung bình quả (g/quả): cân 4 quả trên mỗi trụ và lấy trung bình cho mỗi NT.

- Năng suất thực tế (kg/trụ/vụ): cân toàn bộ số quả thu hoạch trên trụ để lấy năng suất thực tế.

- Đường kính quả (cm): đo tại vị trí rộng nhất của quả bằng thước kẹp.

- Độ chắc thịt quả (kg/cm²): đo bằng máy đo độ cứng Penetrometer tại 3 điểm đầu, giữa và cuống quả, sau đó lấy giá trị trung bình.

- Hàm lượng TSS (độ Brix, %): được xác định bằng Brix kế hiệu ATAGO - Nhật, thang độ từ 0 đến 32%.

- Màu sắc vỏ: đo bằng máy đo màu sắc hiệu Minolta. Đo 3 điểm trên bề mặt vỏ, sau đó lấy giá trị trung bình. Màu sắc được thể hiện ở 3 chỉ số L*, a*, b*. Trong đó,

L*: thể hiện độ sáng tối (biến thiên từ 0 đến 100); a*: mức chuyển màu từ màu xanh lá cây đến màu đỏ (biến thiên từ -60 đến > +60); b*: mức chuyển màu từ màu xanh da trời đến màu vàng (biến thiên - 60 đến > +60).

Số liệu được xử lý bằng phần mềm MSTATC và so sánh trung bình các NT bằng phép thử Duncan.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của NAA và GA₃ đến các yếu tố cấu thành năng suất thanh long ruột tím hồng LD5

Bảng 1: ảnh hưởng của NAA và GA₃ đến tổng số quả/trụ, trọng lượng và đường kính quả thanh long ruột tím hồng LD5

NT	Số quả/trụ (quả)		Đường kính quả (cm)		Trọng lượng quả (g)	
	Vụ I	Vụ II	Vụ I	Vụ II	Vụ I	Vụ II
NAA 30 ppm + GA ₃ 30 ppm	64,12	67,13	7,68 bc	8,17 b	379,0 bc	399,88 abc
NAA 30 ppm + GA ₃ 40 ppm	68,75	70,00	8,32 a	8,17 b	427,5 ab	413,50 ab
NAA 40 ppm + GA ₃ 30 ppm	66,12	68,38	8,24 a	8,26 b	380,4 bc	382,13 bc
NAA 40 ppm + GA ₃ 40 ppm	70,62	72,25	8,54 a	8,63 a	431,5 a	445,63 a
TNo + GA ₃ 40 ppm	65,12	67,50	8,13 ab	7,93b c	384,1 bc	387,50 bc
Đối chứng (không phun)	63,75	66,25	7,50 c	7,68 c	365,3 c	356,38 c
Mức ý nghĩa	ns	ns	*	*	*	*
CV%	9,08	9,46	4,14	2,97	8,52	8,33

Ghi chú: trong cùng một cột, các trị số có cùng mẫu tự không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan

*: sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; ns: không khác biệt có ý nghĩa thống kê

Kết quả bảng 1 cho thấy, khi phun NAA 40 ppm + GA₃ 40 ppm (NT4) số quả trên trụ ở vụ I và vụ II đạt cao nhất (lần lượt là 70,62 và 72,25 quả/trụ) nhưng không khác biệt về thống kê so với NT đối chứng không phun và các NT còn lại trong thí nghiệm.

Kết quả qua 2 vụ thu hoạch quả cho thấy, khi phun theo NT4 cho đường kính quả cao nhất, ở vụ I khác biệt có ý nghĩa so với NT đối chứng và NT1 (NAA 30 ppm + GA₃ 30 ppm), nhưng không khác biệt với các NT còn lại; ở vụ II, NT4 khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng và các NT còn lại trong thí nghiệm (bảng 1). Những nghiên cứu trước đây đã ghi nhận rằng, NAA (thuộc nhóm Auxin) và GA₃ (thuộc nhóm Gibberellin) thường được tổng hợp ở các tế bào non [3] và NAA có tác dụng kéo dài tế bào; GA₃ có vai trò kích thích sự phân chia và phát triển tế bào [3]. Như vậy, phun NAA + GA₃ có thể làm tăng số tế bào cũng như kích thước tế bào, và kết quả cho đường kính quả tăng cao hơn.

Khi so sánh trung bình trọng lượng quả qua 2 vụ thu hoạch cho thấy, NT4 có trọng lượng quả trung bình

cao nhất (431,5 và 445,63 g) khác biệt có ý nghĩa so với NT đối chứng và các NT còn lại, trừ NT2 (NAA 30 ppm + GA₃ 40 ppm). Điều này cho thấy, nồng độ NAA + GA₃ cao ảnh hưởng đến trọng lượng quả thanh long ruột tím hồng LD5, nguyên nhân chính có thể là do NAA và GA₃ đã làm tăng đường kính quả, từ đó tăng trọng lượng quả. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu về ảnh hưởng NAA và GA₃ trước đây trên thanh long ruột trắng [4, 8].

Ảnh hưởng của NAA và GA₃ đến phẩm chất thanh long ruột tím hồng LD5

Bảng 2: ảnh hưởng của NAA và GA₃ đến độ Brix và độ chắc thịt quả thanh long ruột tím hồng LD5

NT	Độ Brix (%)		Độ chắc thịt quả (kg/cm ²)	
	Vụ I	Vụ II	Vụ I	Vụ II
NAA 30 ppm + GA ₃ 30 ppm	15,15	15,08	1,42 b	1,40 b
NAA 30 ppm + GA ₃ 40 ppm	15,68	15,63	1,40 bc	1,41 b
NAA 40 ppm + GA ₃ 30 ppm	15,23	15,25	1,47 ab	1,49 ab
NAA 40 ppm + GA ₃ 40 ppm	15,55	15,43	1,53 a	1,54 a
TNo + GA ₃ 40 ppm	14,85	14,90	1,33 c	1,43 ab
Đối chứng (không phun)	14,92	15,03	1,17 d	1,20 c
Mức ý nghĩa	ns	ns	*	*
CV%	3,06	3,21	4,09	5,27

Kết quả bảng 2 cho thấy, độ Brix (%) không có sự khác biệt giữa các NT qua 2 vụ thu hoạch. Như vậy, khi phun NAA + GA₃ ở các nồng độ nêu trên không làm thay đổi độ Brix thịt quả thanh long ruột tím hồng LD5. Kết quả này phù hợp với các báo cáo của Wahdan M.T và cs (2011), Sarkar S và cs (2005) [9, 10]. Trong khi đó, khi phun theo NT4 cả 2 vụ có độ chắc thịt quả cao nhất, lần lượt là 1,53 và 15,54 kg/cm². Khác biệt này có ý nghĩa so với NT đối chứng.

Bảng 3: ảnh hưởng của NAA và GA₃ đến màu sắc vỏ quả thanh long ruột tím hồng LD5

NT	L*		a*		b*	
	Vụ I	Vụ II	Vụ I	Vụ II	Vụ I	Vụ II
NAA 30 ppm + GA ₃ 30 ppm	42,92 d	43,91 cb	45,68 bc	45,53 bc	4,36 ab	4,56 ab
NAA 30 ppm + GA ₃ 40 ppm	44,17 c	44,85 bc	46,09 ab	45,80 bc	4,20 ab	4,23 ab
NAA 40 ppm + GA ₃ 30 ppm	45,03 bc	45,37 ab	46,47 b	46,02 b	4,09 bc	4,02 bc
NAA 40 ppm + GA ₃ 40 ppm	46,67 a	46,42 a	47,97 a	47,84 a	3,79 c	3,91 c
TNo + GA ₃ 40 ppm	45,56 ab	45,27 ab	45,56 c	44,56 cd	4,47 a	4,07 bc
Đối chứng (không phun)	42,26 d	42,98 d	40,80 d	43,94 d	4,38 ab	4,50 a
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*
CV%	1,75	1,99	2,10	1,80	4,90	4,81

Quan sát màu sắc vỏ quả thanh long ghi nhận chỉ số L* thể hiện độ sáng tối của quả, L* càng cao quả càng sáng, độ bóng cao. Kết quả bảng 3 cho thấy, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về độ sáng của quả giữa các

NT thí nghiệm, cụ thể ở vụ I, NT4 có chỉ số L^* cao và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng và các NT còn lại, trừ NT5 (TNo + GA_3); ở vụ II, NT4 có chỉ số L^* cao và khác biệt có ý nghĩa so với các NT phun NAA và GA_3 có nồng độ thấp hơn và NT đối chứng.

Chỉ số a^* thể hiện mức chuyển màu từ màu xanh lá cây sang màu đỏ. Chỉ số a^* ở bảng 3 thể hiện vỏ quả thanh long có màu đỏ và khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các NT. Ở vụ I, NT4 có chỉ số a^* cao và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng và các NT còn lại, trừ NT2. Tương tự, ở vụ II, NT4 có chỉ số a^* cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với các NT còn lại trong thí nghiệm.

Chỉ số b^* thể hiện mức chuyển màu từ màu xanh dương đến màu vàng. Đối với vỏ quả thanh long thì màu đỏ chiếm ưu thế và lấn át màu vàng. Do vậy, chỉ số b^* của vỏ quả ở 2 vụ khá thấp, đạt mức 3,79-4,47 (vụ I) và 3,91-4,56 (vụ II), trong đó NT4 có màu xanh thấp và khác biệt rất có ý nghĩa so với các NT khác trong thí nghiệm, trừ NT3 (NAA 40 ppm + GA_3 30 ppm). Từ kết quả trên nhận thấy, chỉ số màu xanh lưu giữ trên vỏ quả thanh long khá thấp, quả có màu đỏ là chủ yếu.

Ảnh hưởng của NAA và GA_3 đến năng suất thanh long ruột tím hồng LD5

Bảng 4: ảnh hưởng của NAA và GA_3 đến năng suất thanh long ruột tím hồng LD5

NT	Năng suất (kg/trụ)	
	Vụ I	Vụ II
NAA 30 ppm + GA_3 30 ppm	24,39 bc	27,54 bc
NAA 30 ppm + GA_3 40 ppm	28,23 ab	30,85 ab
NAA 40 ppm + GA_3 30 ppm	25,34 b	27,76 bc
NAA 40 ppm + GA_3 40 ppm	30,69 a	34,85 a
TNo + GA_3	24,87 bc	28,06 bc
Đối chứng (không phun)	22,39 c	24,98 c
Mức ý nghĩa	*	*
CV%	13,27	12,96

Qua 2 vụ thu hoạch ghi nhận ở NT4 cho năng suất cao nhất (30,69 và 34,85 kg/trụ) và khác biệt có ý nghĩa so với NT đối chứng (22,39 và 24,98 kg/trụ) và các NT còn lại. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu về ảnh hưởng NAA và GA_3 trước đây trên thanh long ruột trắng [4, 8], tương tự GA_3 ở nồng độ 24 ppm với 5 lần phun trên thanh long ruột trắng (12 ngày sau ra nụ, sau khi quả được 2, 9, 16 và 28 ngày tuổi), làm tăng năng

suất, phẩm chất quả và kéo dài gian bảo quản nhưng không để lại dư lượng [11].

Kết luận

- Phun chất ĐHST 30 ppm NAA + 40 ppm GA_3 và 40 ppm NAA + 40 ppm GA_3 vào lúc nụ hoa đạt 10 ngày và các thời điểm là 5, 10, 15 và 20 ngày sau khi hoa nở trên thanh long ruột tím hồng LD5 giúp gia tăng độ chắc thịt quả (1,04 và 1,54 kg/cm²), trọng lượng quả (413,5 và 445,63 g/quả) và năng suất (30,65 và 34,85 kg/trụ).

- Kết quả phun 30 ppm NAA + 40 ppm GA_3 và 40 ppm NAA + 40 ppm GA_3 giúp gia tăng độ sáng của vỏ quả thanh long ruột tím hồng LD5.



Quả thanh long LD5 ở NT5 (a) và NT4 (b)

Lời cảm ơn

Nội dung nghiên cứu trên được thực hiện với sự hỗ trợ của Chương trình khoa học và công nghệ cấp nhà nước “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ phục vụ sản xuất và các sản phẩm chủ lực” (mã số KC06/11-15) thông qua dự án “Sản xuất thử nghiệm giống thanh long ruột tím hồng LD5” mã số KC06.DA12/11-15. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ quý báu của Ban Chủ nhiệm Chương trình KC06/11-15, Văn phòng các Chương trình trọng điểm cấp nhà nước, Bộ Khoa học và Công nghệ.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Ngọc Thi, Trần Thị Oanh Yến, Nguyễn Minh Châu (2010), *Kết quả lai tạo và khảo nghiệm giống thanh long có thịt quả màu tím hồng LD5*, Diễn đàn khuyến nông @ công nghệ lần 14, chuyên đề sản xuất và tiêu thụ thanh long bền vững, tr.36-47.
- [2] C.F. Wang, Y.F. You, X.S. Chen, J. Wang (2004), “Adjusting effect of brassinolide and GA_4 on the orange growth”, *Acta Agril*, **26**, pp.759-762.
- [3] S. Prasad, U. Kumar (2011), *Principles of horticulture*, pp.374-385.

[4] Nguyễn Hữu Hoàng (2007), *Ảnh hưởng của liều lượng và thời gian phun các chất ĐHST đến năng suất và phẩm chất trái thanh long ruột trắng (Hylocereus undatus) Chợ Gạo*, Kết quả nghiên cứu khoa học và công nghệ rau hoa quả 2005-2007, Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr.256-268.

[5] Nguyễn Quốc Hội, Lê Văn Hòa (2007), “Ảnh hưởng của calcium chloride và acid gibberellic xử lý trước thu hoạch đến phẩm chất và thời gian tồn trữ trái quýt hồng”, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, **7**, tr.10-18.

[6] G.O. Nkansah, J. Ofori-Anim, A. Mawuli (2012), “Gibberellic acid and Naphthaleneacetic acid affect fruit retention, yield and quality of Keitt Mangoes in the Coastal Savanna Ecological Zone of Ghana”, *American Journal of Plant Physiology*, **7**, pp.243-251.

[7] K.M. Moneruzzaman, A.B.M.S. Hossain, O. Normaniza, A.N. Boyce (2011), “Growth, yield and quality responses to GA₃ of wax apple *Syzygium samarangense*”, *Afr. J. Biotechnol.*, **10(56)**, pp.11911-11918.

[8] Le Van To, Nguyen Ngu, Nguyen Duy Duc, Ha Thi Thanh Huong (2002), “Dragon fruit quality and storage life: Effect of harvesting time, use of plant growth regulators and modified atmosphere packaging”, *Proceeding of the international symposium on tropical and subtropical fruits*, **2**, p.575.

[9] M.T. Wahdan, S.E. Habib, M.A. Bassal, E.M. Qaoud (2011), “Effect of some chemicals on growth, fruiting, yield and fruit quality of “SuccaryAbiad” mango cv”, *J. Amer. Sci.*, **7**, pp.651-658.

[10] S. Sarkar, B. Ghosh (2005), “Effect of growth regulators on biochemical composition of mango cv Amrapali”, *Environment and Ecology*, **23(2)**, pp.379-380.

[11] Đinh Tấn Linh (2011), *Ảnh hưởng của nồng độ acid gibberellic đến năng suất và phẩm chất thanh long [Hylocereus undatus (Haw.) Britt. Et Rose] tại xã Dương Xuân Hội, huyện Châu Thành, tỉnh Long An*, Luận văn tốt nghiệp kỹ sư nông học, Trường Đại học Nông lâm TP Hồ Chí Minh.

Nghiên cứu công nghệ nhân giống cấp I và dịch thể nấm Địa sâm *Coprinus comatus* (Co)

Phạm Thị Thu, Cồ Thị Thùy Vân, Trần Thu Hà, Nguyễn Duy Trình*

Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm, Viện Di truyền nông nghiệp

Ngày nhận bài 26/4/2016, ngày chuyển phản biện 29/4/2016, ngày nhận phản biện 23/5/2016, ngày chấp nhận đăng 27/5/2016

Nấm Địa sâm - *Coprinus comatus* (O.F. Mull.) được biết đến nhiều trên thế giới nhờ có giá trị dược liệu và dinh dưỡng cao. Nhằm xác định những điều kiện phù hợp cho sợi nấm Địa sâm sinh trưởng trong môi trường nhân giống cấp I và dạng dịch thể, các tác giả đã tiến hành nghiên cứu và xác định được môi trường nuôi cấy phù hợp nhất là PDPYA và YEPD. Nhiệt độ, pH và thời gian chiếu sáng tối ưu cho sự sinh trưởng của nấm Địa sâm trong điều kiện nhân giống cấp I lần lượt là $25\pm 1^\circ\text{C}$, pH = 6-7 và 0 h. Trong môi trường nhân giống dịch thể nấm Địa sâm, pH, nhiệt độ, nguồn carbon và nitơ tối ưu lần lượt là pH = 7,0; $25\pm 1^\circ\text{C}$; sucrose và peptone, cao nấm men.

Từ khóa: Địa sâm, giống cấp 1, giống dịch thể.

Chỉ số phân loại 4.1

Investigation on Propagation Technology of Master Spawn and Liquid Spawn of Shaggy Ink Cap (*Coprinus comatus* (Co))

Summary

Shaggy ink cap - *Coprinus comatus* (O.F. Mull.) has been known worldwide due to its great medicinal and nutritional values. The aim of this study was to acquire basic data regarding the suitable conditions for *C. comatus* mycelium growth in culture medium. The results of the study illustrated that PDPYA and YEPD were the most suitable culture media for cultivation of *C. comatus*. The optimal temperature, pH, and the length of lightening time for the mycelium growth of *C. comatus* master spawn were $25\pm 1^\circ\text{C}$, pH = 6-7, and 0 h, respectively. The pH, temperature, carbon and nitrogen sources for optimal growth of liquid spawn in submerged medium were pH = 7.0; $25\pm 1^\circ\text{C}$; sucrose and peptone, yeast extract, respectively.

Keywords: liquid spawn, master spawn, shaggy Ink Cap.

Classification number 4.1

Đặt vấn đề

Nấm Địa sâm (nấm trong chi *Coprinus*, họ Coprinaceae, ngành nấm đảm) có nhiều đặc tính dược liệu quý, được sử dụng để điều trị bệnh tiểu đường, tuần hoàn máu, rối loạn tiêu hóa, ức chế khối u [1].

Nhiều nghiên cứu về công nghệ nhân giống và nuôi trồng Địa sâm đã được công bố trên thế giới. Theo Dong và cs (2006) [2], môi trường nhân giống dịch thể phù hợp cho nấm Địa sâm là sucrose 3%, cám ngô 2%, cám mỳ 4%, KH_2PO_4 0,1% và $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, pH = 8,0. MYP (5% pepton, 3% cao nấm men, 3% malt extract, agar 20 g/l) là môi trường nhân giống gốc và cấp I phù hợp cho nấm Địa sâm sinh trưởng ở nhiệt độ 23-26°C và pH = 6-8 [3]. Môi trường MEA (20 g/l dextrose, 1 g/l peptone, 20 g/l cao malt, 20 g/l agar) có thể được sử dụng làm môi trường nhân giống nấm Địa sâm [4]. Nguồn carbon và nitơ tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của nấm Địa sâm là sucrose và tryptone [3]. Theo Chen (2000), Yang và Xue (2000), Shiyong và Zaipei (2007) [5-7], nấm Địa sâm sinh trưởng tốt trong môi trường có pH = 6,5-7,5. Trong khi đó, nghiên cứu của Kim (2000) [8] cho thấy, phạm vi nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của nấm Địa sâm là 25-27°C, còn theo Yang và Xue (2000) [6] là 24-28°C và Shiyong và Zaipei (2007) [7] là 22-28°C.

Mặc dù có nhiều giá trị dinh dưỡng và giá trị dược liệu nhưng nấm Địa sâm hiện vẫn là đối tượng mới mẻ, chưa nhận được sự quan tâm của ngành trồng nấm Việt Nam. Với mục tiêu đa dạng hóa nguồn gen sinh học, tạo cơ sở cho phát triển nấm Địa sâm, nâng cao năng suất và chất

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

lượng, chúng tôi tiến hành đánh giá một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm Địa sâm trong cả 2 môi trường nhân giống cấp I và dạng dịch thể.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm Địa sâm *Coprinus comatus* (O.F. Mull.) ký hiệu Co được Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm - Viện Di truyền nông nghiệp nhập nội từ Trung tâm Nghiên cứu nấm châu Á - Thái Bình Dương (Phúc Kiến - Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Nhân giống cấp I:

Môi trường nhân giống: giống gốc nấm Địa sâm được cấy chuyển sang cấp I trên 4 môi trường khác nhau: PGA, PDPYA, GPA và YEPD (bảng 1).

Bảng 1: thành phần môi trường nhân giống cấp I nấm Địa sâm

Môi trường Thành phần (g/l)	PGA	PDPYA	GPA	YEPD
Glucose	20,0	-	10,0	20,0
Cao nấm men	-	0,5	-	10,0
Peptone	-	2,0	2,0	20,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	0,5	-
KH ₂ PO ₄	-	-	0,5	-
Khoai tây	200,0	100,0	-	-
Agar	15,0	15,0	15,0	15,0
pH	7,0	7,0	7,0	7,0

Ghi chú: -: không xác định

pH môi trường nhân giống: môi trường được sử dụng để làm môi trường nhân giống dựa theo kết quả của môi trường nhân giống. Đánh giá đặc điểm sinh trưởng hệ sợi giống nấm Địa sâm tại các ngưỡng pH môi trường là 5, 6, 7 và 8.

Nhiệt độ nhân giống: nhân giống cấp I nấm Địa sâm ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau: 10±1°C, 15±1°C, 20±1°C, 25±1°C, 30±1°C và 35±1°C.

Chế độ ánh sáng nhân giống: sử dụng 4 chế độ ánh sáng (thời gian chiếu sáng/ngày): 24 h, 12 h, 6 h và 0 h với cường độ ánh sáng đèn led 500 lux.

Đặc điểm sinh trưởng, phát triển hệ sợi giống cấp I nấm Địa sâm: chỉ tiêu đánh giá đặc điểm sinh trưởng hệ sợi gồm đường kính sinh trưởng hệ sợi và mật độ hệ sợi. Phương pháp đánh giá mật độ hệ sợi như sau: 1) Mật độ sợi rất mỏng; 2) Mật độ hệ sợi mỏng; 3) Mật độ sợi trung bình; 4) Mật độ sợi dày; 5) Mật độ hệ sợi

dày đặc.

Nhân giống dịch thể:

pH môi trường dịch thể: môi trường YMK (20 g/l glucose, 5 g/l cao nấm men, 1 g/l MgSO₄.7H₂O, 2 g/l KH₂PO₄) được sử dụng làm môi trường nhân giống. Đánh giá các ngưỡng pH môi trường: 5, 6, 7 và 8.

Nhiệt độ môi trường: giống nấm Địa sâm cấy trong 250 ml môi trường dịch thể có pH tối ưu và nuôi ở các ngưỡng nhiệt độ (15, 20, 25 và 30°C)±1°C trong 4 ngày, tốc độ lắc 150 vòng/phút.

Nguồn carbon trong môi trường nhân giống: nguồn carbon 2% (w/v), cao nấm men 5 g/l, MgSO₄.7H₂O 1 g/l và KH₂PO₄ 2 g/l. Nguồn carbon khảo sát gồm: fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, sucrose.

Nguồn nitơ trong môi trường nhân giống: các nguồn nitrogen có nồng độ 5 g/l được đánh giá gồm: cao nấm men, peptone, natri nitrat (NaNO₃), amoni nitrat (NH₄NO₃).

Đánh giá sinh khối sợi: phương pháp đánh giá sinh khối sợi theo Park và cs (2001) [9].

Đánh giá mật độ khuẩn lạc cầu (KLC): mật độ KLC được xác định bằng số lượng KLC trong 10 ml dịch giống. Sử dụng kính Opatika Microscopes (Italia) có kết nối máy tính để đếm số lượng của KLC.

Phương pháp xử lý số liệu:

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích bằng sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2010. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất $p < 0,05$ được biểu hiện bằng ký tự (theo cột) sau giá trị trung bình và sai số chuẩn.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của môi trường nhân giống, pH, nhiệt độ và ánh sáng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm Địa sâm trong giai đoạn nhân giống cấp I

Bốn loại môi trường đang được sử dụng phổ biến hiện nay trong nhân giống nấm gốc và cấp I là: PGA, PDPYA, YEPD, GPA. Căn cứ vào các chỉ tiêu theo dõi, kết quả ghi nhận 2 môi trường PDPYA và YEPD phù hợp cho nấm Địa sâm phát triển. Mật độ hệ sợi dày đặc, phát triển dạng tỏa tròn, đều. So với kết quả của một số nghiên cứu đã được công bố trên thế giới, kết quả trong nghiên cứu này có một số sự khác biệt.

Theo Myoung-Jun (2009) [3], môi trường phù

hợp cho nấm Địa sâm phát triển là môi trường MYP (peptone 5 g/l, cao malt 3 g/l, cao nấm men 3 g/l và agar 20 g/l), còn Chaiyama và cs (2007) [4] là môi trường MEA (20 g/l dextrose, 1 g/l peptone, 20 g/l cao malt và 20 g/l agar). Có sự khác biệt về kết quả giữa các nghiên cứu có thể do sự khác nhau về chủng giống được sử dụng làm đối tượng trong thí nghiệm.

Đối với kết quả nghiên cứu pH, 4 giá trị pH được đánh giá là 5, 6, 7 và 8. Kết quả thí nghiệm cho thấy, môi trường có pH = 6,0-7,0 hệ sợi sinh trưởng tốt, tốc độ phát triển nhanh, mật độ sợi dày đặc, ở pH = 5,0 hoặc pH = 8,0 tốc độ sinh trưởng của hệ sợi tương đối chậm, mật độ hệ sợi ở mức trung bình. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Myoung-Jun (2009) và Chaiyama (2007). Theo nghiên cứu của Chen (2000), Yang và Xue (2000), Shiyong và Zaipei (2007) [5-7] thì sợi nấm Địa sâm sinh trưởng tốt trong môi trường có pH = 6,5-7,5.

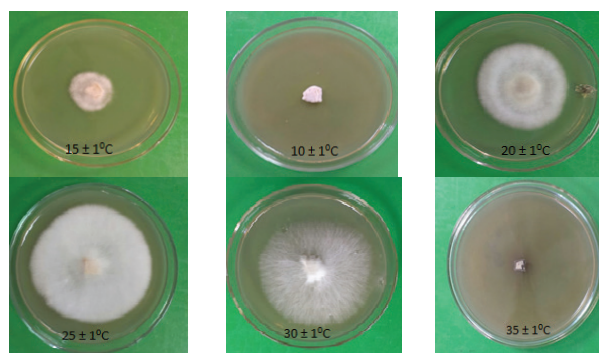
Với yếu tố nhiệt độ được quan sát ở các ngưỡng khác nhau ($10\pm 1^\circ\text{C}$, $15\pm 1^\circ\text{C}$, $20\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, $30\pm 1^\circ\text{C}$ và $35\pm 1^\circ\text{C}$), kết quả cho thấy, ở $25\pm 1^\circ\text{C}$, hệ sợi màu trắng, phát triển nhanh dạng tỏa tròn đều, đường kính hệ sợi $67,83\pm 2,46$ mm; ở ngưỡng $10\pm 1^\circ\text{C}$, sợi nấm phát triển kém, hệ sợi rất mỏng; ở 30°C , hệ sợi phát triển nhanh nhưng mật độ hệ sợi thưa. Đặc biệt, sợi nấm Địa sâm không thể phát triển trên môi trường nhân giống cấp I trong điều kiện nhiệt độ 35°C . Do đó, ngưỡng $25\pm 1^\circ\text{C}$ là nhiệt độ thích hợp cho công tác nhân giống cấp I nấm Địa sâm. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu đã được công bố trước đó.

Bảng 2: ảnh hưởng của môi trường, pH, nhiệt độ và thời gian chiếu sáng đến đường kính sinh trưởng và mật độ hệ sợi nấm Địa sâm trên môi trường nhân giống cấp I

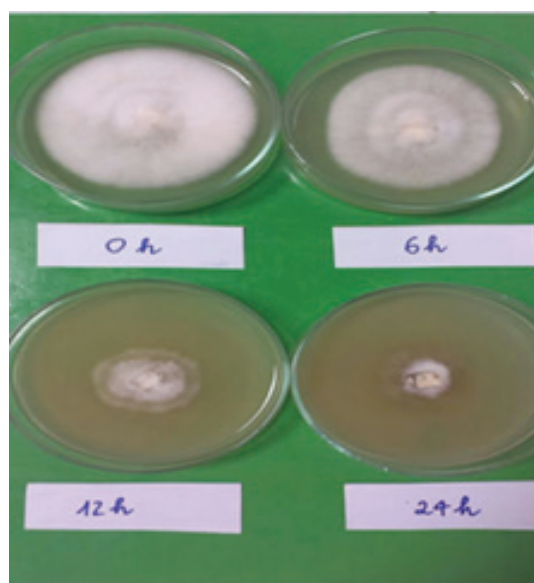
Chỉ tiêu		Đường kính (mm)	Mật độ
Nhân tố			
Môi trường	PGA	51,90±3,46 ^a	5+
	PDPYA	54,03±2,42 ^b	5+
	YEPD	53,64±2,56 ^b	5+
	GPA	49,39±2,99 ^a	3+
pH	5,0	44,16±1,77 ^a	3+
	6,0	55,45±1,63 ^b	5+
	7,0	54,35±1,62 ^b	5+
	8,0	49,35±1,42 ^c	3+
Nhiệt độ (°C)	10±1	9,64±1,83 ^a	1+
	15±1	20,77±2,34 ^b	2+
	20±1	52,37±1,73 ^c	5+
	25±1	67,83±2,46 ^d	5+
	30±1	65,47±1,17 ^d	2+
	35±1	-	-
Thời gian chiếu sáng (h/ngày)	0	67,25±2,08 ^a	5+
	6	53,32±2,00 ^b	3+
	12	26,51±2,28 ^c	2+
	24	9,67 ±1,81 ^d	1+

Ghi chú: trong phạm vi cùng một cột, cùng một nhân tố thí nghiệm, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$

Kết quả bảng 2 cho thấy, ánh sáng ảnh hưởng rõ rệt đến sự phát triển của hệ sợi nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống cấp 1. Ở điều kiện tối hoàn toàn, hệ sợi phát triển nhanh, đường kính sinh trưởng đạt $67,25\pm 2,08$ mm, sợi màu trắng, bông xốp, phát triển tỏa đều trên bề mặt môi trường. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Miles (1993) [10]. Trong điều kiện chiếu sáng 24 giờ, sợi phát triển kém, đường kính sinh trưởng chỉ đạt $9,67\pm 1,81$ mm, sợi mảnh không nhìn rõ tua sợi. Thời gian chiếu sáng 6 và 12 h cũng ảnh hưởng nhất định đến tốc độ phát triển và đặc điểm hình thái của sợi. Sợi nấm Địa sâm phát triển không cân đối trên bề mặt môi trường, có nhiều vòng tròn đồng tâm, màu trắng vàng nhạt khi được chiếu sáng 6 h/ngày. Mật độ hệ sợi có sự thay đổi rõ ràng khi được chiếu sáng 12 h/ngày. Mật độ hệ sợi mỏng, màu trắng vàng, sợi mảnh. Đường kính sinh trưởng hệ sợi chỉ đạt $26,51\pm 2,28$ mm.



Hình 1: ảnh hưởng của nhiệt độ đến nấm Địa sâm trên môi trường nhân giống cấp 1



Hình 2: ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến sự phát triển và đặc điểm hình thái của nấm Địa sâm trên môi trường nhân giống cấp 1

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, nguồn carbon, nitơ đến sự hình thành và phát triển KLC của nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống dịch thể

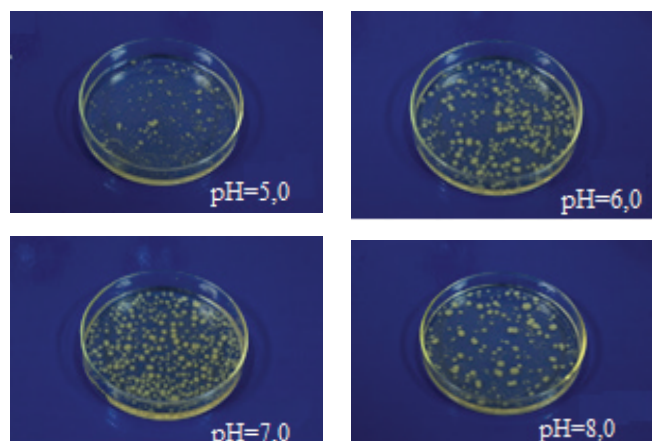
pH là nhân tố ảnh hưởng đến sinh khối, khả năng hấp phụ chất dinh dưỡng, hình thái và cấu trúc tế bào, độ tan của muối và trạng thái ion của cơ chất, hoạt động của enzyme [11]. Nấm Địa sâm được nhân giống trên môi trường YMK với 4 ngưỡng pH khác nhau (5, 6, 7 và 8). Căn cứ vào sinh khối sợi và mật độ KLC (bảng 3) cho thấy, pH tối ưu là 7,0 với sinh khối khô $10,72 \pm 0,48$ g/l, mật độ KLC dày $68 \pm 1,35$ KLC/10 ml dịch giống.

Theo Vladimir (2012) [11], dải nhiệt từ 25 đến 28°C là phù hợp nhất để hầu hết các loài nấm nhân sinh khối. Để tìm ra nhiệt độ phù hợp cho sự hình thành và phát triển của KLC nấm Địa sâm, chúng tôi đã nghiên cứu đánh giá sự sinh trưởng hệ sợi nấm ở 5 ngưỡng nhiệt độ: $10 \pm 1^\circ\text{C}$, $15 \pm 1^\circ\text{C}$, $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ và $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Kết quả ghi nhận, nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ phù hợp nhất cho nấm Địa sâm phát triển.

Carbon và nitơ là 2 nhân tố cơ bản cho sự sinh trưởng của vi sinh vật. Nguồn carbon ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và chuyển hóa của vi sinh vật. Giống nấm Địa sâm được nhân giống trong môi trường chứa các nguồn carbon khác nhau (fructose, glucose, lactose, maltose, sucrose). Trong các nguồn carbon được khảo sát, sucrose cho năng suất sinh khối khô cao nhất ($11,11 \pm 1,25$) với mật độ KLC ($64 \pm 1,62$). Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã thu được kết quả tương tự, sucrose là nguyên liệu phù hợp để cung cấp nguồn carbon cho nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống dịch thể [2, 3]. Trong khi kết quả nghiên cứu của Chaiyama và cs (2007) [4] cho rằng, mannose và maltose mới là 2 nguồn nguyên liệu cung cấp carbon phù hợp hơn cho sự phát triển của nấm Địa sâm. Nitơ là nhân tố cần thiết trong tổng hợp enzyme trong cả quá trình chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp. 4 nguồn nitơ đã được khảo sát gồm: cao nấm men, peptone, natri nitrat, amoni nitrat.

Bảng 3: ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, nguồn carbon, nguồn nitơ đến sinh khối sợi và mật độ KLC nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống dịch thể

Nhân tố	Chỉ tiêu	Sinh khối sợi (g/l)	Mật độ KLC
pH	5,0	$3,88 \pm 0,62^a$	$28 \pm 1,18$
	6,0	$9,14 \pm 0,56^b$	$52 \pm 1,28$
	7,0	$10,72 \pm 0,48^c$	$68 \pm 1,35$
	8,0	$5,14 \pm 0,88^d$	$35 \pm 0,99$
Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	10 ± 1	$3,58 \pm 0,33^a$	$25 \pm 1,09$
	15 ± 1	$4,52 \pm 0,55^b$	$35 \pm 1,15$
	20 ± 1	$9,83 \pm 1,11^c$	$56 \pm 1,58$
	25 ± 1	$11,38 \pm 1,10^d$	$70 \pm 2,56$
	30 ± 1	$8,65 \pm 0,82^c$	$49 \pm 1,03$
Nguồn carbon (2%)	Fructose	$10,13 \pm 1,28^a$	$51 \pm 1,56$
	Maltose	$10,71 \pm 1,14^{a,c}$	$57 \pm 1,30$
	Glucose	$10,52 \pm 1,05^a$	$58 \pm 1,13$
	Lactose	$7,73 \pm 1,15^b$	$30 \pm 1,39$
	Sucrose	$11,11 \pm 1,25^c$	$64 \pm 1,62$
Nguồn nitơ (0,5%)	Cao nấm men	$11,60 \pm 2,44^a$	$67 \pm 1,57$
	Peptone	$11,69 \pm 1,85^a$	$64 \pm 0,93$
	Natri nitrat	$4,88 \pm 1,37^b$	$40 \pm 0,96$
	Amoni nitrat	$5,05 \pm 1,10^b$	$44 \pm 1,15$



Hình 3: ảnh hưởng của pH môi trường đến hình thái và mật độ KLC nấm Địa sâm trong môi trường dịch thể

Kết quả ghi nhận có thể sử dụng cao nấm men hoặc peptone để cung cấp nguồn nitrogen cho nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống dịch thể. Theo Myoung-Jun (2009) [3], nguồn nitơ hữu cơ cho hiệu quả nhân giống tốt hơn so với nguồn nitơ vô cơ (NaNO_3 , NH_4NO_3 và NH_4Cl).

Kết luận

Môi trường nhân giống cấp I phù hợp cho nấm Địa sâm là PDPYA hoặc YEPD. Nhiệt độ, pH và thời gian chiếu sáng tối ưu cho sự sinh trưởng của giống nấm Địa sâm cấp I lần lượt là $25 \pm 1^\circ\text{C}$, pH = 6-7 và 0 h. Giống nấm dịch thể Địa sâm phát triển tốt trong điều kiện pH, nhiệt độ, nguồn carbon và nitơ lần lượt là pH = 7,0; $25 \pm 1^\circ\text{C}$; sucrose và peptone, cao nấm men.

Tài liệu tham khảo

- [1] G.R. Renato, L.M.A.L. Lani, K. Kei, P.K. Sofronio, K. Tadahiro, E. Fumio (2009), “*Coprinus comatus*, a newly domesticated wild nutraceutical mushroom in the Philippines”, *Journal of Agricultural Technology*, **5(2)**, pp.299-316.
- [2] Y.H. Dong, H.Q. Wang, L.Y. Qiu (2006), “Optimization of a liquid growth medium for *Copinus comatus*”, *Acta Edulis Fungi*, **13**, pp.29-31.
- [3] Myoung-Jun Jang, Yun-Hae Lee, Jun-Jie Liu, Young-Cheol Ju (2009), “Optimal Conditions for the Mycelial Growth of *Coprinus comatus* Strains”, *Mycobiology*, **37(2)**, pp.103-108.
- [4] V. Chaiyama, V. Petcharat, P. Kritsaneepaiboon (2007), “Some morphological and physiological aspects and cultivation of *Copinus comatus* (O.F. Mull.) Gray. Songklanakarin”, *J. Sci. Technol*, **29**, pp.261-274.
- [5] M.M. Chen (2000), “Cultivation techniques for Dictyophora, Polyporus umbellata, *Copinus comatus*. Science and cultivation of edible fungi”, *Mushroom Science*, **2**, pp.543-548.
- [6] G.L. Yang, H.B. Xue (2000), “Specialized cultivation manual about edible and medicinal mushroom”, *China Agricultural Press*, pp.361-368.
- [7] J. Shiyong, J. Zaipei (2007), “Mushroom cultivation techniques”, *Chemical Industry Press*, pp.118-122.
- [8] Y.G. Kim (2000), “Studies on the morphology characteristics of *Coprinus* species and artificial cultivation of *C. comatus*. Master’s degree thesis”, *Chungnam National University*, Korea.
- [9] J.P. Park, S. Kim, H.J. Hwang, J.W. Yun (2001), “Optimization of submerged culture conditions for the mycelia growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*”, *The Society for Applied Microbiology*, **33**, pp.76-81.
- [10] P.G. Miles (1993), “Biological background for mushroom breeding, In Genetics and breeding of Edible Mushroom”, *Gorden and Breach Science publishers*.
- [11] E. Vladimir (2012), “Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products”, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **14(3)**, pp.211-239.

Một số cây trội Sỡ chè (*Camellia sasanqua* Thunb.) có lượng hạt lớn và hàm lượng dầu cao ở Nghệ An

Hoàng Văn Thắng^{1*}, Nguyễn Toàn Thắng¹, Phạm Đình Sâm¹, Hoàng Thị Nhung¹, Phí Công Thường²

¹Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

²Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 2/5/2016, ngày chuyển phản biện 4/5/2016, ngày nhận phản biện 18/5/2016, ngày chấp nhận đăng 2/6/2016

Đánh giá Sỡ chè (*Camellia sasanqua* Thunb.) theo các chỉ tiêu tổng hợp trong 4 năm tại Nghĩa Đàn (Nghệ An) đã chọn được 19 cây trội có lượng quả đạt 10,6-23,1 kg/cây/năm, lượng hạt đạt 5,6-11,6 kg/cây/năm, hàm lượng dầu trong nhân là 50-56,97%; lượng dầu 1,7-4,1 kg/cây, vượt trị số trung bình của quần thể 123,3-434%. Đây cũng là những cây có chỉ số axit, peroxit trong dầu (lần lượt là 0,19-1,24 mg KOH/g dầu và 1,92-4,26 meqO₂/kg dầu) thấp hơn quy định trong TCVN 7597:2007 về dầu thực vật (tương ứng là 4 mg KOH/g dầu và 10 meqO₂/kg dầu). Đây là nguồn vật liệu tốt để nhân giống và tiếp tục chọn giống Sỡ chè có năng suất hạt và dầu cao.

Từ khóa: cây trội, Nghệ An, Sỡ chè.

Chỉ số phân loại 4.4

Some plus trees of *Camellia sasanqua* Thunb. having high yield of seed and oil in Nghe an province

Summary

Completing evaluation of *Camellia sasanqua* Thunb. in 4 years at Nghĩa Đàn (Nghệ An) had selected 19 plus trees having 10.6-23.1 kg fruits per tree per year, 5.6-11.6 kg seeds per tree per year with oil content in kernels of 50-56.97%. Oil yield of 19 plus trees ranged from 1.7 to 4.1 kg per tree per year, 123.3-434% higher than that of population (0.67-0.76%). The plus trees have acid index of 0.19-1.24 mg KOH/g oil and peroxide index of 1.92-4.26 meqO₂/kg oil, lower than that following Vietnamese standard TCVN 7597-2007 for vegetable edible oil (< 4 mg KOH/g oil and < 10 meqO₂/kg oil respectively). These plus trees are good materials for later propagation and improvement of *Camellia sasanqua* Thunb. for high yield of seed and oil.

Keywords: *Camellia sasanqua* Thunb., Nghệ An, plus tree.

Classification number 4.4

Đặt vấn đề

Sỡ chè là một trong các loài cây rừng đa tác dụng (lấy hạt, gỗ, củi, hoa nuôi ong...). Sản phẩm chính của cây Sỡ là dầu béo. Dầu Sỡ có hàm lượng axit oleic cao hơn 80%, chỉ số axit trong dầu sỡ thô dưới 4 mg KOH/g dầu, chỉ số peroxit dưới 10 meqO₂/kg dầu, thấp hơn quy định trong TCVN 7597:2007 về dầu thực vật, đảm bảo an toàn cho người sử dụng [1, 2].

Sỡ chè được trồng nhiều nhất ở Nghệ An, và cũng được trồng ở một số tỉnh khác như Vĩnh Phúc, Quảng Ninh, Lạng Sơn, Phú Thọ... Tuy nhiên, do nguồn giống chưa được chọn lọc, kết hợp với các biện pháp kỹ thuật trồng quảng canh nên năng suất dầu của các rừng trồng Sỡ chè nhìn chung còn thấp, chỉ đạt trung bình 250-400 kg dầu/ha/năm, trong khi đó ở Trung Quốc, nhờ sử dụng nguồn giống tốt kết hợp với trồng thâm canh đã đưa năng suất dầu đạt tới 925-939 kg/ha/năm [3]. Điều này cho thấy, khâu chọn giống đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao năng suất dầu của rừng trồng sỡ. Giai đoạn 1987-1989 Nguyễn Hoàng Nghĩa và Đoàn Thị Bích [4] đã nghiên cứu chọn lọc được 14 cây trội các giống Sỡ cam, Sỡ quýt ở Cao Lộc (Lạng Sơn) cho hàm lượng dầu vượt trung bình 2-8 lần. Như vậy, có thể nói việc nghiên cứu chọn lọc cây trội các giống sỡ cho năng suất quả và dầu cao nhằm cung cấp nguồn vật liệu để nhân giống, phục vụ công tác trồng rừng sỡ theo hướng lấy quả ép dầu là rất cần thiết.

Giai đoạn 2012-2015, nhiệm vụ “Khai thác và phát

*Tác giả liên hệ: Email: hoangthang75@gmail.com

triển nguồn gen cây Sờ chè” do Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam chủ trì thực hiện đã chọn lọc được 54 cây trội của loài Sờ chè ở Nghệ An và Lai Châu. Bài viết này chỉ nêu kết quả chọn lọc 19 cây trội Sờ chè ở Nghệ An có hàm lượng dầu đạt trên 50%, là một trong các kết quả đã thực hiện của nhiệm vụ nêu trên.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu là loài Sờ chè trồng thuần loài năm 1998 (2 ha) và năm 1972 (3 ha) với mật độ còn lại từ 700-900 cây/ha tại xã Nghĩa Lộc, huyện Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An.

Phương pháp nghiên cứu

Áp dụng phương pháp chọn cây mẹ theo tiêu chuẩn ngành 04 TCN 147-2006 về công nhận giống cây trồng lâm nghiệp của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn để chọn lọc ra các cây trội trong rừng trồng đều tuổi có độ vượt sản phẩm cuối cùng (lượng dầu/cây) hơn 15% so với trung bình quần thể [5]. Cây trội đảm bảo được các tiêu chuẩn sau đây:

- Cây sinh trưởng từ trung bình trở lên, hình thái cân đối, tán rộng, không bị bệnh.
- Có tỷ lệ hạt/quả cao hơn so với giá trị trung bình quần thể.
- Lượng hạt cao hơn từ 20% so với trung bình quần thể.
- Hàm lượng dầu cao hơn từ 10% so với trung bình quần thể.

Điều tra chọn cây trội theo phương pháp ô tiêu chuẩn điển hình, tạm thời. Số liệu thu thập là các chỉ tiêu sinh trưởng, lượng quả, hạt của các cây trong các rừng trồng Sờ chè. Với mỗi rừng trồng Sờ chè được lựa chọn để chọn lọc cây trội, lập 3 ô tiêu chuẩn điển hình để đo đếm các chỉ tiêu sinh trưởng và thu thập lượng quả của các cây trong ô, diện tích mỗi ô tiêu chuẩn là 500 m². Trong mỗi ô tiêu chuẩn, thu thập quả của toàn bộ các cây. Với mỗi cây trội, lấy một mẫu hạt để phân tích đặc điểm dầu, đồng thời với mỗi loại rừng trồng lấy 3 mẫu hạt đã được trộn đều của các cây làm mẫu trung bình quần thể để so sánh đặc điểm dầu với các cây trội.

Đặc điểm dầu của các cây trội được phân tích tại Viện Công nghiệp thực phẩm. Các chỉ tiêu phân tích dầu bao gồm: hàm lượng dầu trong nhân hạt (theo phương pháp Soxhlet), độ ẩm hạt (theo TCVN 6120:2007), chỉ

số axit (theo TCVN 6127:2007), chỉ số peroxit (theo TCVN 6121:2007). Đánh giá chỉ số axit và peroxit dựa theo TCVN 7597:2007 về dầu thực vật (quy định chỉ số axit dầu thô nhỏ hơn 4 mg KOH/g dầu và chỉ số peroxit nhỏ hơn 10 meqO₂/kg dầu). Căn cứ vào lượng quả, hàm lượng dầu, tỷ lệ nhân/hạt và tỷ lệ hạt chắc để tính lượng dầu cho các cây trội đã chọn lọc. Sử dụng các phương pháp so sánh mẫu và phân tích thống kê trên phần mềm Excel để xử lý số liệu chọn lọc cây trội.

Kết quả và thảo luận

Căn cứ vào lượng quả và hàm lượng dầu của các cây trội được theo dõi trong 4 năm liên tục (2012-2015) đã chọn lọc được 19 cây trội loài Sờ chè có hàm lượng dầu đạt trên 50%. Các cây trội này đang được gây trồng theo hướng lấy quả ở xã Nghĩa Lộc, huyện Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An. 19 cây trội loài Sờ chè này đã được Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Nghệ An cấp chứng chỉ công nhận nguồn giống cây trồng lâm nghiệp vào tháng 10/2015.

Các cây trội Sờ chè ở Nghệ An mặc dù có tuổi tương đối lớn (17-43 tuổi) nhưng sinh trưởng về chiều cao cũng chỉ đạt 6-8,7 m. Đường kính tán lá của các cây trội đều tương đối lớn, dao động trong khoảng 4,5-8,2 m. Với đường kính tán lá rộng nên hầu hết các cây trội đều cho lượng quả cao. Kết quả theo dõi lượng quả và hạt của 19 cây trội trong 4 năm được tổng hợp trong bảng 1.

Bảng 1: lượng quả và hạt của 19 cây trội Sờ chè ở Nghệ An (trung bình trong 4 năm từ 2012 đến 2015)

TT	Cây trội	Tuổi (năm)	Lượng quả/cây (kg)	Lượng hạt/cây (kg)	Tỷ lệ hạt chắc (%)	Độ ẩm hạt (%)	Tỷ lệ nhân/hạt (%)
1	ND1	43	13,3	8,2	99,7	13,4	50,5
2	ND3	43	16,3	8,2	100,0	14,0	69,1
3	ND4	43	16,2	9,7	99,2	12,0	60,7
4	ND6	43	16,2	9,2	99,7	17,8	40,5
5	ND10	43	13,5	8,3	98,9	11,5	48,6
6	ND11	43	15,3	8,8	100,0	25,0	60,2
7	ND13	17	16,9	9,9	99,7	15,0	57,5
8	ND14	17	17,4	10,8	100,0	39,0	71,3
9	ND15	17	18,4	11,0	99,5	26,0	58,9
10	ND16	17	19,5	10,4	99,1	14,0	61,3
11	ND17	17	23,1	11,6	99,4	33,0	58,0
12	ND18	17	13,9	7,5	99,8	36,0	65,1
13	ND21	17	10,6	5,6	99,5	12,3	60,8
14	ND23	17	12,0	6,1	99,7	20,4	57,1
15	ND30	43	18,9	10,4	98,6	24,0	59,5
16	ND32	43	18,6	9,4	100,0	8,5	65,2
17	ND33	43	14,2	7,2	100,0	14,0	67,1
18	ND34	43	17,1	9,0	99,6	5,5	61,8
19	ND35	43	18,4	8,9	99,8	19,0	65,8
Trung bình quần thể		17 tuổi	5,7	2,9	98,2	21,5	54,6
		43 tuổi	5,1	2,6	97,6	16,4	49,8

Số liệu bảng 1 cho thấy, lượng quả trung bình trong 4 năm của 19 cây trội Sở chè đạt 10,6-23,1 kg/cây/năm (trung bình là 16,3 kg/cây/năm), tương ứng với lượng hạt 5,6-11,6 kg/cây/năm (trung bình là 9 kg/cây/năm), trong khi đó lượng hạt trung bình quần thể của rừng 17 tuổi chỉ đạt 2,9 kg/cây/năm và trung bình quần thể của rừng 43 tuổi đạt 2,6 kg/cây/năm. Các cây trội được chọn đều có tỷ lệ hạt chắc cao, đạt trên 98,6% và có tỷ lệ nhân/hạt đạt trung bình là 60%.



Ảnh 1: quả trên cây trội ND10

Ảnh 2: quả trên cây trội ND14

Căn cứ vào lượng hạt, hàm lượng dầu, tỷ lệ nhân/hạt và tỷ lệ hạt chắc đã tính được lượng dầu và độ vượt về lượng dầu (trung bình trong 4 năm) của 19 cây trội so với trung bình quần thể như trong bảng 2.

Bảng 2: lượng dầu của 19 cây trội Sở chè ở Nghệ An (trung bình trong 4 năm từ 2012 đến 2015)

TT	Cây trội	Hàm lượng dầu trong nhân (%)	Lượng dầu/cây		Chỉ số axit (mg KOH/g dầu)	Chỉ số peroxit (meqO ₂ /kg dầu)
			Khối lượng (kg)	Vượt TB quần thể (%)		
1	ND1	53,52	2,2	230,4	1,24	4,26
2	ND3	56,97	3,2	384,5	0,41	3,60
3	ND4	53,41	3,1	368,0	0,42	2,50
4	ND6	55,92	2,1	210,4	0,74	3,12
5	ND10	52,32	2,1	213,4	0,98	2,09
6	ND11	55,33	2,9	339,6	0,91	3,11
7	ND13	54,10	3,1	302,3	0,84	3,18
8	ND14	53,28	4,1	434,0	0,96	1,35
9	ND15	54,05	3,5	357,1	0,98	2,69
10	ND16	50,00	3,2	313,6	0,28	3,80
11	ND17	51,49	3,4	348,1	0,98	1,30
12	ND18	51,56	2,5	230,5	0,28	1,58
13	ND21	50,86	1,7	123,3	0,87	3,20
14	ND23	50,34	1,8	130,8	1,50	3,33
15	ND30	50,53	3,1	303,4	0,79	2,39
16	ND32	50,16	3,1	358,1	0,19	1,92
17	ND33	53,49	2,6	287,6	0,33	4,10
18	ND34	52,80	2,9	338,8	0,19	2,52
19	ND35	52,87	3,1	362,1	0,72	2,10
Trung bình quần thể	17 tuổi	45,20	0,76	-	0,89	2,73
	43 tuổi	47,42	0,67	-	0,47	3,15

Số liệu bảng 2 cho thấy, hàm lượng dầu của 19 cây trội loài Sở chè ở Nghệ An đạt 50-56,97% (trung bình là 52,79%), tương ứng với lượng dầu trung bình đạt 1,7-4,1 kg/cây/năm (trung bình của 19 cây trội là 2,8 kg dầu/cây/năm). So với trung bình quần thể, lượng dầu của 19 cây trội Sở chè ở Nghệ An vượt 123,3-434%. Kết quả này cho thấy, 19 cây trội Sở chè có độ vượt rất cao so với trung

bình quần thể. Mặc dù hàm lượng dầu của 19 cây trội so với trung bình quần thể không chênh lệch nhiều nhưng do lượng hạt trong các năm của 19 cây trội cao hơn 3-4 lần so với trung bình quần thể, dẫn đến lượng dầu của các cây trội nhìn chung vượt tương đối cao so với trung bình quần thể.

Kết quả phân tích dầu cũng cho thấy, chất lượng dầu của 19 cây trội đạt được tương đối tốt, các chỉ số axit và peroxit của 19 cây trội đều thấp hơn so với quy định trong TCVN 7597:2007 về dầu thực vật. Theo tiêu chuẩn này, dầu ăn thực vật đảm bảo chất lượng phải có chỉ số axit dầu thô nhỏ hơn 4 mg KOH/g dầu và chỉ số peroxit nhỏ hơn 10 meqO₂/kg dầu. Chỉ số axit trong dầu của 19 cây trội dao động từ 0,19 đến 1,5 mg KOH/g (trung bình là 0,72 mg KOH/g) và chỉ số peroxit dao động 1,3-4,26 meqO₂/kg dầu (trung bình là 2,74 meqO₂/kg dầu). Chỉ số axit càng cao, tức lượng axit tự do càng nhiều và chất lượng của dầu hạt sẽ càng không tốt.

Kết luận

- 19 cây trội loài Sở chè ở Nghệ An có lượng quả dao động 10,6-23,1 kg/cây/năm, tương ứng với lượng hạt đạt 5,6-11,6 kg/cây/năm.

- Hàm lượng dầu của 19 cây trội loài Sở chè ở Nghệ An đạt 50-56,97%, trung bình là 52,79%. So với trung bình quần thể thì lượng dầu của 19 cây trội vượt 123,3-434%.

- Hàm lượng các chỉ số axit và peroxit trong dầu của 19 cây trội đảm bảo tốt theo quy định trong Tiêu chuẩn Việt Nam về dầu ăn thực vật.

Đây là các gen Sở chè có lượng quả và hàm lượng dầu cao, là cơ sở cho việc chọn và nhân giống phục vụ trồng rừng Sở chè theo hướng lấy quả ở Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- [1] Hoàng Văn Thắng (2013), *Nghiên cứu một số cơ sở khoa học và các biện pháp kỹ thuật trồng rừng sớ (Camellia spp) theo hướng lấy quả*, Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
- [2] Hoàng Văn Thắng và cs (2015), *Khai thác và phát triển nguồn gen cây sớ (Camellia sasanqua Thunb.)*, Báo cáo tổng kết nhiệm vụ KH&CN, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
- [3] Mã Cẩm Lâm, Trần Vĩnh Trung (2005), *Khái quát về nghiên cứu và phát triển cây sớ tại Trung Quốc*, Tài liệu Hội thảo phát triển cây sớ tại Hà Nội.
- [4] Nguyễn Hoàng Nghĩa, Đoàn Thị Bích (1995), *Tuyển chọn giống sớ có năng suất cao cho vùng Lạng Sơn*, Báo cáo Kết quả nghiên cứu khoa học về chọn giống cây rừng, Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr.60-78.
- [5] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2006), *Tiêu chuẩn ngành 04 TCN 147-2006 về tiêu chuẩn công nhận giống cây trồng lâm nghiệp (soát xét lần 1) kèm theo Quyết định số 4080/QĐ/BNN-KHCN ngày 29/12/2006 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*.

Nghiên cứu chuyển gen Interleukin-2 của người vào cây ngô (*Zea mays* L.) phục vụ sản xuất vaccine thực phẩm điều trị bệnh ung thư

Nguyễn Xuân Thắng^{1*}, Nguyễn Chí Thành¹, Mariam Sticklen², Bùi Mạnh Cường¹

¹Viện Nghiên cứu Ngô

²Trường Đại học Michigan, Mỹ

Ngày nhận bài 4/2/2016, ngày chuyển phản biện 29/2/2016, ngày nhận phản biện 28/3/2016, ngày chấp nhận đăng 18/4/2016

Trong nghiên cứu này, gen Interleukin-2 (*rhIL-2*) của người được chuyển vào hệ gen của cây ngô bằng phương pháp súng bắn gen và cuối cùng thu được các dòng ngô hữu thụ thể hệ T3. Plasmid được thiết kế với cấu trúc gồm có gen *rhIL-2* được điều khiển bởi gen promoter rubisco ở lục lạp, một chuỗi peptide mã hóa đặc thù trong mạng lưới nội chất, đoạn đánh dấu 6X histodin và gen terminator NOS. Thông qua phân tích PCR và quá trình hoạt hóa (quá trình phiên mã và dịch mã), các tác giả đã xác định được sự có mặt của gen chuyển trong các cây ngô chuyển gen ở thể hệ T3. Những nghiên cứu cần thực hiện tiếp theo là việc đánh giá sự tổng hợp *rhIL-2* trong cây ngô chuyển gen trên đồng ruộng và tiến hành các thí nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng về khả năng thương mại hóa sản phẩm *rhIL-2* từ cây ngô chuyển gen trong việc điều trị các bệnh ung thư.

Từ khóa: chuyển gen, gen Interleukin-2, ngô, ung thư, vaccine thực phẩm.

Chỉ số phân loại 4.6

Transplantation of recombinant human IL-2 in maize for production of edible vaccine against human cancer cells

Summary

Recombinant human IL-2 (*rhIL-2*) is normally produced in *E. coli* via genetic engineering and used for treatment of various cancer cells. However, when produced in *E. coli*, it is very expensive because *E. coli* requires sugar containing media for its growth. This study explored the feasibility of producing biologically active *rhIL-2* in the green tissues of transgenic *Zea mays* (corn) plants in large quantity because the plants can cheaply produce recombinant proteins while getting their energy from freely available sun via photosynthesis. The *rhIL-2* gene was initially optimized to maximize its expression in plants. Then, a plasmid structure containing *rhIL-2*, Rubisco green-specific promoter, endoplasmic reticulum transit peptide, NOS terminator and 6-histodin tag was developed and bombarded into immature embryo cell lines to produce fertile corn plants. Molecular analyses (PCR, Reverse transcriptase PCR and western blotting) confirmed that the human *IL-2* had integrated, transcribed and translated in up to T3 transgenic maize plants. The next studies will be carried out in the preclinical and clinical tests of *rhIL-2* products and also their commercialization ability for the treatment of cancer.

Keywords: cancer, edible vaccine, human IL-2, maize, transformation.

Classification number 4.6

Giới thiệu

Phát triển từ cuối những năm 70 của thế kỷ trước, cây trồng biến đổi gen đã mang lại nhiều lợi ích to lớn cho con người về sản xuất lương thực, thức ăn chăn nuôi, năng lượng và các sản phẩm công nghiệp [1]. Gần đây, nhiều tác giả đã tiến hành nghiên cứu việc sử dụng các cây trồng nông nghiệp biến đổi gen để sản xuất các vaccine thực phẩm như chuyển gen viêm gan B [2], gen kháng nguyên bề mặt vỏ HIV-1 gp 120 vào khoai tây [3]; chuyển gen kháng nguyên cholera kháng bệnh dịch tả [4], gen kháng nguyên phòng bệnh than vào cây thuốc lá [5]; gen kháng nguyên HIV vào cây rau chân vịt [6]...

Ưu điểm của cây trồng chuyển gen để sản xuất vaccine thực phẩm là dễ trồng, sản lượng cao, dễ bảo quản và sử dụng, phương thức sản xuất vaccine đơn giản

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

và an toàn. Ngô đã được sử dụng trong chuyển gen để tạo ra các vaccine thực phẩm và các sản phẩm khác như chất dẻo sinh học do có sinh khối cao, có thể bảo quản trong thời gian dài ở nhiệt độ thường so với những cây chuyển gen tạo vaccine có tế bào chứa hàm lượng nước cao như các loại rau củ quả [7]. Với nhu cầu về vaccine thực phẩm ngày càng tăng và yêu cầu giảm chi phí trong sản xuất thì cây ngô được cho là một trong những cây trồng lý tưởng cho việc sản xuất vaccine thực phẩm.

Interleukin-2 (*IL-2*), hay còn gọi là yếu tố kích thích sinh trưởng dòng tế bào T đã được chứng minh là có hiệu quả trong việc điều trị các bệnh ung thư như ung thư phổi, bạch cầu, buồng trứng, vú, máu hay thận. Trên thực tế, *IL-2* được tạo ra thông qua hệ thống *E.coli* đã được FDA kiểm định và được Novartis Pharmaceuticals thương mại hóa với tên nhóm hoạt chất là “Aldesleukin” hay “Proleukin” và được bán trên thị trường với tên sản phẩm là Roleukin hay Aldesleukin để điều trị ung thư da và thận giai đoạn cuối. Việt Nam cũng đã thành công trong việc hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất *IL-2* tái tổ hợp trên dòng tế bào *E.coli* và hiện tại Công ty TNHH MTV Vaccine và Sinh phẩm số 1 (Bộ Y tế) đang triển khai dự án sản xuất thử nghiệm trong hỗ trợ điều trị bệnh ung thư ở Việt Nam (<http://vpct.gov.vn/>).

Hiện nay, các sản phẩm *IL-2* tái tổ hợp của người (*rhIL-2*) thương mại hóa trên thị trường được tạo ra bằng *E. coli* thường có giá cao, chi phí cho mỗi lần điều trị lên tới 11.400 USD [8]. Năm 2013, các nhà khoa học công bố đã sản xuất *rhIL-2* trong mạng lưới nội chất (ER) từ các cơ quan sinh dưỡng ở cây thuốc lá. Sản phẩm *rhIL-2* đã được tinh chế và đánh giá khả năng ức chế tế bào lá lách CD4⁺ T-Cells [8]. ER là hệ thống các khoang và túi màng nằm trong tế bào thực vật, có chức năng biến đổi protein [9]. Việc tích lũy protein tái tổ hợp trong ER ở tế bào thực vật không ảnh hưởng tới cây chủ. Mặt khác, ER chứa nhiều phân tử chaperones, mang glycosyl hóa protein và vắng mặt enzym proteases, điều này giúp cho việc giải mã và hình thành các protein tái tổ hợp. ER cũng có vai trò định hướng quá trình vận chuyển protein ở thực vật và do đó được xem như hệ thống lý tưởng cho việc sản xuất hầu hết các protein tái tổ hợp, trong đó có các chất được phẩm ở thực vật [8, 10, 11].

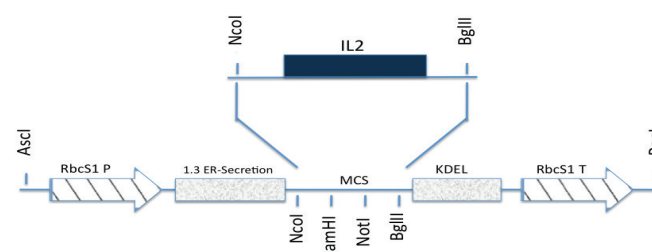
Trong khuôn khổ bài viết này, chúng tôi trình bày việc đánh giá sự biểu hiện của *rhIL-2* trong cây ngô

chuyển gen ở thể hệ T3 và việc sản xuất *rhIL-2* trong ER ở các cơ quan sinh dưỡng của cây ngô. Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm kỹ thuật gen, được phẩm sinh học và nguyên liệu sinh học, Khoa Khoa học cây trồng thổ nhưỡng, Trường Đại học Michigan, Mỹ.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Cấu trúc vector

Vector chuyển gen thực vật (hình 1) chứa gen *rhIL-2* được điều khiển bởi promoter đặc hiệu màu xanh rubisco-peptide vận chuyển trong ER; chuỗi kết thúc NOS và đoạn đánh dấu 6-histodin [8].



Hình 1: cấu trúc vector biểu hiện *IL-2* của người được sử dụng trong thí nghiệm chuyển gen vào ngô. RbcS1 P: ribulose biphosphate carboxylase promoter; 1.3 ER secretion: peptide tín hiệu giúp gen đích *rhIL-2* định hướng trong ER; MCS: vùng đa nối; KDEL: chuỗi amino axit; RbcS1 T: ribulose biphosphate carboxylase terminator

Plasmid thứ 2, pBY520 mang gen chịu hạn *HVA1* được điều khiển bởi promoter actin từ lúa và Nos terminator cũng được sử dụng đồng chuyển (co-transformation) vào cây ngô sử dụng súng bắn gen.

Vật liệu ngô chuyển gen là nguồn Hi II (A188xB73) được cung cấp bởi Phòng Chuyển gen thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Iowa, bang Iowa, Mỹ.

Quy trình tái sinh và chuyển gen

Ngô nguồn Hi II được trồng trong nhà kính tới giai đoạn trưởng thành, phơi non chưa trưởng thành khoảng 2 tuần sau thụ phấn được thu hoạch, tách và nuôi cây trong môi trường MS chứa vitamin, sucrose và myo-inositol [12]. Chuyển cấu trúc vector chứa gen *rhIL-2* vào các mô sẹo có kích thước 2-3 mm bằng phương pháp bắn gen với áp suất 25-26 PSI theo quy trình cải tiến của Nguyen Thang và Mariam Sticklen (2013) [13], sử dụng dung dịch gồm 150 µl M10 Tungsten, 150 µl canxi chloride và 60 µl spermidine. Sau 2 tuần chuyển gen, các mô sẹo được chuyển sang môi trường chọn lọc trong điều kiện tối, sau đó là môi trường tái sinh tạo chồi MS và vitamin, bổ sung acid indole butyric (IBA) [13]. Các thể hệ dòng ngô chuyển

gen *rhIL-2* tạo ra bằng phương pháp tự thụ và được trồng trong nhà kính ở nhiệt độ 25°C với quang chu kỳ là 16 h chiếu sáng/8 h tối.

Xác định sự có mặt và biểu hiện của gen đích

Phản ứng PCR: tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB. Sử dụng môi IL-2OPT_F1 và IL-2OPT_R1 để xác định sự có mặt của gen đích *rhIL-2* ở dòng ngô thể hệ T3. Trình tự của đoạn môi này là: CATGGCCACACCCACTTCAA (mũi xuôi) và GGCGGTCTCAGTCAGCGTATT (mũi ngược). Các mũi này sẽ nhận đoạn ADN có kích thước 343 bp của gen *rhIL-2*. Sử dụng chu kỳ nhiệt PCR như sau: 94°C trong vòng 3 phút (1 chu kỳ); và sau đó 94°C trong vòng 30 giây, 62°C trong vòng 30 giây, 72°C trong vòng 45 giây (35 chu kỳ); 72°C trong vòng 5 phút (1 chu kỳ) và 4°C cho tới kết thúc. Sử dụng plasmid mang đoạn gen *rhIL-2* làm đối chứng dương cho các thí nghiệm này.

Phản ứng PCR phiên mã ngược (RT-PCR): sử dụng bộ Kit RNeasy để tách chiết ARN từ mẫu lá ngô. Sử dụng SuperScript® III Reverse Transcriptase để tổng hợp cADN bậc 1. Actin mRNA dùng làm đối chứng chuẩn hóa lượng cADN. Các mũi đặc hiệu được thiết kế dựa trên mRNA của gen *rhIL-2* CATGGCGGCACCCACTTCAA làm mũi xuôi và GGCGGTCTCAGTCAGCGTATT làm mũi ngược; mũi xuôi CTGGATTCTGGAGACGGTGT và mũi ngược GCCATACAGGTCCTTCCTGA sử dụng cho phản ứng RT-PCR và được thiết kế dựa trên cấu trúc mRNA của gen actin. Chu kỳ phản ứng gồm: 94°C trong vòng 3 phút (1 chu kỳ); sau đó 94°C trong vòng 30 giây, 62°C trong vòng 30 giây, 72°C trong vòng 45 giây (35 chu kỳ); 72°C trong vòng 5 phút (1 chu kỳ) và 4°C cho tới kết thúc. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, cADN của gen actin sử dụng làm đối chứng chuẩn.

Western blotting

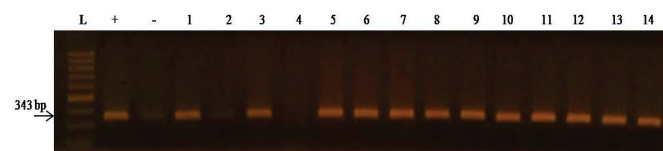
Tách chiết protein: các mẫu lá tươi của các dòng ngô được chuyển gen *rhIL-2* được thu và nghiền trong dung dịch đệm phosphate chứa 100 mM muối natri phosphate pH 5,8, 1 mM EDTA, 10 mM diethyldithio carbamic acid và 0,5% Tween 20. Hỗn hợp ức chế enzyme 2X (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) được bổ sung vào dung dịch đệm để ngăn cản hoạt động của enzyme proteases phân giải *rhIL-2* trong quá trình tách chiết protein.

Tất cả các công đoạn tách chiết và tinh chế protein được thực hiện trong điều kiện đá lạnh. Các mẫu protein

sau đó sẽ được ủ ở 80°C trong vòng 10 phút trước khi tiến hành phân tích Western blotting. Western blotting được thực hiện theo phương pháp chuẩn sử dụng kháng thể đơn dòng đối với gen *rhIL-2* [8]. Bản gel được điện di ở điều kiện 30 V trong 1 h. Màng lai được ủ trong 20 ml dung dịch chứa 1X PBS 0,1% Tween 20 và 5% sữa khô không béo trong 45 phút. Màng lai sau đó được lắc nhẹ trong dung dịch kháng thể sơ cấp (20 ml 1X PBS với 0,2 µg/ml IgG (R&D AF-202-NA) và dung dịch thứ cấp (R&D HAF-109) trong vòng 1,5 h mỗi lần). Màng lai được rửa với dung dịch đệm trước khi hiện phim và chụp ảnh sử dụng Premier Autoradiography Film, E3018, Denville Scientific Inc, Metuchen, NJ theo quy trình của nhà sản xuất.

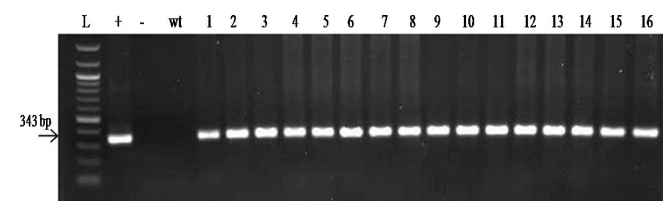
Kết quả và thảo luận

Các phân tích PCR, RT-PCR và Western blot tuy đã được thực hiện nhằm xác định sự có mặt của gen, quá trình sao mã và dịch mã của gen *rhIL-2* trong mô lá của cây ngô chuyển gen qua các thể hệ T2 và T3. Kích thước băng ADN chuẩn của gen *rhIL-2* là 343 bp (hình 2 và 3) và kích thước protein là 15 kDa (hình 6).



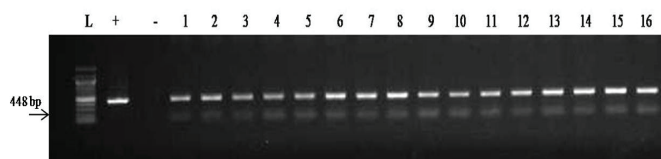
Hình 2: sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt gen *IL-2* của các cây chuyển gen thể hệ T2 trên gel agarose 1%; L: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương (plasmid chứa gen *rhIL-2*); -: đối chứng âm (H_2O); 1-14: các cây chuyển gen *IL-2* thể hệ T2

Kết quả phân tích PCR (hình 2) cho thấy, hầu hết các mẫu ADN tách chiết từ các cây chuyển gen *rhIL-2* ở thể hệ T2 đều dương tính với PCR và thể hiện kích thước band mong muốn 343 bp tương đương với kích thước đối chứng dương. Hai trong số 14 mẫu không xuất hiện band (mẫu 2 và 4) thể hiện các cây này không chứa gen chuyển *rhIL-2*, nguyên nhân có thể do các cây ở dòng ngô thể hệ T2 đang có sự phân ly và các gen chưa có tính ổn định cao về mặt di truyền.



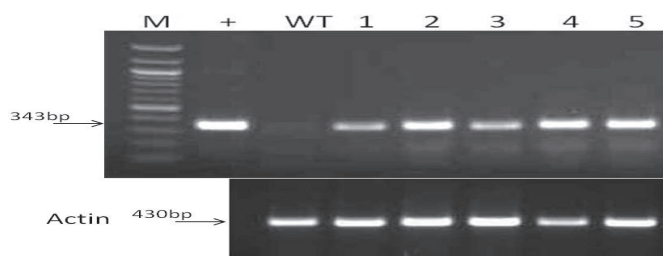
Hình 3: sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt gen *IL-2* của các cây chuyển gen thể hệ T3 trên gel agarose 1%; L: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương (plasmid chứa gen *rhIL-2*); -: đối chứng âm (H_2O); WT: cây không chuyển gen; 1-16: các cây chuyển gen *IL-2* thể hệ T3

Ở thể hệ T3, tất cả các cây thí nghiệm đều mang gen chuyển *rhIL-2* thông qua phân tích PCR. Các mẫu đều thể hiện kích thước band mong muốn là 343 bp, trong khi đối chứng âm là nước và cây wildtype (cây không chuyển gen) đều không xuất hiện band (hình 3). Kết quả cho thấy tính ổn định của gen chuyển trong các cây ở nguồn dòng ngô thể hệ T3.



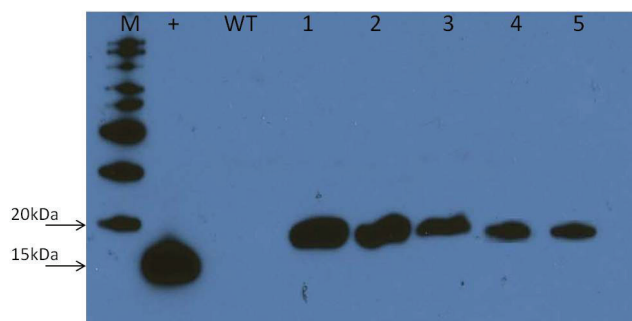
Hình 4: sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt gen đồng chuyển *HVA1* ở các cây chuyển gen thể hệ T3 trên gel agarose 1%; L: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương (plasmid pBY520 chứa gen *HVA1*); -: đối chứng âm (H_2O); 1-16: các cây chuyển gen thể hệ T3

Đồng thời với việc đánh giá sự có mặt của gen *rhIL-2*, chúng tôi cũng tiến hành đánh giá sự có mặt của gen đồng chuyển *HVA1* thông qua phân tích PCR. Kết quả cho thấy, sau 4 đời chọn lọc đã xác định được các dòng mang cả 2 gen chuyển, gen *rhIL-2* và gen đồng chuyển *HVA1* (hình 4). Các phân tích phân tử sâu hơn cũng đã khẳng định sự có mặt và sự biểu hiện của gen chuyển *HVA1* trong cây ngô. Hơn thế nữa, các thí nghiệm gây hạn nhân tạo cũng đã chỉ ra khả năng chịu hạn của các dòng ngô mang gen *HVA1* ở thể hệ T3 [13].



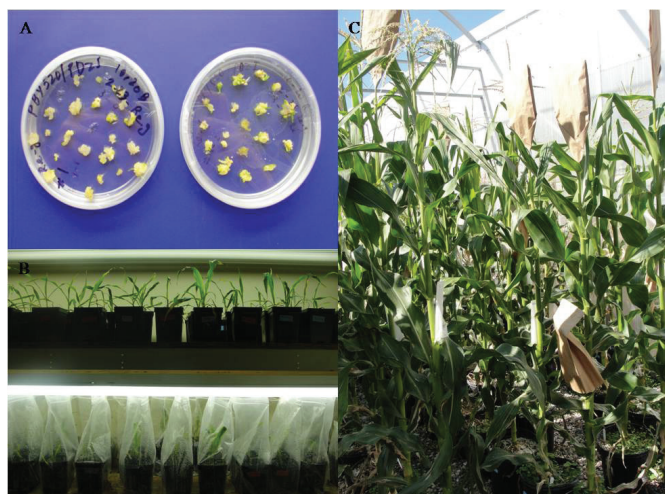
Hình 5: kết quả phân tích RT-PCR của gen *rhIL-2* thể hệ T3 trên gel agarose 1%; kích thước băng mong muốn đối với gen *rhIL-2* là 343 bp và sự biểu hiện của gen actin ngô là 430 bp; M: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương (plasmid chứa gen *rhIL-2*); WT: cây không chuyển gen; 1-5: các cây chuyển gen *IL-2* thể hệ T3

Qua kết quả phân tích RT-PCR cho thấy, mức độ biểu hiện gen ở 5 cây chuyển (1-5) thể hệ T3 là tương đương nhau và đều thể hiện kích thước băng là 343 bp, tương đương với kích thước băng đối chứng plasmid. Khi sử dụng cặp mồi actin của ngô làm đối chứng trong phản ứng RT-PCR cho thấy, sự có mặt của gen actin ngô với kích thước băng là 430 bp kể cả mẫu đối chứng âm là cây không chuyển gen (WT). Điều này khẳng định tính chính xác trong phản ứng RT-PCR và sự không biểu hiện của gen *rhIL-2* trong cây không chuyển gen (hình 5).



Hình 6: kết quả phân tích Western blot tuy chỉ ra sự dịch mã của gen *rhIL-2* trong cây ngô chuyển gen; M: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương; WT: cây không chuyển gen; 1-5: các cây chuyển gen *IL-2* thể hệ T3

Thông qua phân tích Western blot, tuy đã xác định được sản phẩm protein của gen *rhIL-2* thể hiện ổn định với kích thước band đơn khoảng 18,3 kDa ở cả 5 mẫu cây chuyển gen thể hệ T3. Kích thước này lớn hơn so với kích thước đối chứng dương là protein chuẩn, nguyên nhân là do cấu trúc plasmid chứa gen *rhIL-2* có gắn thêm đoạn đuôi và các trình tự khác như C-myc, 6X HIS tag hay chuỗi trình tự KDEL nhằm mục đích tích tụ sự biểu hiện gen trong ER và dễ dàng trong quá trình phân tích protein. Kết quả này cũng trùng với kết quả của Matakas và cs (2013) [8] khi sử dụng vector 1.3 chứa gen *rhIL-2* chuyển vào cây thuốc lá và cho rằng hệ thống vector này có thể được lựa chọn cho những nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính sinh học tiếp theo.



Hình 7: một số hình ảnh chuyển gen *rhIL-2* vào cây ngô; A: callus mang gen trong môi trường tái sinh; B: cây con được ra ngô và luyện trong phòng sinh trưởng; C: cây chuyển gen thể hệ T3 được chọn tạo trong điều kiện nhà kính

Kết luận

Kết quả ban đầu của nghiên cứu đã chuyển thành công gen *rhIL-2* và xác định được sự có mặt và biểu hiện của gen chuyển trong cây ngô thông qua các phân

tích phân tử như PCR, RT-PCR hay Western blot. Nghiên cứu cần thực hiện thêm những đánh giá về các thí nghiệm lâm sàng từ sản phẩm *rhIL-2*. Tuy nhiên, nghiên cứu này được xem là tiền đề cho hướng nghiên cứu tiếp theo trong việc sản xuất protein tái tổ hợp từ sinh khối cây ngô hay sử dụng ngô thực phẩm (nếp, đường) chuyển gen *rhIL-2* như thực phẩm chức năng trong điều trị bệnh ung thư.

Tài liệu tham khảo

- [1] Phillips Theresa (2008), “Genetically Modified Organisms (GMOs): Transgenic Crops and Recombinant DNA Technology”, *Nature Education*, **1**(1), p.213.
- [2] Q. Kong, L. Richter, Y.F. Yang, C.J. Arntzen, H.S. Mason, Y. Thanavala (2001), “Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants”, *Proc. Natl. Acad. Sci*, **98**, pp.11539-11544.
- [3] T.G. Kim, D.R. Galloway, W.H. Langridge (2004), “Synthesis and assembly of anthrax lethal factor-cholera toxin B-subunit fusion protein in transgenic potato”, *Mol. Biotechnol*, **28**, pp.175-183.
- [4] H. Daniell, S.B. Lee, T. Panchal, P.O. Wiebe (2001), “Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts”, *J. Mol. Biol*, **311**, pp.1001-1009.
- [5] M.A. Aziz, S. Singh, P.A. Kumar, R. Bhatnagar (2002), “Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **299**, pp.345-351.
- [6] A.V. Karasev, S. Foulke, C. Wellens, A. Rich, K.J. Shon, I. Zwierzynski, D. Hone, H. Koprowski, M. Reitz (2005), “Plant based HIV-1 vaccine candidate: tat protein produced in spinach”, *Vaccine*, **23**, pp.1875-1880.
- [7] Zhong Heng, Farzaneh Teymouri, Brad Chapman, Shahina Maqbool, Robab Sabzikar, Yahia El-Maghraby, Bruce Dale, Mariam Sticklen (2003), “The dicot pea (*Pisum sativum* L.) rbcS transit peptide directs the *Alcaligenes eutrophus* polyhydroxybutyrate enzymes into the monocot maize (*Zea mays* L.) chloroplasts”, *Plant Science*, **165**, pp.455-462.
- [8] Matakas Jason, Venkatesh Balan, William F. Carson, Dahai Gao, Federica Brandizzi, Steven Kunkel, Mariam Sticklen (2013), “Plant-produced recombinant human interleukin-2 and its activity against splenic CD4+T-cells”, *Intl. J. Life Sci. Biotechnol. & Pharma Res*, **2**(2), pp.192-203.
- [9] A. Vitale, J. Denecke (1999), “The endoplasmic reticulum: gateway of the secretory pathway”, *Plant Cell*, **11**, pp.615-628.
- [10] Mei Chuansheng, SangHyuck Park, Robab Sabzikar, Qi, Callista Ransom, Mariam Sticklen (2008), “Green Tissue-Specific Production of a Microbial Endo-Cellulase in Maize (*Zea mays* L.) Endoplasmic-Reticulum and Mitochondria Converts Cellulose into Fermentable Sugars”, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **10**, pp.75-83.
- [11] B. Kleizen, I. Braakman (2004), “Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. Curr. Opin”, *Cell Biol*, **16**, pp.343-349.
- [12] T. Murashige, F. Skoog (1962), “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”, *Physiologia Plantarum*, **15**, pp.473-497.
- [13] Nguyen Thang, Mariam Sticklen (2013), “Barley HVA1 Gene Confers Drought and Salt Tolerance in Transgenic Maize (*Zea Mays* L.)”, *Adv. Crop Sci. & Technol*, **1**(1), 8 pages (online), <http://dx.doi.org/10.4172/acst.1000105>.

Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch dịch thể của thỏ với chủng porcine circovirus type 2 (PCV2) phân lập tại Việt Nam

Huỳnh Thị Mỹ Lệ*, Nguyễn Văn Giáp, Lê Văn Phan,
Cao Thị Bích Phượng, Trịnh Đình Thâu

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 12/1/2016, ngày chuyển phản biện 18/1/2016, ngày nhận phản biện 10/3/2016, ngày chấp nhận đăng 8/5/2016

Nghiên cứu này thực hiện trên động vật thí nghiệm nhằm kiểm tra tính kháng nguyên của một số chủng Porcine circovirus type 2 (PCV2) phân lập từ lợn tại Việt Nam được lựa chọn làm giống gốc để sản xuất vaccin. Kết quả cho thấy, 3 chủng virus lựa chọn số 03, 04 và 07 (có hiệu giá virus $\geq 10^5$ TCID₅₀/0,1 ml) đã kích thích sản sinh đáp ứng miễn dịch ở thỏ thí nghiệm. Kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 được hình thành trong vòng 14 ngày kể từ sau khi tiêm kháng nguyên, với độ dài miễn dịch tối thiểu là 56 ngày. Thỏ được gây miễn dịch bằng chủng PCV2 ở các lần tiếp đời khác nhau không dẫn đến khác biệt về quy luật hình thành kháng thể cũng như khả năng trung hòa virus.

Từ khóa: *đáp ứng miễn dịch, Porcine circovirus type 2, thỏ.*

Chỉ số phân loại 4.6

Studying the humoral immune responses of rabbit to porcine circovirus type 2 (PCV2) isolated from pigs of Vietnam

Summary

This study aimed to evaluate the immunogenicity of several isolates of porcine circovirus type 2 (PCV2) from pigs of Vietnam which are candidates for master seed selection. The experiments were done with 3 isolates having titer $\geq 10^5$ TCID₅₀/0.1 ml (namely isolate number 03, 04, and 07). All of immunized rabbits were able to produce specific antibodies against PCV2 which appeared around 14 days of post-immunization, and prolonged at least 56 days. Rabbits immunized by PCV2 of different passaging levels elicited humoral immune responses in similar manner as well as the viral neutralizing properties.

Keywords: *immune response, porcine circovirus type 2, rabbit.*

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Ngành chăn nuôi lợn trên thế giới và ở Việt Nam đang phải đối mặt với tình hình dịch bệnh diễn biến rất phức tạp. Có nhiều bệnh mới nổi gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng, trong đó phải kể đến hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS), bệnh đường hô hấp phức hợp ở lợn (porcine respiratory disease complex - PRDC), bệnh do porcine circovirus type 2 (PCV2) gây ra (Porcine circovirus associated disease - PCVAD)... Để chủ động trong công tác phòng chống bệnh truyền nhiễm, bên cạnh công tác vệ sinh phòng bệnh thì việc sử dụng vaccin tạo miễn dịch chủ động là rất cần thiết. Với cơ chế sinh bệnh của virus PRRS và PCV2 thường gây suy giảm miễn dịch, tạo điều kiện để các mầm bệnh kế phát gây bệnh nên sử dụng vaccin phòng các bệnh này cho đàn lợn đang được các bác sĩ thú y và chủ trang trại quan tâm. Tại Việt Nam, trước tình hình dịch bệnh diễn biến rất phức tạp như hiện nay, nhu cầu sử dụng vaccin nhằm tạo miễn dịch chủ động đặc hiệu để phòng bệnh đang là vấn đề thời sự, trong đó phải kể đến vaccin phòng bệnh do PCV2 gây ra.

Vaccin phòng bệnh do PCV2 ở Việt Nam đều là vaccin ngoại nhập, hiện chưa có một cơ sở trong nước nào sản xuất được. Vì vậy, việc nghiên cứu để sản xuất vaccin phòng bệnh do PCV2 là thực sự cần thiết, đặc biệt

*Tác giả liên hệ: huynhmtle@yahoo.com

là những nghiên cứu sử dụng các chủng virus phân lập được từ đàn lợn tại Việt Nam. Nhằm đáp ứng đòi hỏi của thực tiễn sản xuất, nhóm nghiên cứu đề tài cấp nhà nước mã số KC04.22/11-15 đã tiến hành lựa chọn chủng virus PCV2 đảm bảo đủ tiêu chuẩn làm giống gốc để chế vaccin phòng bệnh. Một trong những tiêu chí để đánh giá chất lượng của chủng virus làm giống gốc là phải có tính kháng nguyên. Trước khi tiến hành thử nghiệm trên bản động vật, chúng tôi đã thử nghiệm để kiểm tra tính kháng nguyên của virus trên động vật thí nghiệm. Trong khuôn khổ của bài báo này, chúng tôi cung cấp thông tin về kết quả xác định tính kháng nguyên của chủng virus PCV2 được lựa chọn làm giống gốc để sản xuất vaccin dựa trên kết quả nghiên cứu khả năng đáp ứng miễn dịch của thỏ sau khi tiêm thử nghiệm với virus PCV2.

Nội dung nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu này nhằm kiểm tra tính kháng nguyên của một số chủng PCV2 được lựa chọn làm giống gốc để sản xuất vaccin thông qua đánh giá đáp ứng miễn dịch dịch thể và khả năng trung hòa virus.

Nguyên liệu

- Thỏ trắng New Zealand, cân nặng 2,2-2,5 kg/con, khỏe mạnh, không có kháng thể kháng PCV2 và âm tính với PCV2.

- 3 chủng PCV2 thuần khiết: chủng số 03 (đời 18, đời 25), 04 (đời 20, đời 26) và 07 (đời 16, đời 20) được cô đặc bằng siêu ly tâm và vô hoạt bằng binary ethyleneimine ở nồng độ 0,2% trong vòng 24 giờ ở 37°C. Virus sau vô hoạt được điều chỉnh ở nồng độ protein 0,5 mg/ml, nhũ hóa bằng Freund's Adjuvant (complete) theo tỷ lệ 1: 1. Kháng nguyên sau gây nhũ được bảo quản ở 4°C và được cân bằng ở nhiệt độ phòng khi tiêm cho thỏ.

- Huyết thanh của thỏ (i) được gây miễn dịch bởi các đời PCV2 khác nhau và (ii) ở các ngày khác nhau sau gây miễn dịch.

- Bộ kit ELISA: SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking (Synbiotics, Mỹ).

- Bộ kit IFA đặc hiệu cho PCV2: VDPPro® PCV2 FA Reagent (Median Diagnostics, Hàn Quốc).

- Tế bào dòng PK15 và môi trường nuôi cấy tế bào

DMEM bổ sung 5% FBS.

Phương pháp

Phương pháp gây miễn dịch cho thỏ:

Trước khi gây miễn dịch, toàn bộ thỏ được đánh số tai, nuôi thích nghi và theo dõi thân nhiệt trong vòng 7 ngày. Thỏ thí nghiệm được gây miễn dịch bằng 2 ml kháng nguyên (đã nhũ hóa) theo hai đường đưa kháng nguyên: tiêm nội bì (1 ml/100 vị trí tiêm) và tiêm dưới da (1 ml/6 vị trí tiêm). Thỏ sau gây miễn dịch được theo dõi thân nhiệt hàng ngày (vào thời điểm cố định) và những bất thường khác.

Thỏ thí nghiệm được lấy máu xét nghiệm tại thời điểm gây miễn dịch (D0), và cứ 7 ngày/lần (D7, D14, D21, D28, D35, D42, D49, D56...). Mẫu huyết thanh được để đông tự nhiên, ly tâm thu huyết thanh và bảo quản ở -20°C.

Phương pháp blocking ELISA phát hiện kháng thể kháng PCV2:

Các bước thực hiện phản ứng blocking ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 trong mẫu huyết thanh của thỏ gồm: 1) Pha loãng huyết thanh: huyết thanh chuẩn đoán được pha loãng 1/100 trong dung dịch pha loãng mẫu; 2) Ủ mẫu: ủ đĩa ở 37°C/60 phút (± 5 phút), tránh ánh sáng, rửa 4 lần, 200 μ l/lần bằng dung dịch rửa; 3) Cho kháng thể đặc hiệu gắn enzyme; 4) Cho cơ chất/chất màu (Buffered peroxidase substrate): cho 100 μ l cơ chất/chất màu vào mỗi giếng của đĩa ELISA, để ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng trong vòng 20 phút; 5) Dừng phản ứng: thêm 50 μ l dung dịch H_2SO_4 2N để dừng phản ứng; 6) Đo giá trị OD, tính toán kết quả: giá trị OD đo ở bước sóng 450 nm. Phản ứng được đánh giá hợp lệ nếu giá trị OD trung bình của đối chứng âm > 0,800, và giá trị OD trung bình của đối chứng dương < 0,600.

Tính giá trị S/N (OD giữa mẫu và đối chứng âm). Các bước tính toán được thực hiện trên bảng tính Excel cung cấp bởi nhà sản xuất. Nếu $S/N \leq 0,4$, mẫu được coi dương tính huyết thanh học. Ngược lại, nếu $S/N > 0,4$, mẫu được coi âm tính huyết thanh học.

Phương pháp xác định sự có mặt của kháng thể trung hòa:

Phương pháp trung hòa virus được thực hiện theo [1], với các bước thực hiện được tóm tắt như sau:

Bước 1: chuẩn bị huyết thanh: huyết thanh thô được diệt bỏ thể ở 56°C/30 phút, và pha loãng trong môi trường DMEM ở độ pha loãng 1/4 (25% huyết thanh).

Bước 2: chuẩn bị huyền dịch virus: virus PCV2 có chuẩn độ 10^4 TCID₅₀/ml được pha loãng 100 lần trong môi trường DMEM (mức pha loãng cho phép đếm được số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu).

Bước 3: trung hòa virus: trộn 100 µl huyết thanh (25%) với 100 µl virus. Sau khi ủ 1 giờ ở 37°C, chuyển 100 µl huyền dịch huyết thanh: virus vào mỗi giếng tế bào của đĩa 96 giếng, tiếp tục ủ ở 37°C/5% CO₂ trong 1 giờ. Loại bỏ hoàn toàn huyền dịch huyết thanh: virus và rửa các giếng bằng 200 µl PBS 1X. Bổ sung môi trường duy trì (DMEM 5% FBS). Sau 36 giờ duy trì, thực hiện phản ứng IFA để đánh giá sự nhân lên của PCV2 bằng cách đếm số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu. So sánh số lượng tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu giữa mẫu huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch với đối chứng virus. Nếu có sự giảm về số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu, chứng tỏ có mặt của kháng thể trung hòa trong mẫu huyết thanh xét nghiệm.

Phương pháp miễn dịch huỳnh quang phát hiện PCV2 trên thăm tế bào:

Các bước thực hiện phản ứng IFA xác định sự nhân lên của PCV2 được thực hiện như sau: 1) Cố định tế bào sau gây nhiễm: loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy trong giếng. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS 1X, 200 µl/giếng/lần. Để khô đĩa tự nhiên trong tủ an toàn sinh học. Thêm 200 µl cồn tuyệt đối/giếng và cố định ở -20°C trong vòng 2 giờ. Loại bỏ hoàn toàn cồn. 2) Hydrat hóa tế bào: nhỏ 200 µl PBS 1X ngập thăm tế bào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. 3) Ủ kháng thể đặc hiệu: nhỏ 100 µl kháng thể đơn dòng kháng PCV2 (1X anti-PCV2 mAb). Ủ ở 37°C/60 phút. Loại bỏ kháng thể thừa bằng cách rửa giếng bằng dung dịch rửa 200 µl/giếng/lần, lặp lại 2 lần. 4) Ủ kháng thể gắn FITC: nhỏ ngập thăm tế bào kháng thể gắn huỳnh quang (1X FITC anti-mouse conjugate) và ủ 37°C/60 phút. Loại bỏ kháng thể thừa, thấm khô rồi nhỏ 100 µl mounting buffer/giếng. 5) Đọc kết quả: quan sát tế bào bằng vật kính thông thường để nhìn thấy rõ ảnh tế bào, sau đó chuyển sang chế độ UV để quan sát tín hiệu huỳnh quang.

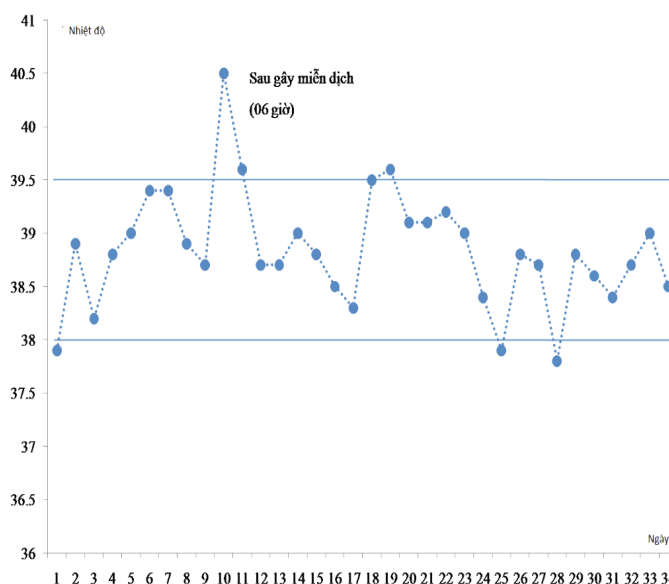
Phương pháp xử lý số liệu:

Phân tích sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm bằng phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA một nhân tố), thực hiện trên phần mềm MS Excel 2007.

Kết quả và thảo luận

Kết quả theo dõi tình trạng của thỏ sau gây miễn dịch

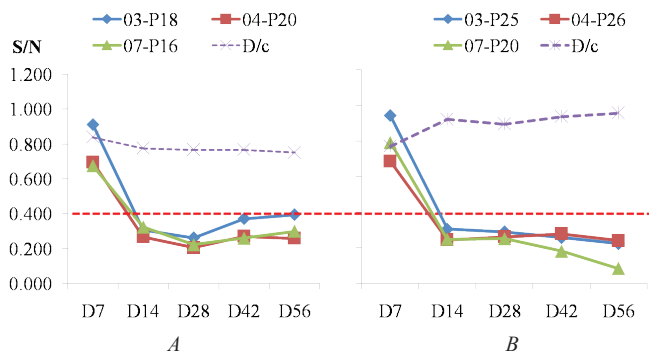
Toàn bộ thỏ trước khi gây miễn dịch được sàng lọc bằng phản ứng PCR và blocking ELISA để lựa chọn cá thể âm tính với PCV2 và không có kháng thể kháng PCV2. Theo dõi thân nhiệt của 8 thỏ thí nghiệm trong vòng 30 ngày sau khi gây miễn dịch, chúng tôi thấy nhiệt độ của thỏ dao động trong khoảng 37,8°C đến 40,5°C (hình 1). Theo [2], thân nhiệt bình thường của thỏ dao động từ 38,5 đến 39,5°C thì thỏ thí nghiệm có hiện tượng tăng thân nhiệt (39,3÷40,5°C) sau khi tiêm kháng nguyên khoảng 6 giờ; tuy nhiên thân nhiệt trở lại bình thường vào các ngày tiếp theo. Trong quá trình theo dõi thỏ thí nghiệm, chúng tôi không quan sát thấy những bất thường ở cục bộ vị trí tiêm cũng như hiện tượng thỏ ủ rũ, bỏ ăn...



Hình 1: thân nhiệt của thỏ trước và sau khi gây miễn dịch

Kết quả đánh giá đáp ứng miễn dịch của thỏ bằng phản ứng ELISA

Nhóm nghiên cứu đã thực hiện phản ứng blocking ELISA với các mẫu huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2 (chủng virus số 03 đời 18, số 04 đời 20 và số 07 đời 16) ở các ngày D7 đến D56. Kết quả nghiên cứu biến động hiệu giá kháng thể đặc hiệu kháng PCV2 được trình bày ở hình 2.



Hình 2: biến động hiệu giá kháng thể của thỏ sau gây miễn dịch với các chủng PCV2

Kết quả trình bày ở hình 2A biểu diễn giá trị S/N của mỗi mẫu huyết thanh, với giá trị ngưỡng dương tính/âm tính là 0,4. Kết quả cho thấy, tại thời điểm 7 ngày sau khi gây miễn dịch (D7) các mẫu xét nghiệm đều âm tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2. Ở mẫu đối chứng (không tiêm kháng nguyên PCV2), tại tất cả các thời điểm xét nghiệm (từ D7 đến D56) đều cho kết quả âm tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2.

Tại thời điểm D14, toàn bộ các mẫu xét nghiệm (được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2) đều dương tính huyết thanh học (giá trị S/N < 0,4). Như vậy, 3 chủng PCV2 dùng trong nghiên cứu này đều có tính sinh miễn dịch và hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học diễn ra trong thời gian từ 7 đến 14 ngày kể từ thời điểm tiêm kháng nguyên. Về độ dài miễn dịch, sau thời điểm tiêm 56 ngày, toàn bộ thỏ thí nghiệm vẫn dương tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2.

Kết quả phân tích biến động hàm lượng kháng thể kháng PCV2 của thỏ được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2 ở các lần tiếp đời cao (chủng virus số 03 đời 25, số 04 đời 26 và số 07 đời 20) được trình bày ở hình 2B.

Kết quả trình bày ở hình 2B cho thấy, đối với thỏ đối chứng (không gây miễn dịch), tại mọi thời điểm xét nghiệm (D7 đến D56) đều âm tính huyết thanh học với kháng thể kháng PCV2. Trong khi đó, các thỏ được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2 ở các lần tiếp đời cao (so với kết quả trình bày ở hình 2A), đều có khả năng kích thích sản sinh đáp ứng miễn dịch dịch thể đặc hiệu. Hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học xảy ra trong khoảng 7 đến 14 ngày sau khi gây miễn dịch. Các thỏ được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2

có cũng có độ dài miễn dịch ít nhất đến 56 ngày sau tiêm kháng nguyên.

Trong tự nhiên, thỏ được xác định là loài không miễn cảm với Porcine circovirus [3]. Kết quả phơi nhiễm PCV2 cho thỏ qua đường hô hấp đều không phát hiện thấy sự nhân lên của virus và hiện tượng chuyển dương tính huyết thanh học [4]. Trong điều kiện thí nghiệm, thỏ chủ yếu được gây tối miễn dịch nhằm mục đích tạo kháng thể đa dòng dùng trong chẩn đoán PCV2 [5]. Do vậy, có rất ít các công bố liên quan tới đáp ứng miễn dịch dịch thể của thỏ kháng lại PCV2. Trong thí nghiệm này, khi so sánh giá trị S/N của mỗi chủng PCV2, ở các đời khác nhau (hình 2A và 2B), chúng tôi nhận thấy có sự sai khác về giá trị tuyệt đối. Tuy nhiên, kết quả kiểm định bằng phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA một nhân tố) đều có giá trị F thực nghiệm lớn hơn F lý thuyết. Nói cách khác, sự sai khác về giá trị tuyệt đối S/N là không có ý nghĩa thống kê. Cụ thể, giữa chủng 03 đời 18 và đời 25 có F thực nghiệm = 0,065 < F lý thuyết = 5,318; giữa chủng 04 đời 20 và đời 26 có F thực nghiệm = 0,000 < F lý thuyết = 5,318; giữa chủng 07 đời 16 và đời 20 có F thực nghiệm = 0,094 < F lý thuyết = 5,317. Với các kết quả trình bày ở trên, nhóm nghiên cứu thấy rằng, cả chủng PCV2 số 03, 04 và 07 đều có khả năng kích thích sản sinh đáp ứng miễn dịch đặc hiệu trên thỏ. Cùng một chủng virus, khi gây miễn dịch cho thỏ ở các đời khác nhau, không phát hiện thấy có khác biệt về quy luật hình thành kháng thể.

Kết quả đánh giá đáp ứng miễn dịch của thỏ bằng phản ứng trung hòa

Kết quả nghiên cứu đáp ứng miễn dịch của thỏ với các chủng PCV2 bằng phương pháp blocking ELISA cho thấy, dương tính huyết thanh học xuất hiện sau gây miễn dịch khoảng 14 ngày và kéo dài ít nhất tới ngày 56 (thời điểm dừng thí nghiệm). Kết quả cũng cho thấy, hàm lượng kháng thể ở các ngày D28 đến D56 có sự biến đổi ít. Do vậy, nghiên cứu lựa chọn huyết thanh thỏ ở ngày D28 để thực hiện phản ứng trung hòa virus. Mỗi mẫu huyết thanh: virus được gây nhiễm vào 4 giếng tế bào. Chúng tôi đánh giá khả năng trung hòa virus thông qua việc xác định số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (nếu kháng thể đặc hiệu không trung hòa virus sẽ không làm giảm số lượng tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu). Kết quả của phản ứng trung hòa được trình bày ở bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1: kết quả trung hòa virus của mẫu huyết thanh thô gây miễn dịch với các chủng PCV2 (virus số 03 đời 18, số 04 đời 20 và số 07 đời 16)

Giếng	Huyết thanh thô gây miễn dịch			Virus
	Chủng số 03 đời 18	Chủng số 04 đời 20	Chủng số 07 đời 16	
A	2	0	1	50
B	6	3	1	96
C	6	1	4	80
D	6	8	5	68
Trung bình	5	3	2,75	73,5

Ghi chú: chữ số trong bảng là số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (nhiễm virus)

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, có sự khác nhau rất rõ rệt về số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (tế bào nhiễm virus) ở mẫu huyết thanh so với mẫu đối chứng virus. Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cho giá trị F thực nghiệm = 49,18 lớn hơn so với giá trị F lý thuyết = 3,49 ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Nói cách khác, sự sai khác về số tế bào nhiễm PCV2 là có ý nghĩa thống kê. Kết quả tính mức giảm số tế bào nhiễm virus cho thấy, huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch bằng chủng PCV2 số 03 (đời 18), chủng 04 (đời 20), chủng 07 (đời 16) làm giảm lần lượt 14,7 lần; 24,5 lần và 26,7 lần số tế bào nhiễm virus so với đối chứng. Như vậy, huyết thanh thỏ được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2 trong nghiên cứu này đều có khả năng trung hòa virus.

Kết quả nghiên cứu sự có mặt của kháng thể trung hòa trong huyết thanh thỏ được gây miễn dịch bởi 3 chủng PCV2 ở các lần tiếp đời cao (≥ 20 đời) (chủng virus số 03 đời 25, số 04 đời 26 và số 07 đời 20) được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: kết quả trung hòa virus của mẫu huyết thanh thô gây miễn dịch với các chủng PCV2 (chủng virus số 03 đời 25, số 04 đời 26 và số 07 đời 20)

Giếng	Huyết thanh thô gây miễn dịch			Virus
	Chủng số 03 đời 25	Chủng số 04 đời 26	Chủng số 07 đời 20	
A	7	7	4	36
B	1	0	9	92
C	6	3	4	72
D	0	2	3	60
Trung bình	3,5	3	5	65

Ghi chú: chữ số trong bảng là số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (nhiễm virus)

Kết quả trình bày ở bảng 2 cũng cho thấy sự khác nhau về số tế bào có tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu (tế

bào nhiễm virus) ở mẫu huyết thanh so với mẫu đối chứng virus. Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cho giá trị F thực nghiệm = 25,99 lớn hơn so với giá trị F lý thuyết = 3,49, ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Như vậy, sự sai khác về số tế bào nhiễm PCV2 là có ý nghĩa thống kê. Kết quả tính mức giảm số tế bào nhiễm virus cho thấy, huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch bằng chủng PCV2 số 03 (đời 25), chủng 04 (đời 26), chủng 07 (đời 20) làm giảm lần lượt 18,6 lần; 21,67 lần và 13 lần số tế bào nhiễm virus so với đối chứng virus. Như vậy, huyết thanh thỏ được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2 dùng trong nghiên cứu này ở lần tiếp đời ≥ 20 đều có khả năng trung hòa PCV2.

So sánh kết quả trình bày ở bảng 1 và bảng 2, chúng tôi thấy có sự khác nhau về giá trị tuyệt đối của số tế bào nhiễm virus ở các mẫu huyết thanh thỏ được gây miễn dịch bởi cùng một virus ở các đời khác nhau. Tuy nhiên, kiểm định bằng phân tích phương sai một nhân tố cho thấy, giá trị F thực nghiệm = 0,52 nhỏ hơn giá trị F lý thuyết = 2,77 (ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$). Do vậy, sự sai khác này là không có ý nghĩa thống kê. Từ kết quả trình bày ở bảng 1 và bảng 2, chúng tôi kết luận rằng, cùng một chủng PCV2, ở các lần tiếp đời khác nhau đều có khả năng kích thích thỏ thí nghiệm sản sinh đáp ứng miễn dịch có khả năng trung hòa PCV2.

Kết luận

Từ các kết quả nêu trên, chúng tôi rút ra một số kết luận về đặc tính sinh miễn dịch của 3 chủng giống PCV2 được khảo sát trong nghiên cứu này như sau:

- Các chủng PCV2 dùng trong nghiên cứu này có khả năng kích thích sản sinh đáp ứng miễn dịch trong vòng 14 ngày kể từ sau khi tiêm vaccin, với độ dài miễn dịch tối thiểu là 56 ngày.

- Gây miễn dịch cho thỏ bằng chủng PCV2 số 03, 04 và 07 ở các lần tiếp đời khác nhau không gây ra khác biệt về quy luật hình thành kháng thể.

- Huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch bằng 3 chủng PCV2 phân lập được ở Việt Nam có khả năng trung hòa PCV2.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của Bộ KH&CN, Văn phòng Các chương trình KH&CN trọng điểm cấp nhà nước đã ủng hộ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] P. Meerts, Gerald Misinzo, David Lefebvre, Jens Nielsen, Anette Bøtner, Charlotte S. Kristensen and Hans J. Nauwynck (2006), “Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease”, *BMC Veterinary Research*, pp.2-6.
- [2] Nguyễn Xuân Tịnh, Tiết Hồng Ngân, Nguyễn Bá Mùi, Lê Mộng Loan (1996), *Sinh lý học gia súc*, Nxb Nông nghiệp, trang 227.
- [3] G.M. Allan, K.V. Phenix, D. Todd, M.S. McNulty (1994), “Some Biological and Physico-Chemical Properties of Porcine Circovirus”, *J. Vet. Med*, **B41**, pp.17-26.
- [4] J. Quintana, Munica Balasch, Joaquim Segales, Maria Calsamiglia, M. Gabriela, Rodriguez-Arrioja, Juan Plana-Duran, Mariano Domingo (2002), “Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice”, *Vet. Res*, **33**, pp.229-237.
- [5] S.D. Sorden, A. Perry Harms, Porntippa Nawagitgul, David Cavanaugh, Prem S. Paul (1999), “Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue”, *J. Vet Diagn Invest*, **11**, pp.528-530.

Bước đầu đánh giá mức độ phiên mã của một số gen liên quan tới đáp ứng miễn dịch của tôm đối với kháng nguyên VP28 của virus đốm trắng

Đỗ Thị Hồng Thu¹, Đỗ Thị Hoàng Kim^{1,2}, Nhữ Văn Hùng¹, Trần Thị Mỹ^{1,3}
Nguyễn Thị Vân Anh¹, Phạm Thị Thu Hường^{1*}

¹Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Y học, Đại học WonKwang, Hàn Quốc

³Công ty Cổ phần Nghiên cứu và Phát triển ANABIO

Ngày nhận bài 4/2/2016, ngày chuyển phản biện 17/2/2016, ngày nhận phản biện 14/3/2016, ngày chấp nhận đăng 17/3/2016

Tôm là loài động vật giáp xác có hệ miễn dịch tự nhiên với sự tham gia mạnh mẽ của các enzyme hệ thực bào để chống lại các tác nhân gây bệnh. Khả năng thực bào ở tôm đã được chứng minh có sự tham gia của gen *Rho* (Ras-like GTPase) và *Ran* (Ran binding protein) [1]. Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng kỹ thuật RT-PCR nhân bản đặc hiệu gen *Rho* và *Ran* nhằm đánh giá mức độ phiên mã của các gen này trong đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng đối với kháng nguyên VP28, một loại protein vỏ của virus đốm trắng (WSSV). Kết quả bước đầu cho thấy, tôm được ăn chế phẩm mang kháng nguyên VP28 của nhóm nghiên cứu về Enzyme và Protein thuộc Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, có mức độ biểu hiện mRNA của gen *Rho* tăng lên theo thời gian 7, 14 và 28 ngày lần lượt khoảng 1,7; 2,7 và xấp xỉ 3 lần. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả bảo hộ tôm chống lại WSSV với hiệu quả bảo hộ trên 75%. Trong khi đó, dường như không có thay đổi về mức độ biểu hiện mRNA gen *Ran* trước và sau khi tôm thẻ chân trắng ăn chế phẩm. Kết quả này hứa hẹn tiềm năng sử dụng gen *Rho* như một dấu ấn marker cho việc đánh giá hiệu quả tác động của chế phẩm probiotics lên hệ miễn dịch tôm bằng phản ứng RT-PCR.

Từ khóa: miễn dịch ở tôm, probiotic, *Ran*, *Rho*, VP28.

Chỉ số phân loại 4.6

Mở đầu

Như chúng ta đã biết, tôm là loài động vật giáp xác có cơ chế bảo vệ phụ thuộc chính vào hệ miễn dịch tự nhiên [2]. Hệ miễn dịch tự nhiên của tôm chủ yếu dựa trên các yếu tố thực bào và thể dịch mà không có các tế bào có khả năng ghi nhớ hay tự sản xuất kháng thể [3]. Trong khi đó, tôm lại thường xuyên bị tiếp xúc với nguồn bệnh trong môi trường nuôi nên rất dễ bị các loại virus hoặc vi khuẩn gây bệnh khiến tôm chết hàng loạt, gây thiệt hại lớn về kinh tế. Các nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung vào việc hỗ trợ hệ miễn dịch cho tôm bằng các loại chế phẩm probiotics làm tăng khả năng chống lại sự xâm nhập của các tác nhân gây bệnh mà chủ yếu là do virus gây ra. Nhiều nghiên cứu về hệ miễn dịch của tôm cho thấy, dạng miễn dịch tự nhiên là hàng rào bảo vệ đầu tiên chống lại các vi sinh vật gây bệnh xâm nhập, trong đó, thực bào là cơ chế cốt lõi giúp cơ thể tôm loại bỏ sự nhiễm của vi sinh vật và các tác nhân gây hại khác. Cơ chế này thông

qua các trình tự sau: tìm kiếm và bắt cặp tại chỗ với các chuỗi actin, cắt chuỗi actin, co myosin và cuối cùng là phá hủy các mầm bệnh với sự tham gia của các enzyme phân giải và các phức hệ oxy hóa [2]. Các tế bào máu ở họ tôm *Penaeid* nói chung có đặc tính sinh học và chức năng tương tự với các đại thực bào, bạch cầu hạt và tế bào giết tự nhiên của động vật có xương sống [3]. Những tế bào này thực hiện các quá trình thực bào, hình thành thể hạch, thể bao, melanin, hoạt hóa proPO và apoptosis. Chúng cũng tạo ra các yếu tố dính kết tế bào (agglutinin-lectin system), hệ thống đông máu (hemolymph coagulation system), hệ thống bổ thể (complement system) và peptide kháng khuẩn (AMP) [4-6].

Trong những nghiên cứu mới nhất về hệ miễn dịch và quá trình thực bào của tôm, người ta đã tìm thấy sự tham gia của họ protein G, điển hình là: *Rho*, *Ran*, *Rab* GTPases [1]. Việc gia tăng mức độ biểu hiện các gen này có thể gắn liền với hoạt động thực bào mạnh mẽ,

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

Evaluation on the transcription level of some genes related to the shrimp innate immune responses to the VP28 antigen of white spot syndrome virus

Summary

Shrimp is a crustacean species that just has an innate immune system against invading pathogens mainly using enzymes of the phagocytosis system. The phagocytosis process of shrimp is mainly performed by some components of G protein family including Ras-like GTPase (*Rho*) and Ran binding protein (*Ran*). In this study, the authors use RT-PCR technique to amplify a specific *Rho* and *Ran* genes, those are genetically related to the phagocytic mechanism of shrimp. Initial results show that shrimp fed with food contained VP28-antigen spores (CotB-VP28, a product of the Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science) indicates an increase in *Rho* mRNA expression level over time at 7, 14 and 28 days around 1.7, 2.7 and 3 folds, respectively. This is consistent with the protection efficiency against white spot syndrome virus (WSSV) which is over 75%. Whereas, there is no change in *Ran* mRNA expression level at the same experiment condition. This result is promising a potential of using *Rho* as a molecular marker for assessing the impacts of probiotics on the shrimp immune system by RT-PCR method.

Keywords: *probiotic, Ran binding protein (Ran), Ras-like GTPase (Rho), shrimp immune system, VP28.*

Classification number 4.6

thể hiện khả năng bảo vệ cơ thể được nâng cao. *Rho* được cho là có liên quan tới sự hình thành superoxide trong suốt quá trình thực bào [7]. *Rho* còn có vai trò trong quá trình opsonized hóa và bổ sung phân tử iC3b, là một trong những cơ chế không thể thiếu của quá trình thực bào [7]. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tôm không có khả năng bảo vệ cơ thể khi tiếp xúc lần đầu tiên với các tác nhân gây bệnh mới xuất hiện [8]. Tuy nhiên, một số loài tôm vẫn có khả năng tồn tại và phát triển tương đối tốt khi tiếp xúc với tác nhân gây bệnh. Mặt khác, tôm khỏe mạnh thường bị nhiễm virus ở mức độ thấp [9-11] và tôm tiếp xúc với tác nhân gây bệnh virus đã được chứng minh có khả năng kháng khi tiếp xúc virus ở lần tiếp theo [12].

Do vậy, một trong các giải pháp đã được nghiên cứu sử dụng để tăng cường khả năng miễn dịch cho tôm hiện nay là sử dụng các chế phẩm dạng probiotic mang những tính năng đặc trưng hỗ trợ hệ miễn dịch tôm chống lại sự xâm nhập của virus. Nhiều chất chiết xuất từ các loài sinh vật khác nhau được kết hợp trong chế độ ăn của tôm trước và sau khi nhiễm WSSV cho thấy có cải thiện khả năng miễn dịch và làm giảm tỷ lệ chết của tôm bị nhiễm WSSV [13]. Ngoài ra, chế độ ăn có các chất kích thích miễn dịch như β -1, 3-glucan [14], lipopolysaccharide [15], peptidoglycan [16] có khả năng kích thích miễn dịch bẩm sinh giúp tôm có khả năng sống sót cao hơn khi nhiễm WSSV. Gần đây, trong một công bố của nhóm nghiên cứu về enzyme và protein của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên cho thấy, chế phẩm probiotic dạng bào tử biểu hiện kháng nguyên VP28 trên bề mặt có khả năng tăng cường miễn dịch của tôm thẻ chân trắng [17], có tiềm năng giúp tôm chống lại sự xâm nhiễm của WSSV.

Việc đánh giá tác dụng của các loại chế phẩm lên hệ miễn dịch tôm thường thông qua các chỉ tiêu về hoạt độ enzyme tham gia vào quá trình tiêu diệt mầm bệnh như tăng hoạt độ của enzyme SOD (Superoxide dismutase) liên quan tới quá trình tiêu thụ các gốc tự do gây độc cơ thể tôm, của enzyme PO (Phenoloxidase) liên quan tới quá trình chuyển hóa các hợp chất dạng quinon hình thành melanin chôn vùi thể lạ xâm nhập hoặc phóng thích chúng ra bên ngoài [17-19] hay của enzyme NOS (Nitrite oxide synthase) liên quan tới khả năng chống lại các mầm bệnh bằng cách tác động phá vỡ lớp màng lipid hoặc DNA của mầm bệnh [20, 21]. Tuy nhiên, các đánh giá hoạt độ enzyme trong điều kiện thử nghiệm trong phòng thí nghiệm thường gặp

một số khó khăn do lượng mẫu ở mỗi mẻ thí nghiệm có hạn và giá trị thu được qua mỗi đợt lặp lại thường cho mức độ khác biệt thấp giữa nhóm thí nghiệm và đối chứng. Hơn nữa, các phép đo hoạt độ enzyme cần có độ nhạy cao, đòi hỏi phải sử dụng vật liệu có gần đồng vị phóng xạ, các nguyên vật liệu đắt tiền, có tính đặc thù, khó thực hiện trong điều kiện thí nghiệm hiện tại ở Việt Nam.

Vì thế, việc tìm ra dấu ấn phân tử phản ánh tác dụng hỗ trợ của chế phẩm lên hệ miễn dịch tôm là cần thiết và phù hợp với nhu cầu thực tế. Chúng tôi đề xuất giải pháp sử dụng kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) để nhân bản đặc hiệu gen *Rho* và *Ran*, là các gen liên quan tới khả năng thực bào ở tôm trong quá trình chống lại vi khuẩn gây bệnh.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Chế phẩm bào tử *B. subtilis* PY79-CotB-VP28 là sản phẩm của nhóm nghiên cứu đề tài KC04.09/11-15 thuộc Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên [22]. Mẫu tôm thẻ chân trắng sạch bệnh, khoảng 60 ngày tuổi (2-3 g/con), được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1. Mẫu WSSV được lấy từ mẫu tôm có biểu hiện nhiễm thu thập từ Huế, Sóc Trăng (Việt Nam) được bảo quản trong cồn 95° được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu đề tài KC04.09/11-15.

Phương pháp

Nuôi thử nghiệm bảo hộ tôm chân trắng chống lại WSSV bởi bào tử PY79 biểu hiện VP28 trên bề mặt bào tử: tôm thẻ chân trắng được nuôi thuần 2 tuần sau đó được chia thành 4 nhóm, mỗi nhóm lặp lại 2 bể trong cùng một lần thử nghiệm. Các bể thí nghiệm có kích thước 45 x 25 x 30 (cm), có sục khí, bơm tuần hoàn để loại bỏ cặn. Mỗi bể được bổ sung 25 l nước muối biển nhân tạo với độ mặn 16-20‰. Định kỳ mỗi ngày giặt tấm lọc 1 lần, 3 ngày thay 70% nước. Mỗi bể thử nghiệm được bố trí 30 cá thể tôm. Nhiệt độ được duy trì 25-28°C. Lượng thức ăn: 5 g/1 bể/30 con, được chia làm 4 lần cho ăn, mỗi lần cách nhau 3 giờ. Tôm được ăn chế phẩm bào tử (10^6 CFU/g thức ăn) liên tục trong suốt thời gian nuôi và thử thách virus. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trong các thời điểm khác nhau.

Các nhóm thí nghiệm được bố trí như sau: 1) Nhóm đối chứng âm (ĐC-): cho ăn thức ăn công nghiệp và không cảm nhiễm WSSV; 2) Nhóm đối chứng dương

(ĐC+): cho ăn thức ăn công nghiệp và cảm nhiễm WSSV; 3) Nhóm thí nghiệm (PY79): cho ăn thức ăn trộn bào tử chủng đại PY79 và cảm nhiễm; 4) Nhóm thí nghiệm (PY79-CotB-VP28): cho ăn thức ăn trộn bào tử PY79-CotB-VP28 và cảm nhiễm. Các nhóm không ăn hoặc được ăn chế phẩm liên tiếp, đến ngày thứ 14 thì cảm nhiễm tôm với WSSV ($1,3 \times 10^4$ copy/ml nước nuôi). Các lô tôm được theo dõi trong 14 ngày, mỗi ngày 2 lần ghi nhận số lượng tôm chết tích lũy, từ đó xác định tỷ lệ tôm chết sau 14 ngày và được tính toán theo công thức được mô tả của Nguyen A.T và cộng sự (2014). Tỷ lệ bảo hộ sẽ được tính bằng: $(1 - \text{tỷ lệ tôm chết ở nhóm thử nghiệm} / \text{tỷ lệ tôm chết ở nhóm đối chứng dương}) \times 100$ [17].

Thu mẫu và tách RNA tổng số: mô cơ tôm từ các nhóm mẫu trên được lấy mẫu vào ngày trước khi ăn chế phẩm (ngày 0), vào ngày sau khi ăn chế phẩm 7 và 14 ngày; đồng thời lấy mẫu tôm sau khi được thử thách với WSSV 14 ngày (ngày thứ 28 của thí nghiệm). Mẫu được giữ lạnh ở -80°C chuẩn bị cho tách RNA tổng số hoặc được nghiền trên đá lạnh, phân giải trong đệm và tách chiết RNA tổng số theo hướng dẫn của bộ kit MPN07 - Magpure Tissue RNA mini kit (ANABIO R&D, Việt Nam).

Phản ứng chuyển hóa RT-PCR: phản ứng được thực hiện với 2 μ g RNA tổng số và được dùng để tổng hợp sợi cDNA thứ nhất nhờ enzyme phiên mã ngược M-MLV-Reverse Transcriptase (Enzynomic, Korea). Để khuếch đại mRNA của gen *Rho* và *Ran*, phản ứng PCR cho sản phẩm tương ứng lần lượt khoảng 180 bp và 270 bp đã được thực hiện ở 95°C - 10 phút và 30 chu kỳ với (94°C - 30 phút; 52°C - 30 phút; 72°C - 30 phút), tiếp theo với 72°C - 5 phút. Cặp mồi đặc hiệu gen *Rho* (dựa trên trình tự đã được công bố ở ngân hàng gen AY622688.1) là: Fw: 5'- GAA AAT ATT CCA GAA AAA TGG ACG-3'; Rv: 5'- TTT ATC TTC TCA GCC ATG TTA CGA-3'. Cặp mồi đặc hiệu gen *Ran* (dựa trên trình tự JN596104.1) là: Fw: 5'- ACATGGGGCTCGAAGCCTTGAC-3'; Rv: 5'- TCCTTCACATCAACCTTGTT-3'. Để khuếch đại gen quản gia β -actin, phản ứng PCR cho sản phẩm khoảng 500 bp được thực hiện ở 94°C - 5 phút và 27 chu kỳ với (94°C - 30 phút; 64°C - 30 phút; 72°C - 45 phút), tiếp theo với 72°C - 5 phút. Cặp mồi dùng cho β -actin [21] là: Fw: 5'- GAC TCG TAC GTC GGC GAC GAG G-3' và Rv: 5'- AGC AGC GGT CAT CTC CTG CTC-3'. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarose 1,5%, được nhuộm với dịch

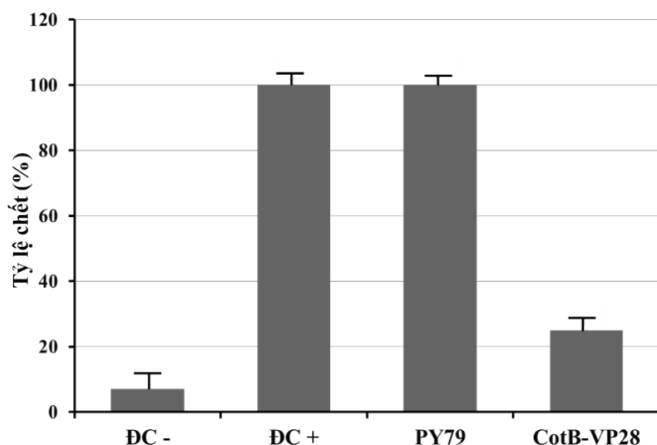
chứa ethidium bromide và đem soi dưới ánh sáng UV của hệ thống soi gel (Biorad, Mỹ).

Kết quả

Ảnh hưởng bảo hộ của chế phẩm PY79-CotB-VP28 lên khả năng chống lại WSSV ở tôm thẻ chân trắng

Sau 14 ngày thử thách với WSSV cho thấy, nhóm tôm ăn bào tử mang CotB-VP28 có tỷ lệ chết thấp (23%), chỉ cao hơn tỷ lệ chết tự nhiên ở nhóm (ĐC-) là nhóm không ăn chế phẩm và cũng không bị cảm nhiễm WSSV (7,4%) là 15,6%; trong khi nhóm ăn bào tử thể đại là PY79 và nhóm (ĐC+), là nhóm không ăn chế phẩm nhưng bị nhiễm WSSV thì tỷ lệ tôm chết sau 14 ngày tăng rất cao, tương ứng lần lượt là 100% và 99,2% (hình 1). Như vậy, tỷ lệ bảo hộ của mẫu tôm thẻ chân trắng được ăn chế phẩm bào tử mang kháng nguyên VP28 thu được là 75%.

Dựa trên kết quả bảo hộ này, chúng tôi cho rằng, chế phẩm mang kháng nguyên VP28 đã thực sự hỗ trợ hệ miễn dịch của tôm, giúp tôm chống lại sự xâm nhập gây chết của WSSV. Điều này là cơ sở cho việc sử dụng các mẫu tôm thẻ chân trắng của thí nghiệm để đánh giá biểu hiện các gen liên quan tới quá trình thực bào chống lại tác nhân gây bệnh ở tôm.

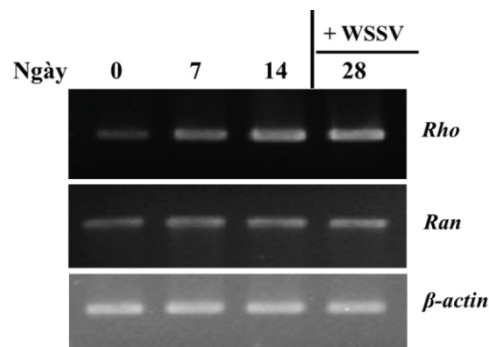


Hình 1: khả năng bảo hộ chống lại WSSV ở tôm thẻ chân trắng. Tỷ lệ chết được đánh giá vào thời điểm ngày thứ 14 sau cảm nhiễm tôm với WSSV. Kết quả đưa ra dựa trên số liệu của 3 lần thử nghiệm độc lập

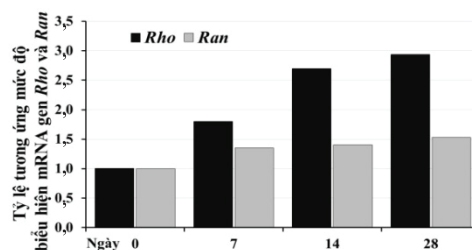
Mức độ phiên mã gen Rho và Ran

Với mục đích tìm ra dấu ấn phân tử cho việc đánh giá hiệu quả đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng sau khi được ăn thức ăn trộn bào tử *Bacillus* PY79 CotB-VP28, chúng tôi sử dụng kỹ thuật RT-PCR để nhân bản đặc hiệu gen liên quan tới cơ chế thực bào ở tôm. Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi chọn gen *Rho* và *Ran* được cho là có liên quan tới quá trình

thực bào bảo vệ cơ thể tôm trước các tác nhân gây bệnh [23].



A



B

Hình 2: mức độ biểu hiện mRNA gen Rho và Ran

A) Mức độ biểu hiện mRNA của gen Rho và Ran sau khi tôm được ăn chế phẩm PY79-CotB-VP28. Tôm được ăn thức ăn trộn chế phẩm liên tục trong suốt quá trình thử nghiệm, 1-2 con tôm tại các thời điểm ngày thứ 0, 7, 14 trước khi nhiễm với WSSV và sau khi nhiễm WSSV 14 ngày tiếp theo (ngày thứ 28) được lấy và tách lấy RNA tổng số dùng cho phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu gen Rho và Ran. β-actin được dùng như gen nội chuẩn ở mỗi loại mẫu. (B) Tỷ lệ tương ứng mức độ biểu hiện mRNA của các gen Rho và Ran so sánh tại các thời điểm thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Image J

Sản phẩm phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu gen *Rho* và *Ran* (như đã mô tả ở phần phương pháp) được kiểm tra trên gel agarose chỉ ra sản phẩm là băng duy nhất có kích thước lần lượt khoảng 180 và 270 bp, đúng như kích thước dự đoán. Kết quả cho thấy, có sự tăng dần mức độ biểu hiện gen *Rho* theo thời gian tôm được ăn thức ăn có chứa bào tử PY79-CotB-VP28; tuy nhiên, chúng tôi quan sát không thấy có sự thay đổi rõ rệt về mức độ biểu hiện mRNA gen *Ran* (hình 2). Sau 7 ngày, hàm lượng mRNA gen *Rho* đã bắt đầu tăng và tăng rõ rệt từ ngày thứ 14 trở đi, tăng khoảng trên 2,7 lần so với mẫu tôm ngày 0 chưa ăn chế phẩm (hình 2). Sau khi tôm bị cảm nhiễm với WSSV 14 ngày (tức ngày thứ 28 của thí nghiệm), mức độ biểu hiện gen *Rho* cao hơn ở mẫu ngày 0 và ngày 7 lần lượt gần 3 và 1 lần (hình 2B).

Kết quả bước đầu này cho thấy, tôm thẻ chân trắng có khả năng chống lại được WSSV khi được ăn chế phẩm chứa VP28, đồng thời, những tôm thí nghiệm

này có mức biểu hiện mRNA gen *Rho* tăng lên so với nhóm không được ăn chế phẩm, chứng tỏ khả năng thực bào tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh ở tôm đã diễn ra mạnh mẽ.

Bàn luận

Khả năng chống lại WSSV ở tôm thẻ chân trắng do chế phẩm bào tử PY79-CotB-VP28 đã được công bố lần đầu trong công trình của Nguyen A.T và cộng sự, 2014 [17] với khả năng bảo hộ đạt xấp xỉ 50%. Khả năng bảo hộ của tôm chống lại WSSV có được do tôm được ăn thức ăn chứa bào tử CotB-VP28 ở mật độ 10^6 CFU/g thức ăn, thu được trong nghiên cứu này tương ứng là 75% (hình 1) cũng phù hợp với rất nhiều công trình công bố trước đó về tác dụng bảo hộ tôm, cá chống lại WSSV [18, 19]. Giá trị bảo hộ này cao hơn so với mức hiệu quả quy ước khi kiểm định hiệu quả vaccine dùng cho thủy sản của Ủy ban châu Âu (Relative percent protection score (RPP) > 60%).

Gen *Rho* và *Ran* đã được chứng minh là có biểu hiện tăng lên ở tôm khi bị nhiễm với WSSV [23]. Khi bị nhiễm WSSV, hàng rào miễn dịch tự nhiên với sự hoạt động mạnh mẽ của các enzyme tham gia vào quá trình thực bào. Tác dụng của chế phẩm được ghi nhận thông qua việc tăng khả năng thực bào ở tôm. Chúng tôi cho rằng, tôm có khả năng tăng sức bảo vệ chống lại sự xâm nhiễm của WSSV bằng cách tăng khả năng thực bào nhờ chế phẩm khi có sự tham gia của *Rho* và *Ran*. Tuy nhiên, kết quả cho thấy, chỉ có mức độ biểu hiện mRNA của gen *Rho* có sự tăng tuyến tính với thời gian tôm được ăn chế phẩm mang kháng nguyên VP28 của WSSV (hình 2). Hơn nữa, ở ngày thứ 28 của thí nghiệm (tôm đã bị nhiễm với WSSV 14 ngày), mức độ biểu hiện mRNA gen *Rho* vẫn ở mức cao (khoảng gần 3 lần) so với thời điểm chưa được ăn chế phẩm mang kháng nguyên VP28. Điều này có thể giải thích rằng, tôm vẫn duy trì khả năng thực bào mạnh mẽ ngay cả khi có mặt WSSV, chứng tỏ hàng rào miễn dịch của tôm đã được cải thiện bởi chế phẩm mang kháng nguyên VP28. Trong khi đó, nhóm tôm ăn thức ăn chứa bào tử chủng đại PY79 sau khi thử thách với virus đã bị nhiễm bệnh và chết gần hết. Không như dự đoán, chúng tôi không quan sát thấy có sự khác biệt mức biểu hiện mRNA gen *Ran* tại các thời điểm tôm đã được ăn chế phẩm mang kháng nguyên VP28 so với thời điểm chưa được ăn chế phẩm, cho thấy gen *Ran* có thể không phải đối tượng chính chịu tác động trong quá trình chống lại mầm bệnh ở tôm thẻ. Hiện tại thí nghiệm của chúng tôi mới thiết kế trên tôm thẻ chân

trắng, để đi đến kết luận cuối cùng về mức biểu hiện gen *Ran* khi tôm được ăn chế phẩm mang VP28, chúng tôi cần kiểm tra đáp ứng của gen này trong cùng điều kiện thí nghiệm trên một số loài tôm khác nữa, chẳng hạn như tôm sú.

Kết luận

Chúng tôi đã xác định được gen *Rho* (là một trong các gen liên quan đến cơ chế thực bào ở tôm) có thể được dùng làm chỉ thị chuẩn (marker) cho việc đánh giá tác dụng của chế phẩm probiotic mang kháng nguyên VP28 giúp tăng cường miễn dịch ở tôm chống lại WSSV bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả nghiên cứu này cũng khẳng định tác dụng bảo hộ của chế phẩm mang VP28 của nhóm nghiên cứu đề tài KC04.09-11/15 về khả năng chống lại WSSV.

Từ kết quả nghiên cứu bước đầu này, chúng tôi cho rằng, phương pháp RT-PCR nhân bản đặc hiệu gen *Rho* được dùng ở đây có thể sử dụng để đánh giá tác động của các chế phẩm lên hệ miễn dịch của tôm một cách hiệu quả. Điều này cũng mở ra tiềm năng khai thác mức độ biểu hiện các gen liên quan tới khả năng thực bào ở tôm trong việc đánh giá tác động của các chế phẩm probiotics hỗ trợ miễn dịch cho tôm nuôi nói chung tại Việt Nam.

Lời cảm ơn

Tập thể tác giả trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên thông qua đề tài mã số TN.15.29.

Tài liệu tham khảo

- [1] W. Liu, F. Han, X. Zhang (2009), "Ran GTPase regulates hemocytic phagocytosis of shrimp by interaction with myosin", *Journal of proteome research*, **8**(3), pp.1198-1206.
- [2] P.H. Wang, T. Huang, X. Zhang, J.G. He (2014), "Antiviral defense in shrimp: from innate immunity to viral infection", *Antiviral research*, **108**, pp.129-141.
- [3] C.B. Van de Braak, M.H. Botterblom, N. Taverne, W.B. Van Muiswinkel, J.H. Rombout, W.P. Van Der Knaap (2002), "The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected: *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp", *Fish & shellfish immunology*, **13**(4), pp.293-309.
- [4] P. Jiravanichpaisal, B.L. Lee, K. Soderhall (2006), "Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization", *Immunobiology*, **211**(4), pp.213-236.
- [5] H. Liu, K. Soderhall, P. Jiravanichpaisal (2010), "Antiviral immunity in crustaceans", *Fish & shellfish immunology*, **27**(2), pp.79-88.

- [6] A. Tassanakajon, P. Amparyup, K. Somboonwiwat, P. Supungul (2010), "Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp", *Mar Biotechnol (NY)*, **12(5)**, pp.487-505.
- [7] J.S. Kim, B.A. Diebold, J.I. Kim, J.Y. Lee, J.B. Park (2004), "Rho is involved in superoxide formation during phagocytosis of opsonized zymosans", *The Journal of biological chemistry*, **279(20)**, pp.21589-21597.
- [8] P. Kanchanaphum, C. Wongteerasupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, T.W. Flegel (1998), "Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*", *Diseases of aquatic organisms*, **34(1)**, pp.1-7.
- [9] H.C. Hsu, C.F. Lo, S.C. Lin, K.F. Liu, S.E. Peng, Y.S. Chang, L.L. Chen, W.J. Liu, G.H. Kou (1999), "Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders", *Diseases of aquatic organisms*, **39(1)**, pp.13-19.
- [10] J.A. Cowley, C.M. Dimmock, K.M. Spann, P.J. Walker (2001), "Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns. Molecular evidence for the first invertebrate nidovirus", *Advances in experimental medicine and biology*, **494**, pp.43-48.
- [11] S. Iwanaga, B.L. Lee (2005), "Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals", *Journal of biochemistry and molecular biology*, **38(2)**, pp.128-150.
- [12] C.A. Venegas, L. Nonaka, K. Mushiake, T. Nishizawa, K. Murog (2000), "Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV)", *Diseases of aquatic organisms*, **42(2)**, pp.83-89.
- [13] T.J. Hsieh, J.C. Wang, C.Y. Hu, C.T. Li, C.M. Kuo, S.L. Hsieh (2008), "Effects of rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge", *Fish & shellfish immunology*, **25(5)**, pp.581-588.
- [14] C.F. Chang, M.S. Su, H.Y. Chen, I.C. Liao (2003), "Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus", *Fish & shellfish immunology*, **15(4)**, pp.297-310.
- [15] Y. Takahashi, M. Kondo, T. Itami, T. Honda, H. Inagawa, T. Nishizawa, G.I. Soma, Y. Yokomizo (2000), "Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS)", *Fish & shellfish immunology*, **10(6)**, pp.555-558.
- [16] H.H. Lee, T. Osaki, J.Y. Lee, M.J. Baek, R. Zhang, J.W. Park, S. Kawabata, K. Soderhall, B.L. Lee (2004), "Peptidoglycan recognition proteins involved in 1,3-beta-D-glucan-dependent prophenoloxidase activation system of insect", *Journal of biological chemistry*, **279(5)**, pp.3218-3227.
- [17] A.T. Nguyen, C.K. Pham, H.T. Pham, H.L. Pham, A.H. Nguyen, L.T. Dang, H.A. Huynh, S.M. Cutting, T.N. Phan (2014), "Bacillus subtilis spores expressing the VP28 antigen: a potential oral treatment to protect *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome", *FEMS microbiology letters*, **358(2)**, pp.202-208.
- [18] L.L. Fu, J.B. Shuai, Z.R. Xu, J.R. Li, W.F. Li (2010), "Immune responses of *Fenneropenaeus chinensis* against white spot syndrome virus after oral delivery of VP28 using *Bacillus subtilis* as vehicles", *Fish & shellfish immunology*, **28(1)**, pp.49-55.
- [19] D. Ning, X. Leng, Q. Li, W. Xu (2011), "Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration", *Journal of applied microbiology*, **111(6)**, pp.1327-1336.
- [20] G. Jiang, R. Yu, M. Zhou (2006), "Studies on nitric oxide synthase activity in haemocytes of shrimps *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus* after white spot syndrome virus infection", *Nitric oxide: biology and chemistry/official journal of the Nitric Oxide Society*, **14(3)**, pp.219-227.
- [21] C. Ongravarrasopone, M. Chanasakaulniyom, K. Sritunialucksana, S. Panyim (2008), "Suppression of PmRab7 by dsRNA inhibits WSSV or YHV infection in shrimp", *Marine Biotechnology* **10(4)**, pp.374-381.
- [22] Phạm Kiên Cường, Bùi Thị Ngọc Ánh, Trần Thị Thanh Quỳnh, Nguyễn Thị Vân Anh, Bùi Thị Việt Hà, Phạm Thị Lương Hằng, Nguyễn Thị Hồng Loan, Nguyễn Hòa Anh, Phan Tuấn Nghĩa (2014), "Nhân dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên VP28 của virus đốm trắng trên lớp áo ngoài của bào tử *B. subtilis*", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **12(2)**, tr.247-253.
- [23] D. Pan, N. He, Z. Yang, H. Liu, X. Xu (2005), "Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization", *Developmental and comparative immunology*, **29(2)**, pp.103-112.

Khả năng kháng khuẩn của dịch ép một số loại thảo dược trị bệnh lở loét do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây ra trên cá lóc đen (*Channa striata* Bloch, 1793)

Nguyễn Đình Vinh*, Trương Thị Thành Vinh, Hồ Văn Hòa

Khoa Nông lâm ngư, Trường Đại học Vinh

Ngày nhận bài 6/7/2016, ngày chuyển phản biện 8/7/2016, ngày nhận phản biện 18/7/2016, ngày chấp nhận đăng 28/7/2016

Nghiên cứu này tiến hành thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của 4 loại dịch ép thảo dược đối với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây bệnh lở loét trên cá lóc đen. Kết quả cho thấy, đường kính vòng kháng khuẩn của dịch ép tỏi, gừng, hẹ, cỏ mực lần lượt là 25,97; 13,07; 11,33 và 9,9 mm. Mặt khác, dịch ép tỏi pha loãng với dung môi: rượu, cồn 95°, nước cất và chloroform với tỷ lệ 1:1 cho thấy không có sự sai khác về khả năng kháng khuẩn của tỏi với rượu, cồn 95° và nước cất, đường kính vòng kháng khuẩn đạt 25,23-25,53 mm, trong khi đó chloroform chỉ đạt 9,2 mm. Thử nghiệm cảm nhiễm cá lóc đen với vi khuẩn *A. hydrophila* và sử dụng dịch ép tỏi pha loãng tỷ lệ 1:1 với nước, trộn vào thức ăn với lượng 80 ml/kg cho cá lóc đen ăn thấy có sự phục hồi, tỷ lệ sống đạt 30%.

Từ khóa: bệnh lở loét, cá lóc đen, thảo dược, vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*.

Chỉ số phân loại 4.5

Examining anti-bacterial effects of juices derived from medicinal herbs on *Aeromonas hydrophila* strain causing ulcer on snakeheads

Summary

The study was carried out to examine anti-bacterial effects of juices derived from four herbal species on *Aeromonas hydrophila* strain which causes ulcer on snakeheads. Results showed that four herbs *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Allium tuberosum* and *Eclipta prostrata* had anti-bacterial zone diameters of 25.97, 13.07, 11.33, and 9.9 mm respectively. On the other hand, in case of garlic juice diluted in four solvent including ethanol, alcohol (95°), distilled water, and chloroform with rate 1:1, the results indicated that no significant difference was found when garlic diluted in solvents as ethanol, alcohol, and distilled water with anti-bacterial zone diameters which fluctuated within 25.23-25.53 mm, while being diluted in chloroform solvent only reached 9.2 mm in diameter of anti-bacterial. The experiment of injecting *A. hydrophila* into snakehead and using garlic juice diluted in distilled water with rate 1:1 and then mixed with food by dose of 80 ml/kg feed weight for snakehead ulcer treatment showed recovery and survival rate at 30% compared to the control tank.

Keywords: *Aeromonas hydrophila* bacteria, herb, snakehead, ulcer.

Classification number 4.5

Đặt vấn đề

Cá lóc đen (*Channa striata* Bloch, 1793) là một trong những đối tượng có chất lượng thịt thơm ngon, giá trị dinh dưỡng cao, do đó hiện đang được nuôi khá phổ biến ở nước ta [1]. Song trong quá trình nuôi, dịch bệnh là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng của cá lóc đen, trong đó, vi khuẩn *A. hydrophila* là một trong những tác nhân gây bệnh thường gặp [2].

Việc sử dụng thảo dược trong trị bệnh do vi khuẩn trên động vật thủy sản đã được nghiên cứu khá nhiều với những ưu điểm không gây hiện tượng kháng thuốc và thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, trên cá lóc đen hiện chưa có nghiên cứu nào về sử dụng các loại thảo dược để phòng trị bệnh. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: “Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của dịch ép một số loại thảo dược trị bệnh lở loét do vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra trên cá lóc đen (*Channa striata* Bloch, 1793)”.

Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Thời gian, địa điểm nghiên cứu

Thời gian triển khai nghiên cứu: từ tháng

*Tác giả liên hệ: Email: vinhnguyendinhv@gmail.com; Tel: 0914970709

12/2015 đến tháng 5/2016.

- Mẫu được phân tích tại Phòng thí nghiệm vi sinh bệnh học thủy sản, Khoa Nông lâm ngư, Trường Đại học Vinh.

Vật liệu nghiên cứu

- Vi khuẩn *A. hydrophyla* được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm vi sinh bệnh học thủy sản, Khoa Nông lâm ngư, Trường Đại học Vinh.

- Thảo dược: tỏi (*Allium sativum* L), gừng (*Zingiber officinale*), lá hẹ (*Allium sativum*), cỏ mực (*Eclipta alba*).

- Kháng sinh: Doxycycline (30 µg), Tetracyclin (30 µg), Oxacillin (1 µg), Erythromycin (15 µg).

- Cá lóc đen giai đoạn thương phẩm cỡ 0,3-0,5 con/kg.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu dịch ép thảo dược:

- Đối với tỏi và gừng: chọn những củ chắc, đều, đẹp, bỏ vỏ và rửa sạch, để ráo nước tự nhiên, cân khối lượng củ rồi cho vào máy ép thu lấy dịch ép. Dịch ép được bảo quản ở nơi khô thoáng và ở nhiệt độ phòng.

- Đối với lá hẹ và lá cỏ mực tươi: lấy những lá bánh tẻ, rửa sạch, để ráo nước tự nhiên, thái nhỏ, cân khối lượng rồi cho vào cối giã nhuyễn, thu lấy dịch ép, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn: phương pháp nuôi cấy, phân lập vi khuẩn dựa trên phương pháp nghiên cứu bệnh vi khuẩn trên động vật thủy sản của Frerichs và Millar (1993) [3]. Môi trường Nutrient agar được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn, dãy phản ứng sinh hóa được tiến hành theo test API 20E để định danh vi khuẩn theo khóa định loại của Nicky Buller (2004) [4].

Phương pháp thử kháng sinh đồ: theo Bauer và cộng sự (1973) [5], kết quả được ghi nhận bằng sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch với các đĩa giấy kháng sinh tiêu chuẩn (CODE 1334-OXOID).

Phương pháp bố trí thí nghiệm:

Thí nghiệm 1: nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophyla* của dịch ép một số loại thảo dược.

Các loại thảo dược thử nghiệm gồm: củ tỏi, củ gừng, lá hẹ và lá cỏ mực.

Thử kháng sinh đồ theo phương pháp của Bauer (1973) [5] và đối chứng với các loại kháng sinh: Doxycycline (30 µg), Tetracyclin (30 µg), Oxacillin (1 µg), Erythromycin (15 µg).

Thí nghiệm 2: nghiên cứu ảnh hưởng của các loại dung môi đến khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophyla* của dịch ép thảo dược.

Dung môi thử nghiệm gồm 4 loại: rượu, cồn 95°, chloroform, nước cất. Tỷ lệ pha loãng 1:1. Thử kháng sinh đồ theo phương pháp của Bauer (1973) [5].

Thí nghiệm 3: nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng dịch ép các loại thảo dược tới khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophyla*.

Dịch ép thảo dược được pha loãng với loại dung môi tốt nhất từ thí nghiệm 3 với các nồng độ 50, 25 và 12,5%. Thử kháng sinh đồ theo phương pháp của Bauer (1973) [5].

Thí nghiệm 4: thí nghiệm sử dụng dịch ép tỏi trị bệnh do vi khuẩn *A. hydrophyla* gây ra trên cá lóc đen.

Thí nghiệm bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn gồm 2 công thức, mỗi công thức lặp 3 lần. Cắm nhím cho cá ở cả 2 công thức với liều 0,1 ml vi khuẩn mật độ 10^6 - 10^8 CFU/ml vào cơ lưng cá. Khi cá bắt đầu xuất hiện dấu hiệu bệnh lý thì ở CT1 cho ăn thức ăn trộn với kháng sinh Tetracyclin (150 µg/kg thức ăn). Ở CT2 cho cá ăn thức ăn tẩm dịch ép thảo dược trong suốt quá trình tiến hành thí nghiệm. Chăm sóc và quản lý như nhau ở cả 2 công thức, sục khí thường xuyên, ngày cho ăn 2 lần và tiến hành siphon, khi nước bẩn thì thay nước.

Theo dõi tình trạng bệnh lý, tỷ lệ sống của cá ở cả 2 công thức thí nghiệm, thu mẫu bệnh, nuôi cấy phân lập lại vi khuẩn để chắc chắn rằng vi khuẩn gây chết cá là vi khuẩn *A. hydrophyla*.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Microsoft Excel 2007, SPSS 16.0. Sử dụng phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA) và tiêu chuẩn LSD (Least Significant Difference) để xác định sự sai khác có ý nghĩa.

Kết quả nghiên cứu

Khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophyla* của dịch ép các loại thảo dược

Bảng phương pháp thử kháng sinh đồ của Bauer

(1973) [5], chúng tôi thu được kết quả về khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila* dịch ép các loại thảo dược trong sự so sánh với các loại kháng sinh như trong bảng 1.

Bảng 1: kết quả xác định khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila* của các loại thảo dược và kháng sinh

Loại kháng sinh/thảo dược	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Mức kháng khuẩn (theo tiêu chuẩn Bauer - Kirby)
Doxycycline (30 µg)	38,8 ± 0,35 ^e	Cao
Tetracyclin (30 µg)	25,93 ± 0,31 ^e	Cao
Oxacillin (1 µg)	18,87 ± 0,12 ^d	Trung bình
Erythromycin (15 µg)	34,13 ± 0,64 ^f	Cao
Tỏi (<i>Allium sativum</i>) (150 µl)	25,97 ± 0,32 ^e	Cao
Gừng (<i>Zingiber officinale</i>) (150 µl)	13,07 ± 0,32 ^c	Trung bình
Lá hẹ (<i>Allium tuberosum</i>) (150 µl)	11,33 ± 0,32 ^b	Trung bình
Cỏ mực (<i>Eclipta alba</i> Hassk) (150 µl)	9,90 ± 0,42 ^a	Kém

Số liệu trong cùng một cột có ký hiệu chữ mũ khác nhau thể hiện mức sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$



Hình 1: đường kính vòng kháng khuẩn của các loại thảo dược và các loại kháng sinh

Kết quả bảng 1 và hình 1 cho thấy, dịch ép các loại thảo dược đều có khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila*. Đường kính vòng kháng khuẩn của dịch ép tỏi là 25,97 mm, lớn nhất trong 4 loại thảo dược nghiên cứu; dịch ép gừng, hẹ chỉ có tính kháng khuẩn trung bình, lần lượt là 13,07 và 11,33 mm; cỏ mực có tính kháng khuẩn kém nhất (9,9 mm). Kết quả phân tích Anova và kiểm định Duncan cho thấy sự sai khác giữa dịch ép các loại thảo dược có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Điều đặc biệt là khả năng kháng khuẩn của dịch ép tỏi chỉ thấp hơn kháng sinh Doxycycline, Erythromycin, tương đương với Tetracyclin, thậm chí còn cao hơn Oxacillin (sai khác có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$).

Hiện nay cũng đã có nhiều nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của tỏi đối với bệnh do vi khuẩn gây ra trên động vật thủy sản. Theo nghiên cứu của Trần Ngọc Hùng, Trương Thị Thành Vinh (2014a) [6] khi thử nghiệm đối với vi khuẩn *Streptococcus* spp gây ra trên cá trắm cỏ (*Ctenopharyngodon idellus*), đường kính vòng kháng khuẩn đạt 20,75 mm; đối với vi

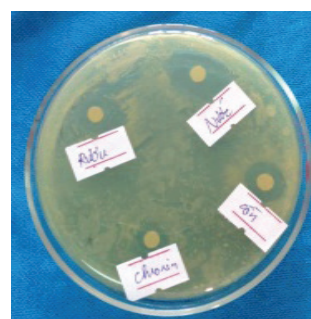
khuẩn *Shewanella gelidimarina* gây bệnh trên cá ghê (*Bagarius rutilus* Ng&Kottelat, 2000), đường kính vòng kháng khuẩn đạt 21,0 mm. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi đối với vi khuẩn *A. hydrophila* cho thấy hiệu quả kháng khuẩn của tỏi cũng rất tốt. Đây là cơ sở để chúng tôi sử dụng thảo dược này trong các thí nghiệm tiếp theo về dung môi, tỷ lệ pha loãng và thử nghiệm trị bệnh do vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra trên cá lóc đen.

Kết quả ảnh hưởng của các loại dung môi đến khả năng kháng khuẩn của dịch ép tỏi

Bảng 2: ảnh hưởng của các loại dung môi đến khả năng kháng khuẩn của dịch ép tỏi

Dung môi	Đường kính vòng kháng khuẩn	Mức kháng khuẩn (theo tiêu chuẩn Bauer - Kirby)
Rượu	25,27 ± 0,31 ^b	Cao
Cồn	25,23 ± 0,32 ^b	Cao
Chloroform	9,2 ± 0,36 ^a	Kém
Nước	25,53 ± 1,01 ^b	Cao

Số liệu trong cùng một cột có ký hiệu chữ mũ khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$



Hình 2: đường kính vòng kháng khuẩn của dịch ép tỏi

Năm 2013, nhóm tác giả Nguyễn Thanh Hải, Bùi Thị Tho thuộc Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã thử nghiệm dung môi nước, etanol, methanol chiết xuất dịch tỏi và xác định khả năng kháng khuẩn với *E. coli* O₄₄ với đường kính vòng vô khuẩn đạt lần lượt 11,3; 19,1 và 19,7 mm [7]. Nghiên cứu của Trần Ngọc Hùng, Trương Thị Thành Vinh (2014a) [6] cho thấy, dịch ép tỏi + nước, tỏi + rượu, tỷ lệ pha loãng 1:1 có khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio vulnificus* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 18,12; 21,71 mm. Như vậy, so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đường kính kháng khuẩn của hỗn hợp tỏi + rượu, tỏi + cồn và tỏi + nước có khả năng kháng kháng vi khuẩn *A. hydrophila* cao hơn hẳn, đạt 25,23-25,53 mm. Riêng với dung môi chloroform, đường kính vòng kháng khuẩn chỉ đạt 9,2 mm. Như vậy, mặc dù có sự chênh lệch về kích thước vòng kháng khuẩn của 3 loại dung

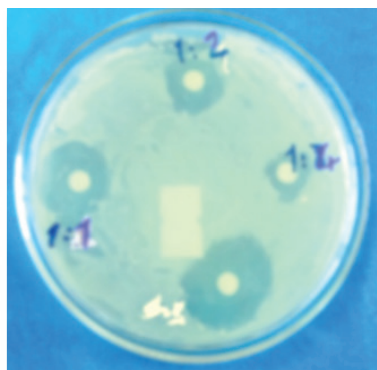
môi cồn, rượu, nước nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Do đó, chúng tôi sử dụng nước làm dung môi pha loãng dịch ép tỏi cho các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của nồng độ pha loãng dịch ép tỏi tới khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila*

Bảng 3: ảnh hưởng của nồng độ pha loãng dịch ép tỏi tới khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila*

Nồng độ pha loãng	Đường kính vòng kháng khuẩn	Mức kháng khuẩn (theo tiêu chuẩn Bauer - Kirby)
1:0	$25,97 \pm 1,11^c$	Cao
1:1	$25,53 \pm 1,01^c$	Cao
1:2	$19,06 \pm 0,61^b$	Trung bình
1:4	$14,76 \pm 0,91^a$	Trung bình

Số liệu trong cùng một cột có ký hiệu chữ mũ khác nhau thể hiện mức sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$



Hình 3: đường kính vòng kháng khuẩn của dịch ép tỏi ở các nồng độ khác nhau

Theo Trần Ngọc Hùng, Trương Thị Thành Vinh (2014b) [8] thử nghiệm dịch ép tỏi đối với vi khuẩn *Streptococcus* spp gây trên cá trắm cỏ cho thấy: ở nồng độ dịch ép 100% thì tỏi có khả năng kháng khuẩn cao với đường kính vòng vô khuẩn 20,75 mm, khả năng kháng khuẩn giảm dần ở các nồng độ thấp hơn. So sánh với kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, dịch ép tỏi ở nồng độ 100, 50% có đường kính vòng kháng khuẩn cao đạt lần lượt 25,97 và 25,53 mm, sai khác không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$, từ nồng độ 25 xuống 12,5% thì dịch ép tỏi có tính kháng khuẩn mức trung bình. Do đó, chúng tôi lựa chọn dịch ép tỏi nồng độ 50% để tiến hành thí nghiệm trị bệnh.

Kết quả sử dụng dịch ép tỏi trị bệnh do vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra trên cá lóc đen

Sau khi nuôi thuần, chúng tôi tiến hành cảm nhiễm vi khuẩn cho cá, ngày thứ 2 cá bắt đầu nhiễm bệnh. Ở

CT1 cho cá ăn thức ăn có trộn kháng sinh Tetracyclin (150 $\mu\text{g/kg}$ thức ăn) và CT2 cho cá ăn thức ăn tẩm dịch ép tỏi nồng độ 50%, cho cá ăn ngày 2 lần với lượng 80 ml/kg thức ăn. Kết quả thu được về tỷ lệ sống được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4: tỷ lệ sống của cá ở thí nghiệm trị bệnh

Ngày thí nghiệm	Tỷ lệ sống (%)	
	CT1	CT2
1	100	100
2	93,33	93,33
3	83,33	83,33
4	83,33	56,67
5	76,67	43,33
6	66,67	33,33
7	66,67	30



Hình 4: hình ảnh cá trước và sau khi phát bệnh

Từ bảng 4 và hình 4 ta thấy, trong 3 ngày đầu, tỷ lệ sống của cá ở 2 công thức thí nghiệm không khác nhau. Điều này có thể giải thích vì cá được nuôi trong điều kiện giống nhau trong một thời gian dài nên khi mới cảm nhiễm, sức chịu đựng của chúng là tương đương nhau. Tuy nhiên, kể từ ngày thứ 4 trở đi, giữa 2 công thức có sự khác biệt rõ rệt, tỷ lệ sống có sự chênh lệch lớn, ở CT2 là 56,67% trong khi ở CT1 là 83,33%. Kết thúc quá trình 7 ngày theo dõi, tỷ lệ sống ở CT1 đạt 66,67%, trong khi tỷ lệ sống của cá trong CT2 đạt 30%.

Năm 2008, Trương Thị Mỹ Hạnh và cs [9] đã nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila* của dịch ép từ lá hẹ gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi. Kết quả trị bệnh cá rô phi nhiễm khuẩn *A. hydrophila* trong quy mô phòng thí nghiệm khi sử dụng nước ép lá hẹ trộn vào thức ăn viên đạt tỷ lệ sống 50% so với lô thí nghiệm. Đối với dịch ép tỏi cũng đã có nhiều nghiên cứu về khả năng trị bệnh đối với một số loài vi khuẩn khác, như nghiên cứu trị bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* spp gây ra trên cá trê lai cho thấy dịch ép từ hỗn hợp tỏi và lá húng có tác dụng trị bệnh hiệu quả, tỷ lệ sống đạt đến hơn 90% [10]. Nghiên cứu của Trần Ngọc Hùng, Trương Thị Thành Vinh (2014a) [6] sử dụng dịch ép củ tỏi trị bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* spp gây ra trên cá trắm cỏ cho tỷ lệ sống đạt 43,3%.

Như vậy, so với nghiên cứu của chúng tôi về dịch ép tỏi nồng độ 50% trị bệnh lở loét do vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá lóc đen với tỷ lệ sống 30% thấp hơn các kết quả của nghiên cứu trên. Tuy nhiên, kết quả này cũng cho ta cơ sở để tiến hành nghiên cứu các mức nồng độ, liều lượng cao hơn để tăng hiệu quả trị bệnh đối với vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra trên cá lóc đen. Sau mỗi lần cá chết, chúng tôi tiến hành thu mẫu để tái phân lập và khẳng định được rằng cá có biểu hiện bệnh lý và chết là do vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra.

Kết luận

1. Dịch ép các loại thảo dược tỏi, gừng, hẹ và cỏ mực có khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila* với các mức độ khác nhau. Tỏi có đường kính vòng kháng khuẩn cao (25,97 mm), gừng, hẹ có tính kháng khuẩn trung bình (13,07 và 11,33 mm), còn cỏ mực có tính kháng khuẩn kém (9,9 mm).

2. Dịch ép tỏi pha loãng tỷ lệ pha 1:1 với các dung môi: rượu, cồn 95°, nước cất đều có khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila* với đường kính kháng khuẩn lần lượt là 25,27; 25,23 và 25,53 mm, kém nhất là dịch ép tỏi với chloroform (chỉ đạt 9,2 mm).

3. Dịch ép tỏi ở nồng độ 100, 50% có tính kháng vi khuẩn *A. hydrophila* cao nhất với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 25,53 và 20,13 mm và tính

kháng khuẩn giảm dần khi nồng độ xuống mức 25; 12,5% (chỉ đạt mức trung bình).

4. Dịch ép tỏi pha loãng tỷ lệ 1:1 với nước, trộn vào thức ăn lượng 80 ml/kg thức ăn cho cá lóc đen ăn thấy có sự phục hồi, tỷ lệ sống 30%

Tài liệu tham khảo

- [1] Lê Xuân Sinh, Đỗ Minh Chung (2010), “Hiện trạng và những thách thức cho nghề nuôi cá lóc (*Channa micropeltes* và *Channa striata*) ở Đồng bằng sông Cửu Long”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 20, tr.81-85.
- [2] Phạm Minh Duc, Tran Ngoc Tuan, Kishio Hatai (2013), “*Aeromonas hydrophila* Infection in Fingerlings of Snakehead *Channa striata* in Viet Nam”, *The Japanese Society of Fish Pathology*, 48(2), pp.48-51.
- [3] G.N. Frerichs & Millar (1993), “Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens”, *Pisces Press. Stirling*, p.58.
- [4] Nicky Buller (2004), *Bacteria from fish and other aquatic animals*, Senior Microbiologist Department of Agriculture South Perth Western Australia, 394 p.
- [5] O.N. Bauer, V.A. Musseius, Y.A. Strelkov (1973), “Diseases of pond fishes”, *Jerusalem, Keter Press*, pp.39-40.
- [6] Trần Ngọc Hùng, Trương Thị Thành Vinh (2014a), “Kết quả thử nghiệm dịch ép củ tỏi (*Allium sativum* L.) trong phòng trị bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* spp gây ra trên cá trắm cỏ (*Ctenopharyngodon idellus*)”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 238, tr.87-92.
- [7] Nguyễn Thanh Hải, Bùi Thị Tho (2013), “Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn in vitro của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với *E. coli* gây bệnh và *E. coli* kháng ampicillin, kanamycin”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11(6), tr.804-808.
- [8] Trần Ngọc Hùng, Trương Thị Thành Vinh (2014b), “Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại dung môi đến khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio vulnificus* và *Streptococcus* spp của dịch chiết một số loại thảo dược”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 248, tr.81-86.
- [9] Trương Thị Mỹ Hạnh (2008), “Nghiên cứu tính kháng khuẩn và kháng nấm của một số loại thảo mộc”, Báo cáo tổng kết đề tài khoa học.
- [10] Nguyễn Thị Thanh, Lê Thị Thương, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Công Cường (2012), “Thử nghiệm biện pháp trị bệnh lở loét do vi khuẩn *Streptococcus* spp trên cá trê lai bằng hỗn hợp dịch ép từ củ tỏi và lá húng”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 10, tr.51-55.

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 58 - Number 10 - October 2016

Nghiên cứu tổng hợp (S)-clopidogrel bisulfat từ DL-2-clorophenyl glycin.

Phan Thị Trang, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Văn Tài

Phân lập một số hợp chất taxoid trong phần đoạn cao methanol 100% từ lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Lâm Đồng.

Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Thị Trúc Phương, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Hứa Hoàng Oanh, Nguyễn Phương Dung

Điều chế và phân tích tính chất hệ phân tán nanoliposome paclitaxel.

Nguyễn Quang Trí, Nguyễn Lan Chi, Dương Chí Toàn, Trương Công Trị, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Lê Quan Nghiệm, Nguyễn Minh Đức

Các hợp chất alkaloid phân lập từ lá cây Thuốc thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban).

Nguyễn Trung Tường, Phạm Thanh Kỳ, Phan Văn Kiêm, Nguyễn Xuân Nhiệm

Nghiên cứu cải thiện đường kính và độ cứng lông thân các giống lúa nếp NK2, CK92 và CK2003.

Nguyễn Thị Thuở, Phan Thị Hồng Trang, Võ Công Thành, Lê Văn Hòa

Một số kết quả nghiên cứu về hội chứng chồi rồng hại nhãn tại Đồng Tháp.

Trịnh Xuân Hoat, Mai Văn Quân, Lê Văn Hào, Lê Đức Trung, Nguyễn Như Cường

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến năng suất và phẩm chất giống thanh long ruột tím hồng LD5.

Nguyễn Trịnh Nhật Hằng, Đoàn Thị Cẩm Hồng

Nghiên cứu công nghệ nhân giống cấp I và dịch thể nấm Địa sâm *Coprinus comatus* (Co).

Phạm Thị Thu, Cồ Thị Thùy Vân, Trần Thu Hà, Nguyễn Duy Trinh

Một số cây trội Sở chè (*Camellia sasanqua* Thunb.) có lượng hạt lớn và hàm lượng dầu cao ở Nghệ An.

Hoàng Văn Thắng, Nguyễn Toàn Thắng, Phạm Đình Sâm, Hoàng Thị Nhung, Phí Công Thường

Nghiên cứu chuyển gen Interleukin-2 của người vào cây ngô (*Zea mays* L.) phục vụ sản xuất vaccine thực phẩm điều trị bệnh ung thư.

Nguyễn Xuân Thắng, Nguyễn Chí Thành, Mariam Sticklen, Bùi Mạnh Cường

Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch dịch thể của thỏ với chủng porcine circovirus type 2 (PCV2) phân lập tại Việt Nam.

Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Văn Giáp, Lê Văn Phan, Cao Thị Bích Phương, Trịnh Đình Thâu

Bước đầu đánh giá mức độ phiên mã của một số gen liên quan tới đáp ứng miễn dịch của tôm đối với kháng nguyên VP28 của virus đốm trắng.

Đỗ Thị Hồng Thu, Đỗ Thị Hoàng Kim, Nhữ Văn Hùng, Trần Thị Mỹ, Nguyễn Thị Văn Anh, Phạm Thị Thu Hương

Khả năng kháng khuẩn của dịch ép một số loại thảo dược trị bệnh lở loét do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây ra trên cá lóc đen (*Channa striata* Bloch, 1793).

Nguyễn Đình Vinh, Trương Thị Thanh Vinh, Hồ Văn Hòa

1 A study on the synthesis of (S)-clopidogrel bisulfate from DL-2-chlorophenyl glycin.

Phan Thi Trang, Nguyen Thi Thu Trang, Nguyen Van Tai

6 Isolation of taxoids in 100% methanol extract from the needles of *Taxus wallichiana* Zucc. cultivated in Lam Dong province.

Nguyen Thi Nhai, Nguyen Thi Truc Phuong, Bui The Vinh, Tran Cong Luan, Hua Hoang Oanh, Nguyen Phuong Dung

11 Preparation and analysis of the properties of paclitaxel nanoliposomes.

Nguyen Quang Tri, Nguyen Lan Chi, Duong Chi Toan, Truong Cong Tri, Nguyen Thi Anh Nguyet, Le Quan Nghiem, Nguyen Minh Duc

16 Alkaloids isolated from the leaves of *Phaeanthus vietnamensis* Ban.

Nguyen Trung Tuong, Pham Thanh Ky, Phan Van Kiem, Nguyen Xuan Nhiem

20 Improving the internode diameter and breaking strength of glutinous rice genotypes as NK2, CK92 and CK2003.

Nguyen Thi Thuo, Phan Thi Hong Trang, Vo Cong Thanh, Le Van Hoa

25 Some study results of longan witches broom syndrome in Dong Thap.

Trinh Xuan Hoat, Mai Van Quan, La Van Hao, Le Duc Trung, Nguyen Nhu Cuong

30 The effect of plant regulators on the yield and fruit quality of LD5 pinkish purple flesh dragon fruit variety.

Nguyen Trinh Nhat Hang, Doan Thi Cam Hong

35 Investigation on propagation technology of master spawn and liquid spawn of shaggy ink cap (*Coprinus comatus* (Co)).

Pham Thi Thu, Co Thi Thuy Van, Tran Thu Ha, Nguyen Duy Trinh

40 Some plus trees of *Camellia sasanqua* Thunb. having high yield of seed and oil in Nghe An province.

Hoang Van Thang, Nguyen Toan Thang, Pham Dinh Sam, Hoang Thi Nhung, Phi Cong Thuong

43 Transplantation of recombinant human IL-2 in maize for production of edible vaccine against human cancer cells.

Nguyen Xuan Thang, Nguyen Chi Thanh, Mariam Sticklen, Bui Manh Cuong

48 Studying the humoral immune responses of rabbit to porcine circovirus type 2 (PCV2) isolated from pigs of Vietnam.

Huynh Thi My Le, Nguyen Van Giap, Le Van Phan, Cao Thi Bich Phuong, Trinh Dinh Thau

54 Evaluation on the transcription level of some genes related to the shrimp innate immune responses to the VP28 antigen of white spot syndrome virus.

Do Thi Hong Thu, Do Thi Hoang Kim, Nhu Van Hung, Tran Thi My, Nguyen Thi Van Anh, Pham Thi Thu Huong

60 Examining anti-bacterial effects of juices derived from medicinal herbs on *Aeromonas hydrophila* strain causing ulcer on snakeheads.

Nguyen Dinh Vinh, Truong Thi Thanh Vinh, Ho Van Hoa