



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 59 - Số 2 - Tháng 2 năm 2017

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

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

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

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

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN

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

EDITORIAL OFFICE

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

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

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

PUBLICATION LICENCE

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

Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh trên cây cao su

Trần Hồng Anh^{1*}, Võ Đình Quang¹, Nguyễn Thị Liên¹, Lương Thị Thu Hằng²

¹Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Tp Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

Ngày nhận bài 10/6/2016, ngày chuyển phản biện 13/6/2016, ngày nhận phản biện 29/7/2016, ngày chấp nhận đăng 1/8/2016

Cao su (*Havea brasiliensis* Muell.Arg.) là một trong những cây công nghiệp quan trọng của Việt Nam. Tuy nhiên, việc phát triển và tăng diện tích cây cao su đang gặp những khó khăn, trong đó khó nhất là phòng và trị bệnh cho cây. Trong số các bệnh thường gặp thì bệnh nấm hồng do nấm *Corticium salmonicolor* gây ra là một bệnh phổ biến. Trong nghiên cứu này, từ 20 mẫu đất vườn cao su và đất tự nhiên đã phân lập được 65 chủng nấm mốc và 288 chủng xạ khuẩn. Khả năng đối kháng của 65 chủng nấm mốc đối với sự phát triển của nấm hồng biến động rất lớn theo thời gian, trong đó 2 chủng PT15G9 và CT14G1 đối kháng 100% với nấm hồng chỉ sau 7 ngày nuôi cấy và chủng PC4G8 đối kháng 76% với nấm hồng sau 28 ngày nuôi cấy. Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc trên thạch, quan sát đặc điểm vi học; dựa vào khóa phân loại của Robert A. Samson (1984) và của Bergey (1994) có thể xác định chủng PC4G8 là nấm *Aspergillus* sp., chủng CT14G1 là nấm *Trichoderma* sp., chủng PC15G9 là xạ khuẩn *Kibdelosporangium* sp. Việc kết hợp cả 3 chủng này đã ức chế mạnh nhất sự phát triển của nấm hồng trên đoạn cắt thân cao su.

Từ khóa: cao su, *corticium salmonicolor*, nấm hồng, phân lập, ức chế.

Chỉ số phân loại 4.1

Đặt vấn đề

Cao su (*Havea brasiliensis* Muell.Arg.) là một trong những cây công nghiệp dài ngày cung cấp mủ và gỗ cho rất nhiều ngành công nghiệp. Đây cũng là cây có giá trị kinh tế cao trong lĩnh vực nông - lâm nghiệp. Hiện nay, cây cao su đang được mở rộng diện tích và với việc áp dụng khoa học kỹ thuật nên cho sản lượng khá cao, đóng góp vào sự phát triển của nền kinh tế. Tuy nhiên, việc phát triển và tăng diện tích cây cao su đang gặp những vấn đề khó khăn, trong đó khó nhất là phòng và trị bệnh cho cây. Trong số các bệnh thường gặp trên cao su tại Việt Nam thì bệnh nấm hồng do nấm *Corticium salmonicolor* gây ra là một bệnh phổ biến, nhất là ở khu vực Đông Nam Bộ và rìa phía Nam của Tây Nguyên [1].

Để trị bệnh nấm hồng, thuốc hóa học như Validamycine (Validacin 5L, Vanicide 5SL...), hexaconazole (Alvin 5SC, Callihex 50SC...) phối hợp với chất bám dính tỏ ra có hiệu quả [2]. Tuy nhiên, sử dụng thuốc hóa học để trị bệnh cho cây cao su trong thời kỳ kinh doanh không dễ dàng và tốn nhiều chi phí, phụ thuộc vào chiều cao của cây và diện tích trồng.

Hơn nữa, việc sử dụng thuốc hóa học về lâu dài sẽ ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật đối kháng và côn trùng có ích khác, từ đó sẽ ảnh hưởng tới môi trường sinh thái. Khác với thuốc hóa học, chế phẩm sinh học có các ưu điểm như không gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người, không gây ô nhiễm môi trường, có khả năng phân hủy, chuyển hóa các chất hữu cơ, phế thải, góp phần làm sạch môi trường mà lại có tác dụng tiêu diệt nấm bệnh gây hại nên các nhà khoa học trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng đều đang tập trung nghiên cứu. Chính vì lý do đó, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu “Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh trên cây cao su”.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu phân lập nấm đối kháng: các chủng nấm mốc hiệu khí được phân lập từ các nguồn mẫu đất:

- 11 mẫu đất vườn cao su ở huyện Thuận An, thị xã Thủ Dầu 1, huyện Bến Cát và huyện Dầu Tiếng, tỉnh Bình Dương.

*Tác giả liên hệ: Tel: 0989369665; Email: saomai6@yahoo.com

Isolation and selection of some fungi inhibiting *Corticium salmonicolor* which causes pink diseases on rubber trees

Summary

Rubber (*Havea brasiliensis* Muell.Arg.) is one of the most important industrial plants of Vietnam. However, the expansion of rubber plantation in Vietnam is difficult because of diseases on rubber trees. Pink disease, caused by *Corticium salmonicolor*, is a common disease on rubber. From 20 soil samples collected in rubber plantation and natural areas, 65 fungi and 288 actinomycetes were isolated. The antagonistic ability with *Corticium salmonicolor* of 65 fungi varied greatly according to the follow-up period. Among the isolated ones, CT14G1 and PT15G9 were antagonistic 100% with *Corticium salmonicolor* after 7 days of culture, and PC4G8 was antagonistic 78% with *Corticium salmonicolor* after 28 days of culture. Based on the characteristics of colonies and characteristics under microscope; based on classifications of Robert A. Samson (1984) and Bergey's Manual of Determinative bacteriology-9 (1994), PC4G8 is *Aspergillus* sp.; CT14G1 is *Trichoderma* sp.; and PC15G9 is *Kibdelosporangium* sp. (actinomycetes). The combination of PT15G9 + CT14G1 + PC4G8 inhibited strongest the growth of *Corticium salmonicolor* on cutting branch of rubber trees.

Keywords: *corticium salmonicolor*, fungi, inhibition, isolated, pink disease.

Classification number 4.1

- 9 mẫu đất tự nhiên ở các tỉnh Bình Dương, Bình Thuận, Ninh Thuận, Lâm Đồng và Tp Hồ Chí Minh.

Nấm hồng gây bệnh hại cao su: được phân lập và làm thuần từ giống cao su RRIV4 (ký hiệu là RRIV4) do Viện Nghiên cứu cao su Việt Nam cung cấp.

Thân cao su để thử tính đối kháng: đoạn thân cao su thu thập trên cây cao su giống RRIV4 từ vườn cao su 5 năm tuổi của ông Lý Văn Xây, ấp Bến Mương, xã An Nhơn Tây, Củ Chi, Tp Hồ Chí Minh.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng nấm đối kháng: sử dụng phương pháp pha loãng [3, 4]. Phân lập và làm thuần các giống vi sinh vật trong mẫu đất trên đĩa petri chứa các môi trường Czapek-Dox và PGA. Bảo quản các chủng thuần này theo phương pháp thạch nghiêng.

Khảo sát sơ bộ khả năng ức chế sự phát triển nấm hồng của các chủng nấm thu thập được: trên đường kính của thạch đĩa chứa môi trường PDA: cấy điểm nấm bệnh *Corticium salmonicolor* cách mép đĩa 3 cm, sau đó cấy điểm nấm đối kháng với khoảng cách giữa hai điểm cấy là 3 cm, ủ ở nhiệt độ 30°C [5]. Đĩa đối chứng là đĩa chỉ cấy nấm bệnh *Corticium salmonicolor*.

Tính đối kháng với nấm *Corticium salmonicolor* (I) được xác định theo công thức:

$$I = 100 - (100 R2/R1)$$

Trong đó: R1 là đường kính khuẩn lạc *Corticium salmonicolor* trong đĩa đối chứng; R2 là đường kính khuẩn lạc *Corticium salmonicolor* trong đĩa cấy chủng nấm đối kháng.

Định danh và xác định đặc tính sinh học của các chủng có khả năng ức chế sự phát triển của nấm hồng: dựa theo khóa phân loại của Robert A. Samson (1984) và của Bergey (1994).

Khảo sát hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn với chủng nấm bệnh Corticium salmonicolor trên đoạn cắt thân cây cao su con trong phòng thí nghiệm: thân cao su được khử trùng và tạo vết thương kích thước 1 mm² ở giữa đoạn thân bằng kim tiêm vô trùng, lấy tơ nấm hồng cấy trên vết thương. 3 chủng vi sinh vật có kết quả đối kháng mạnh nhất được nuôi cấy trên môi trường PGA và thu nhận bào tử sau 7 ngày. Nhúng thân cao su đã gây nhiễm nấm hồng vào dung dịch chứa bào tử các chủng đối kháng hoặc nước cất trong 30 phút. Sau đó đặt thân cao su vào đĩa petri chứa giấy thấm đã được thấm ướt bằng nước cất khử trùng, nuôi ở nhiệt độ 30°C. Bổ sung 1 ml nước

cất vào mỗi đĩa sau 2 ngày nuôi cấy để duy trì độ ẩm. Sau 2-9 ngày, tiến hành đo đường kính nấm hồng phát triển trên thân.

Xử lý số liệu

Các số liệu ghi nhận được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (One way anova) và phép thử Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 0,05 (xử lý thống kê bằng phần mềm Statistical Program Scientific System - SPSS phiên bản 11.5 dành cho Window). Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$ của các giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau kèm theo sau số trung bình và sai số chuẩn.

Kết quả và thảo luận

Phân lập các chủng nấm đối kháng

Để có thể phân lập các chủng nấm có khả năng đối kháng với nấm hồng, môi trường đất vườn cao su vùng Đông Nam Bộ và một số môi trường đất tự nhiên thuộc vùng Đông Nam Bộ và Nam Trung Bộ đã được sử dụng. Các mẫu đất được pha loãng và được cấy trên môi trường PGA và Czapek-Dox để phân lập các chủng vi sinh vật. Các vi sinh vật phân lập được sau khi quan sát khuẩn lạc thuần chủng sau 8 ngày nuôi cấy được tạm phân chia như sau:

- Các vi sinh vật được gọi là nấm khi khuẩn lạc gồm một khối những sợi đan xen với nhau khi quan sát bằng mắt thường [6].

- Các vi sinh vật được gọi là xạ khuẩn khi có khuẩn lạc khô và đa số có dạng hình phóng xạ [7].

Sau khi phân lập và làm thuần các chủng vi sinh trên môi trường PGA và môi trường Czapek-Dox, số lượng nấm và xạ khuẩn thu được của từng mẫu đất được thống kê trong bảng 1.

Bảng 1 cho thấy, đối với 11 mẫu đất vườn cao su, cả hai môi trường PGA và Czapek-Dox đều có nấm mốc và xạ khuẩn phát triển, trong đó môi trường PGA có số lượng nấm mốc phát triển nhiều hơn môi trường Czapek-Dox (23 chủng so với 14 chủng), nhưng số lượng xạ khuẩn phân lập được trên môi trường PGA lại thấp hơn môi trường Czapek-Dox (52 chủng so với 61 chủng). Số lượng xạ khuẩn phân lập được từ 11 mẫu đất vườn cao su cũng lớn hơn gấp 3 lần so với số lượng nấm mốc phân lập được (113 chủng so với 37 chủng). Như vậy, trong đất vườn cao su vùng Đông Nam Bộ, xạ khuẩn chiếm ưu thế hơn so với nấm mốc.

Bảng 1: số lượng các chủng nấm mốc và xạ khuẩn phân lập được trên môi trường PGA và Czapek-Dox

Ký hiệu mẫu đất	Môi trường PGA		Môi trường Czapek-Dox	
	Số chủng nấm mốc (chủng)	Số chủng xạ khuẩn (chủng)	Số chủng nấm mốc (chủng)	Số chủng xạ khuẩn (chủng)
Mẫu đất vườn cao su				
C1	0	6	0	4
C2	4	1	2	8
C3	3	7	4	6
C4	3	9	0	9
C5	3	1	0	2
C6	3	10	2	6
C7	4	1	3	8
C8	0	5	0	3
C9	0	3	0	5
C10	1	3	0	3
C11	2	6	3	7
Tổng	23	52	14	61
Mẫu đất tự nhiên				
T12	3	7	0	11
T13	2	9	0	16
T14	3	12	1	9
T15	2	7	1	8
T16	3	9	2	10
T17	0	11	0	16
T18	0	7	1	13
T19	0	8	1	11
T20	6	3	2	8
Tổng	19	73	9	102

Tương tự như từ đất vườn cao su, từ đất tự nhiên khi phân lập trên hai môi trường PGA và Czapek-Dox đều có nấm mốc và xạ khuẩn phát triển, trong đó môi trường PGA có số lượng nấm mốc phát triển nhiều hơn môi trường Czapek-Dox (19 chủng so với 9 chủng) và số lượng xạ khuẩn phân lập được trên môi trường PGA thấp hơn môi trường Czapek-Dox (73 chủng so với 102 chủng). So với từ đất vườn cao su, số lượng nấm mốc phân lập được từ đất tự nhiên ít hơn (28 chủng so với 37 chủng) nhưng số lượng xạ khuẩn phân lập được từ đất tự nhiên nhiều hơn gần gấp 2 lần (175 chủng so với 113 chủng). Từ 9 mẫu đất tự nhiên khi phân lập trên 2 môi trường, số lượng xạ khuẩn phân lập được (175 chủng) lớn hơn gấp 6 lần so với số lượng nấm mốc phân lập được (28 chủng).

Như vậy, tương tự như trong đất vườn cao su vùng Đông Nam Bộ, xạ khuẩn ở đất tự nhiên vùng Đông

Nam Bộ và Nam Trung Bộ cũng chiếm ưu thế hơn so với nấm mốc. Từ 11 mẫu đất vườn cao su, trên môi trường PGA đã phân lập được tổng cộng 23 chủng nấm và trên môi trường Czapek-Dox đã phân lập được 14 chủng nấm. Từ 9 mẫu đất tự nhiên, trên môi trường PGA đã phân lập được tổng cộng 19 chủng nấm và trên môi trường Czapek-Dox đã phân lập được 9 chủng nấm. Các chủng nấm này được sử dụng để thử tính đối kháng với nấm hồng trên môi trường thạch đĩa PDA để lựa chọn chủng có khả năng đối kháng mạnh với nấm hồng.

Khảo sát sơ bộ khả năng ức chế sự phát triển nấm hồng của các chủng nấm thu thập được

Các nấm phân lập được được phân làm 4 nhóm để khảo sát sơ bộ khả năng ức chế sự phát triển của nấm hồng:

Nhóm 1: nấm phân lập từ đất vườn cao su trên môi trường PGA, ký hiệu là PCiGj, trong đó i để chỉ thứ tự mẫu đất vườn cao su, biến thiên từ 1 đến 11 và j để chỉ số thứ tự của nấm phân lập được trên môi trường PGA.

Nhóm 2: nấm phân lập từ đất vườn cao su trên môi trường Czapek-Dox, ký hiệu là CCiGj, trong đó i để chỉ thứ tự mẫu đất vườn cao su, biến thiên từ 1 đến 11 và j để chỉ số thứ tự của nấm phân lập được trên môi trường Czapek-Dox.

Nhóm 3: nấm phân lập từ đất tự nhiên trên môi trường PGA, ký hiệu là PTmGn, trong đó m để chỉ thứ tự mẫu đất tự nhiên, biến thiên từ 12 đến 20 và n để chỉ số thứ tự của nấm phân lập được trên môi trường PGA.

Nhóm 4: nấm phân lập từ đất tự nhiên trên môi trường Czapek-Dox, ký hiệu là CTmGn, trong đó m để chỉ thứ tự mẫu đất tự nhiên, biến thiên từ 12 đến 20 và n để chỉ số thứ tự của nấm phân lập được trên môi trường Czapek-Dox.

Tỷ lệ đối kháng của các nấm phân lập được đối với nấm hồng sau 7 ngày được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, sau 7 ngày cấy đối kháng, hầu hết các nấm phân lập được từ đất vườn cao su trên môi trường PGA đều có khả năng đối kháng với nấm hồng, nhưng tỷ lệ đối kháng của các chủng khác nhau là rất khác nhau. Tỷ lệ đối kháng sau 7 ngày cấy biến động từ 4,38 đến 48,72%, trong đó chủng PC6G4 và PC4G8 đã đối kháng với nấm hồng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nấm khác, đạt tỷ lệ đối kháng 42,8 và 48,7% tương ứng sau 7 ngày.

Bảng 2: tỷ lệ đối kháng của các nấm phân lập đối với nấm hồng sau 7 ngày

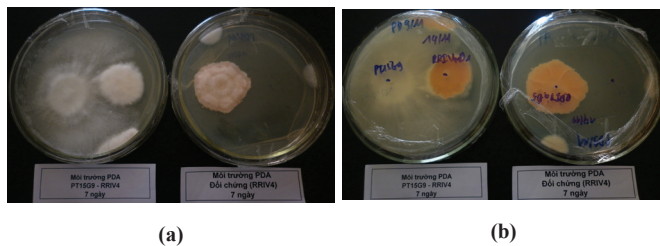
Nhóm 1	TL đối kháng	Nhóm 2	TL đối kháng	Nhóm 3	TL đối kháng	Nhóm 4	TL đối kháng
PC2G1	9,69±1,41 ab	CC2G1	31,74±1,97 de	PT12G1	41,64±3,83 h	CT14G1	100±0,00 e
PC2G2	18,19±3,83 cd	CC2G3	15,81±1,14 bc	PT12G5	7,80±0,82 bc	CT15G1	34,50±4,2 c
PC2G4	9,96±3,22 ab	CC3G1	32,12±1,65 de	PT12G10	28,73±0,30 g	CT16G1	4,80±0,82 a
PC2G5	4,38±1,59 a	CC3G2	19,39±0,53 c	PT13G1	18,95±0,78 ef	CT16G2	17,11±4,40 b
PC3G1	32,81±2,10 fg	CC3G8	8,23±1,65 a	PT13G7	0,80±0,08 a	CT18G6	47,85±2,82 d
PC3G2	18,14±0,99 cd	CC3G9	18,09±1,97 c	PT14G6	9,38±2,84 bc	CT19G1	18,82±1,49 b
PC3G5	15,54±0,92 bc	CC6G1	14,68±1,97 bc	PT14G7	7,33±0,47 b	CT20G6	32,20±1,98 c
PC4G1	9,43±0,70 ab	CC6G2	25,86±1,69 d	PT14G10	8,75±1,89 bc	CT20G10	13,50±2,81 b
PC4G8	48,72±3,56 i	CC7G1	31,31±0,92 de	PT15G1	11,11±1,89 bcd	CT20G11	14,45±3,40 b
PC4G11	16,60±1,92 bc	CC7G3	32,11±5,07 de	PT15G9	100±0,00 i		
PC5G1	21,10±0,99 cde	CC7G6	31,69±0,95 de	PT16G1	8,54±2,00 bc		
PC5G2	16,60±1,41 bc	CC11G1	9,96±1,93 ab	PT16G2	28,35±1,27 g		
PC5G3	15,01±0,53 bc	CC11G5	37,70±0,92 e	PT16G6	17,61±2,18 ef		
PC6G1	26,87±0,63 ef	CC11G9	14,45±0,89 bc	PT20G1	21,03±0,48 f		
PC6G4	42,80±4,30 hi			PT20G2	21,30±0,25 f		
PC6G5	7,33±0,47 a			PT20G3	16,52±0,32 def		
PC7G2	26,56±1,67 ef			PT20G4	19,23±2,27 ef		
PC7G3	22,77±1,14 cde			PT20G8	13,45±2,73 bode		
PC7G4	24,82±4,29 de			PT20G9	13,92±4,01 cde		
PC7G6	39,53±5,25 gh						
PC10G1	15,52±0,63 bc						
PC11G1	39,96±1,59 gh						
PC11G2	20,87±2,69 cde						

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Tương tự như những nấm phân lập được từ vườn cao su trên môi trường PGA, sau 7 ngày cấy đối kháng, hầu hết các nấm phân lập được từ đất vườn cao su trên môi trường Czapek-Dox đều có khả năng đối kháng với nấm hồng và tỷ lệ đối kháng của các chủng khác nhau là rất khác nhau. Tỷ lệ đối kháng sau 7 ngày cấy biến động từ 8,23 đến 37,70%, trong đó các chủng CC3G1, CC7G6 và CC11G5 đối kháng với nấm hồng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nấm phân lập được từ vườn cao su trên môi trường Czapek-Dox, đạt tỷ lệ đối kháng tương ứng là 32,1%, 31,7% và 37,7%. Tỷ lệ đối kháng này là thấp hơn so với chủng PC6G4 và PC4G8 phân lập được từ đất vườn cao su trên môi trường PGA.

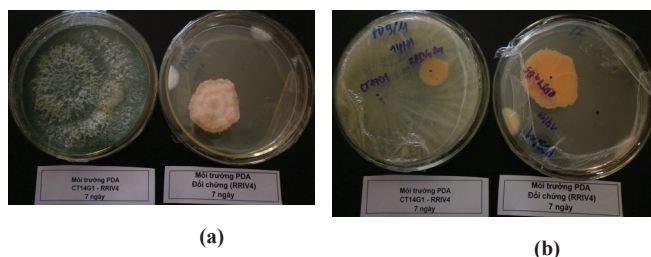
Bảng 2 cũng thể hiện hầu hết các nấm phân lập được từ đất tự nhiên trên môi trường PGA đều có khả năng đối kháng với nấm hồng sau 7 ngày và tỷ lệ đối kháng của các chủng khác nhau cũng rất khác nhau, biến động từ 0,80% đến 100,00%, trong đó chủng PT15G9 đối kháng 100% với nấm hồng và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nấm phân lập được từ

đất tự nhiên trên môi trường PGA khác. Tơ của chủng PT15G9 đã tấn công và mọc đè lên tơ của nấm hồng chỉ sau 7 ngày cấy đối kháng (hình 1).



Hình 1: chủng PT15G9 đối kháng với nấm hồng trên môi trường PDA sau 7 ngày
(a) mặt trước (b) mặt sau

Tương tự như những nấm phân lập được từ đất tự nhiên trên môi trường PGA, sau 7 ngày cấy đối kháng, hầu hết các nấm phân lập được từ đất tự nhiên trên môi trường Czapek-Dox đều có khả năng đối kháng với nấm hồng với tỷ lệ đối kháng biến động từ 4,80 đến 100,00%, trong đó chủng CT14G1 đối kháng 100% với nấm hồng và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nấm phân lập được từ đất tự nhiên trên môi trường Czapek-Dox khác. Tơ của chủng CT14G1 cũng đã tấn công và mọc đè lên tơ của nấm hồng chỉ sau 7 ngày cấy đối kháng tương tự như chủng PT15G9 (hình 2).



Hình 2: chủng CT14G1 đối kháng với nấm hồng trên môi trường PDA sau 7 ngày
(a) mặt trước (b) mặt sau

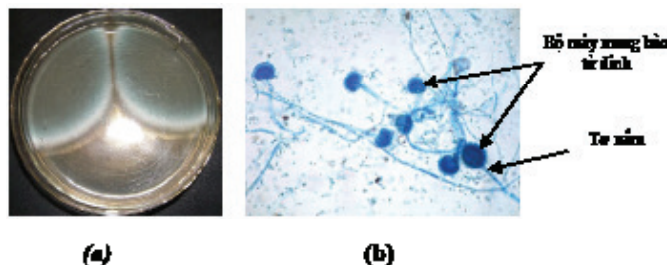
Định danh và xác định đặc tính sinh học của các chủng có khả năng ức chế sự phát triển của nấm hồng

Định danh chủng PC4G8:

Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch: PC4G8 mọc sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA. PC4G8 có màu xanh lục đậm khi phát sinh bào tử, tơ nấm trắng ở rìa khuẩn lạc. Dạng mặt khuẩn lạc mịn, không có khía. Mép khuẩn lạc mỏng, không có giọt tiết. Khuẩn lạc không mùi và không có sắc tố hòa tan (hình 3a).

Quan sát đặc điểm vi học: sau khi nhuộm và quan sát tơ nấm và bào tử dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 và x100, PC4G8 có các đặc điểm: sợi nấm có vách ngăn ngang, khuẩn ty hình thành một cộng mang bào tử và bào tử đính với cộng mang túi bào tử không

vách ngăn và không xuất phát từ tế bào chân, túi hay bong là tế bào đa nhân và phát triển bề mặt gắn liền với các thể bình, thể bình bậc 1, mỗi thể bình là cấu trúc đa nhân và trên đầu thể bình tạo thành một chuỗi bào tử đính, những bào tử non ở trong và càng xa càng già. Bào tử đính có hình tròn, không có túi bao bọc, giá sinh bào tử trần với đỉnh phồng to (hình 3b).



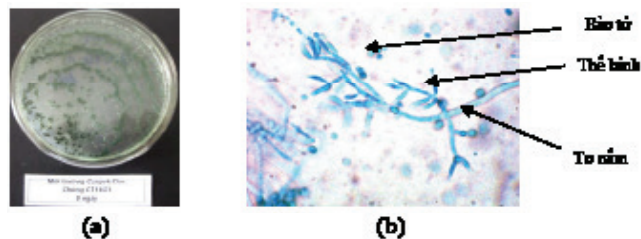
Hình 3: (a) khuẩn lạc và (b) đặc điểm vi học của chủng PC4G8 ở vật kính x40

Như vậy, dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào khóa phân loại của Robert A. Samson (1984) có thể phân loại chủng PC4G8 như sau: giới: Fungi; ngành: Ascomycota; lớp: Eurotiomycetes; bộ: Eurotiales; họ: Trichocomaceae; giống: *Aspergillus*.

Định danh chủng CT14G1:

Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch: CT14G1 mọc sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường Czapek-Dox có màu xanh lục đậm khi phát sinh bào tử, tơ nấm trắng ở rìa khuẩn lạc. Khuẩn lạc gồm những vòng tròn đồng tâm, dạng mặt khuẩn lạc gồ ghề, không có khía, mép khuẩn lạc mỏng, không có giọt tiết. Khuẩn lạc không mùi và không có sắc tố hòa tan (hình 4a).

Quan sát đặc điểm vi học: sau khi nhuộm và quan sát tơ nấm và bào tử dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 và x100, CT14G1 có các đặc điểm: sợi nấm không có vách ngăn ngang. Giá sinh bào tử trần, không có đỉnh phồng to. Tế bào sinh bào tử trần hình bình, thể bình cổ ngắn, thể bình rõ rệt. Bào tử đính hình thành từ những cụm trên những cuống bào tử đính, bào tử đính có hình tròn, không có túi bao bọc (hình 4b).



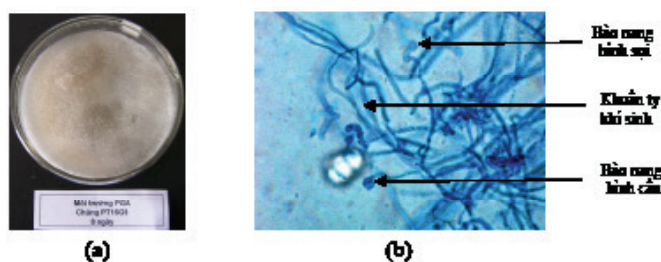
Hình 4: (a) khuẩn lạc và (b) đặc điểm vi học của chủng CT14G1 ở vật kính x40

Như vậy, dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào khóa phân loại của Robert A. Samson (1984) có thể phân loại chủng CT14G1 như sau: giới: Fungi; ngành: Ascomycota; lớp: Eurotiomycetes; bộ: Eurotiales; họ: Trichocomaceae; giống: *Trichoderma*.

Định danh chủng PT15G9:

Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch: PT15G9 mọc sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA có màu trắng, dạng mặt khuẩn lạc mịn, không có khía, mép khuẩn lạc mỏng, không có giọt tiết. Khuẩn lạc không mùi và không có sắc tố hòa tan (hình 5a).

Quan sát đặc điểm vi học: sau khi nhuộm và quan sát tở nấm và bào tử dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 và x100, PT15G9 có các đặc điểm: sợi khuẩn ty khí sinh không có vách ngăn ngang, bào tử nằm trong bào nang (nang bào tử, bào tử kín). Có 2 dạng bào nang cùng tồn tại: bào nang hình sợi và bào nang hình cầu (hình 5b).



Hình 5: (a) khuẩn lạc và (b) đặc điểm vi học của chủng PT15G9 ở vật kính x100

Như vậy, dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào khóa phân loại của Bergey (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9) có thể phân loại chủng PT15G9 như sau: giới: Bacteria; ngành: Actinobacteria; lớp: Actinobacteria; bộ: Actinomycetales; họ: Pseudonocardiaceae; giống: *Kibdelosporangium*.

Khảo sát hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn với chủng nấm bệnh *Corticium salmonicolor* trên đoạn cắt thân cây cao su con trong phòng thí nghiệm

Khả năng ức chế nấm hồng của 3 vi sinh vật tuyển chọn trên đoạn cắt cao su trong phòng thí nghiệm được thể hiện qua chiều dài vết nấm bệnh trên thân cao su theo thời gian. Chiều dài vết nấm bệnh sau khi xử lý các vi sinh vật càng ngắn thì khả năng đối kháng của

các vi sinh vật đối với nấm hồng càng cao. Sau khi gây nhiễm nấm bệnh trên thân cao su và xử lý hỗn hợp các vi sinh vật có khả năng đối kháng mạnh với nấm hồng, chiều dài vết nấm bệnh được theo dõi theo thời gian và được thể hiện qua bảng 3.

Bảng 3: chiều dài vết nấm bệnh (mm) theo thời gian

Công thức	Chiều dài vết nấm bệnh (mm) theo thời gian			
	Sau 2 ngày	Sau 4 ngày	Sau 7 ngày	Sau 9 ngày
Đối chứng - không nhúng nước	5,67±0,67 b	7,67±0,88 c	10,33±2,19 b	17,00±0,58 c
Đối chứng - nhúng nước	6,00±0,58 b	6,67±0,88 bc	9,86±2,18 b	16,67±1,76 c
Nhúng hỗn hợp PT15G9 + CT14G1	2,67±0,67 a	6,67±0,67 bc	10,83±1,92 b	12,00±2,08 b
Nhúng hỗn hợp PT15G9 + PC4G8	2,67±0,33 a	5,00±0,58 ab	6,33±0,67 ab	2,67±0,33 a
Nhúng hỗn hợp CT14G1 + PC4G8	5,33±0,88 b	6,67±0,33 b	9,80±1,56 b	10,60±1,40 b
Nhúng hỗn hợp PT15G9 + CT14G1 + PC4G8	2,00±0,58 a	3,33±0,88 a	1,33±0,33 a	2,33±0,33 a

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Bảng 3 cho thấy, chỉ sau 2 ngày, chiều dài vết nấm hồng trên thân cao su có xử lý các vi sinh vật đối kháng với nấm hồng đã ngắn hơn có ý nghĩa thống kê so với các công thức đối chứng không xử lý.

Hai công thức đối chứng không nhúng nước hoặc nhúng nước cho chiều dài vết nấm hồng trên thân cao su không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Các công thức xử lý hỗn hợp các vi sinh vật đối kháng với nấm hồng thì khác biệt có ý nghĩa thống kê với các công thức đối chứng ở tất cả các thời điểm theo dõi.

Khi kết hợp mỗi 2 vi sinh vật đối kháng với nhau, hỗn hợp CT14G1 + PC4G8 tỏ ra chưa hiệu quả sau 2 ngày xử lý, tuy nhiên, sau 4 ngày xử lý thì công thức này cũng ức chế sự phát triển của nấm hồng trên thân cao su có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Trong các công thức xử lý vi sinh vật đối kháng thì việc kết hợp cả 3 chủng vi sinh tỏ ra là có hiệu quả đối kháng với nấm hồng mạnh nhất ở các thời điểm theo dõi, chiều dài vết nấm hồng gây bệnh của công thức này chỉ 2 mm sau 2 ngày so với 5,7-6 mm sau 2 ngày ở công thức đối chứng và chỉ 2,33 mm so với 16,67-17 mm sau 9 ngày ở công thức đối chứng.



Hình 6: nấm hồng phát triển trên thân cao su khi xử lý hoặc không xử lý hỗn hợp PT15G9 + CT14G1 + PC4G8: (a) sau 2 ngày, (b) sau 9 ngày

Kết luận

Từ 11 mẫu đất vườn cao su vùng Đông Nam Bộ phân lập trên môi trường PGA được 23 chủng nấm mốc, 52 chủng xạ khuẩn; trên môi trường Czapek-Dox được 14 chủng nấm mốc, 61 chủng xạ khuẩn. Từ 9 mẫu đất tự nhiên vùng Đông Nam Bộ và Nam Trung Bộ phân lập trên môi trường PGA được 19 chủng nấm mốc, 73 chủng xạ khuẩn; trên môi trường Czapek-Dox được 9 chủng nấm mốc, 102 chủng xạ khuẩn. Tỷ lệ đối kháng của các chủng khác nhau biến động rất lớn tùy theo từng chủng. Sau 7 ngày, tỷ lệ đối kháng của các chủng phân lập được đối với nấm hồng từ 0,80 đến 100%.

Các chủng nấm có khả năng đối kháng cao với nấm hồng gồm các chủng PC4G8, PC6G4, CC3G1, CC11G5, PT15G9 và CT14G1. Chủng CT14G1 và PT15G9 có khả năng đối kháng với nấm hồng đạt tỷ lệ 100% sau 7 ngày cấy đối kháng. Trong các chủng còn lại thì chủng PC4G8 có khả năng đối kháng với nấm hồng cao nhất, tỷ lệ đối kháng đạt 48,72% sau 7 ngày. Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc trên thạch và đặc điểm vi học; dựa vào khóa phân loại của Robert A. Samson

(1984) và khóa phân loại của Bergey (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9) có thể xác định 3 chủng có khả năng đối kháng mạnh với nấm hồng: chủng PC4G8 là nấm *Aspergillus* sp.; chủng CT14G1 là nấm *Trichoderma* sp. và chủng PC15G9 là xạ khuẩn *Kibdelosporangium* sp.

Việc kết hợp cả 3 chủng vi sinh PT15G9 + CT14G1 + PC4G8 đã ức chế mạnh nhất sự phát triển của nấm hồng: chiều dài vết nấm hồng gây bệnh của công thức xử lý hỗn hợp bào tử của ba chủng PT15G9 + CT14G1 + PC4G8 chỉ 2 mm sau 2 ngày so với 5,7-6 mm sau 2 ngày ở công thức đối chứng và chỉ 2,33 mm so với 16,67-17 mm sau 9 ngày ở công thức đối chứng.

Tài liệu tham khảo

- [1] Phan Thành Dũng (2006), "Tình hình bệnh cây cao su tại Việt Nam, hiện trạng và hướng khắc phục", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **tập 1+2**, tr.50-52.
- [2] Phan Thành Dũng, Trần Anh Pha, Nguyễn Thái Hoan, Mai Văn Sơn (2005), "Sử dụng chất bám dính BDNH 2000 phối hợp với thuốc trừ nấm trị bệnh nấm hồng cho cây cao su", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **tập 1**, tr.73-75.
- [3] Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty (1972), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [4] Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [5] A.S. Ahmed, C.P. Sanchez, C. Egea, M.E. Candela (1999), "Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants", *Plant Pathology*, **48**, pp.58-65.
- [6] Bùi Tấn Anh, Võ Văn Bé, Phạm Thị Nga, *Nấm mốc, nấm nhầy và địa y*, <http://vietsciences1.free.fr/vietscience/giaokhoa/biology/virologie/nammocnamnhaydiay.htm>
- [7] Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Kim Nữ Thảo, *Các nhóm vi khuẩn chủ yếu - Phân loại xạ khuẩn*, <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/phanloaixakhuan01.htm>

Nghiên cứu tác nhân gây bệnh thối quả chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) sau thu hoạch ở Đồng bằng sông Cửu Long

Thạch Thị Ngọc Yến^{1*}, Nguyễn Văn Thành¹, Nguyễn Văn Phong²

¹Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Cây ăn quả miền Nam

Ngày nhận bài 20/6/2016, ngày chuyển phản biện 24/6/2016, ngày nhận phản biện 18/7/2016, ngày chấp nhận đăng 26/7/2016

Thối quả là một trong những vấn đề nghiêm trọng gây nên những tổn thất đáng kể sau thu hoạch đối với chôm chôm. Với mục đích hỗ trợ cho việc tìm ra các giải pháp kiểm soát bệnh sau thu hoạch trên chôm chôm một cách hiệu quả, đề tài “Nghiên cứu tác nhân gây bệnh sau thu hoạch trên quả chôm chôm ở Đồng bằng sông Cửu Long” đã được thực hiện. Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập, định danh và đánh giá điều kiện môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm được phân lập. Kết quả cho thấy, có 7 chủng nấm được phân lập và định danh gồm: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Phomopsis mali*, *Lasmenia* sp., *Gliocephalotrichum cylindrosporum*, *Pestalotiopsis virgatula voucher*, *Pestalotiopsis clavispora* và *Fusarium verticillioides* là tác nhân gây nên bệnh thối quả sau thu hoạch ở chôm chôm, trong đó hai chủng *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Phomopsis mali* là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng nhất. Triệu chứng biểu hiện đặc trưng trên quả chôm chôm sau thu hoạch là thối lan mờ và thối đen, có thể nhận dạng và nhìn thấy bằng mắt thường. Nhìn chung, tất cả các chủng nấm này đều phát triển tốt trên 3 môi trường nuôi cấy PDA (potato dextrose agar), PCA (plate count agar) và MEA (malt extract agar) ở khoảng nhiệt độ tối thiểu 25-30°C và pH 6-8. Trong tất cả các nấm được phân lập, chủng *Lasiodiplodia pseudotheobromae* có khoảng nhiệt độ sinh trưởng rộng (15-35°C) và nấm *Pestalotiopsis virgatula voucher* có thể phát triển ở nhiệt độ tương đối cao (45°C).

Từ khóa: chôm chôm, *fusarium verticillioides*, *gliocephalotrichum cylindrosporum*, *lasiodiplodia pseudotheobromae*, *pestalotiopsis clavispora*, *pestalotiopsis virgatula voucher*, *phomopsis mali*.

Chỉ số phân loại 4.1

Đặt vấn đề

Chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) là loại cây ăn quả ở vùng nhiệt đới có nguồn gốc từ quần đảo Malaysia và được trồng phổ biến ở Thái Lan, Myanma, Sri Lanka, Ấn Độ, Việt Nam, Philippines, Indonesia... Trong số các loại cây ăn quả nhiệt đới, chôm chôm được xếp vào loại cây ăn quả được ưa chuộng. Ở Việt Nam, chôm chôm được trồng tập trung ở một số tỉnh phía Nam với tổng diện tích 24.613 ha và sản lượng khoảng 311.905 tấn [1]. Tuy nhiên, việc tiêu thụ chôm chôm tươi gặp nhiều khó khăn do chôm chôm sau thu hoạch bị hư hỏng rất nhanh. Cùng với việc hóa nâu vỏ trái nhanh, bệnh thối là một vấn đề nghiêm trọng đối với chôm chôm và được xem như là một trong những nguyên nhân chính gây nên sự thất thoát cao sau thu hoạch.

Với rau quả tươi nói chung và chôm chôm nói riêng, kiểm soát hiệu quả bệnh thối sau thu hoạch phải

thực hiện dựa trên nguyên lý kiểm soát trước và sau thu hoạch, và vấn đề khoa học cần giải quyết là phải hiểu rõ về tác nhân gây nên bệnh thối. Với chôm chôm và điều kiện môi trường sản xuất ở Việt Nam, hầu như chưa thấy thông tin nghiên cứu nào về vấn đề này. Do đó, việc phân lập nhằm xác định tác nhân gây bệnh thối quả sau thu hoạch và đánh giá một số đặc điểm sinh học của chôm chôm trong điều kiện *in vitro* là cần thiết.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Trái chôm chôm giống Java được thu hoạch ở độ chín thương mại từ các tỉnh Tiền Giang, Bến Tre và Vĩnh Long. Môi trường nuôi cấy: PDA (potato dextrose agar), PCA (potato carrot agar), MEA (malt extract agar), WA (water agar). Dụng cụ phục vụ nuôi cấy: đĩa petri, hộp nhựa chuyên dùng để nuôi cấy kiểm

*Tác giả liên hệ: Tel: 0917476982, Email: thachyen31@gmail.com

Study on postharvest rot disease causing agents on rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) in the Mekong River Delta

Summary

Rot disease is one of the most serious issues causing considerable postharvest losses of rambutan. With the aim to support in finding out effective control approaches, an investigation titled “Studies on causal agents of postharvest rot diseases on rambutan in Mekong River Delta” was carried out on aspects of isolation, identification, and evaluation of culture conditions on growth and development of the isolated fungi. Results indicated that there were seven fungi recored as agents causing postharvest rot diseases on rambutan, i.e. *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Phomopsis mali*, *Lasmenia* sp., *Gliocephalotrichum cylindrosporum*, *Pestalotiopsis virgatulavoucher*, *Pestalotiopsis clavispora* and *Fusarium verticillioides*; and the two strains *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Phomopsis mali* were the most serious pathogens. Two featured symptoms as cloudy and black caused by these fungi could be regconised by naked eyes. All these fungi were grown well on all three cultures of PDA (potato dextrose agar), PCA (potato carrot agar), and MEA (malt extract agar) in optimum ranges of temperature 25-30°C and pH 6-8. Among the examined fungi, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* had a wide growing temperature 15-35°C, and *Pestalotiopsis virgatulavoucher* could be grown at high temperature (45°C).

Keywords: *fusarium verticillioides*, *gliocephalotrichum cylindrosporum*, *lasiodiplodia pseudotheobromae*, *pestalotiopsis clavispora*, *pestalotiopsis virgatulavoucher*, *phomopsis mali*, *rambutan*.

Classification number 4.1

chứng tác nhân (được dùng trong thực hiện quy trình Koch).

Phương pháp phân lập xác định tác nhân gây bệnh thối sau thu hoạch trên chôm chôm

Xác định triệu chứng và thu thập mẫu bệnh xuất hiện sau thu hoạch trên quả chôm chôm: mẫu chôm

chôm thu hoạch từ các vườn được đưa về phòng thí nghiệm trữ ở nhiệt độ phòng và nhiệt độ bảo quản lạnh 13°C (đây là nhiệt độ bảo quản của chôm chôm) để quan sát sự phát triển của bệnh. Chôm chôm có triệu chứng bệnh đặc trưng (như thối đen mờ, thối đen một vùng, thối lan mờ...) được lấy đi phân lập.

Phân lập: mẫu nấm bệnh được phân lập từ quả chôm chôm được thu thập ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long như đã nêu trên và được nuôi cấy trên môi trường PDA, ủ ở 28±2°C, trong 7 ngày [2].

Phương pháp kiểm chứng tác nhân gây bệnh thối quả chôm chôm theo quy trình Koch

Chôm chôm được rửa trong dung dịch chlorine, sau đó xử lý với cồn để khử trùng trước khi chủng nấm. Các dụng cụ đựng mẫu đều được tiệt trùng, thao tác thí nghiệm được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Nấm phân lập được kiểm chứng có độ tuổi sinh trưởng 7 ngày trong môi trường nuôi cấy. Các mẫu nấm được lây nhiễm trên trái theo hai hình thức có gây vết thương và không gây vết thương. Mẫu lây nhiễm (chôm chôm) sau đó được đặt trong hộp nhựa có độ ẩm cao 90-95% và ủ ở hai nhiệt độ (nhiệt độ phòng và 13°C). Nấm bệnh phát triển trên chôm chôm được quan sát định kỳ với triệu chứng xuất hiện được so sánh với triệu chứng bệnh được ghi nhận trước đó trên trái.

Các chủng nấm phân lập được sau khi qua kiểm chứng theo quy trình Koch, mẫu nấm được gửi đi định danh bằng phương pháp sinh học phân tử [3] với các bước sau: ly trích DNA, giải trình tự và sau đó sử dụng phần mềm Blast N để so sánh trình tự gene 28S rRNA trong NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Đánh giá một số điều kiện môi trường nuôi cấy (nhiệt độ, pH và thành phần môi trường) đến sự sinh trưởng và phát triển của các tác nhân gây bệnh thối quả chôm chôm

Thí nghiệm 1: khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của nấm được bố trí gồm 8 mức nhiệt độ: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45°C (các mẫu nấm đã cấy trên đĩa Petri được đặt trong tủ định ôn). Mỗi mức nhiệt độ được lặp lại 3 lần, mỗi lần 1 đĩa Petri.

Thí nghiệm 2: khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm được bố trí gồm có 6 mức pH khác nhau: 4; 4,5; 5; 6; 7; 8 bằng cách điều chỉnh môi trường nuôi cấy. Mỗi nghiệm thức được lặp

lại 3 lần, mỗi lần 1 đĩa Petri.

Thí nghiệm 3: khảo sát ảnh hưởng của môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm được bố trí gồm 4 loại môi trường: PDA, PCA, MEA, WA. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần một đĩa Petri.

Phân tích số liệu

Các số liệu thu thập được được phân tích thống kê và so sánh theo phép thử LSD ở mức ý nghĩa 5% bằng phần mềm SAS, version 9.1.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phân lập tác nhân gây thối trên quả chôm chôm

Chôm chôm sau khi thu hoạch ở các tỉnh Bến Tre, Tiền Giang và Vĩnh Long được tồn trữ ở điều kiện nhiệt độ phòng và 13°C, sau 7 ngày bảo quản đều bắt đầu xuất hiện các vết bệnh thối quả (hình 1). Mẫu bệnh được biểu hiện rõ ràng, vết bệnh đặc trưng được lựa chọn để phân lập, triệu chứng được mô tả ở hình 3.

STT	Địa điểm thu mẫu	Mẫu ban đầu	Mẫu 7 ngày sau thời gian bảo quản 13°C
1	Xã Vĩnh Bình, huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre		
2	Xã Tân Phong, huyện Cai Lậy, tỉnh Tiền Giang		
3	Xã Bình Hòa Phước, huyện Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long		

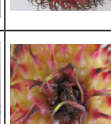
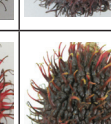
Hình 1: triệu chứng mẫu bệnh thu thập ở Bến Tre, Tiền Giang và Vĩnh Long sau 7 ngày bảo quản ở 13°C

Với 2 triệu chứng thối đặc thù đó là thối lan mờ và thối đen (phân bố ở chân râu hay trên bề mặt vỏ trái) ở tất cả các mẫu, chúng tôi đã phân lập được 7 chủng nấm thể hiện 7 triệu chứng đặc trưng gây thối trái chôm chôm cũng như hình dạng khuẩn ty được quan sát khi chúng sinh trưởng và phát triển trong môi trường PDA. Với thối đen có nhiều nấm gây ra như *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasmenia* sp., *Gliocephalotrichum cylindrosporum*, *Pestalotiopsis virgatula* voucher và *Fusarium verticillioides*, tuy nhiên với thối lan mờ hầu như chỉ có nấm *Phomopsis mali* gây nên. Kết quả định danh cho thấy, các nấm gây bệnh thối trên chôm chôm là: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Phomopsis mali*,

Lasmenia sp., *Gliocephalotrichum cylindrosporum*, *Pestalotiopsis virgatula* voucher và *Pestalotiopsis clavispora*. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu xác định nấm bệnh trên chôm chôm được thực hiện bởi Abdollahzadeh, Jeewon, Phillips...[4-11].

Kiểm chứng tác nhân gây bệnh theo quy trình Koch

Các mẫu nấm sau khi chủng bệnh lên trái theo quy trình Koch đều cho kết quả triệu chứng bệnh giống như triệu chứng bệnh ban đầu phân lập. Sau 1 ngày chủng bệnh, ở điều kiện nhiệt độ phòng, các chủng nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Phomopsis mali* và *Lasmenia* sp. đều biểu hiện bệnh và tăng dần theo thời gian (hình 2). Các chủng nấm còn lại (*Fusarium* sp., *Gliocephalotrichum cylindrosporum*, *Pestalotiopsis virgatula* voucher và *Pestalotiopsis clavispora*) sau 3 ngày triệu chứng nấm bệnh mới bắt đầu biểu hiện. Tuy nhiên, ở điều kiện 13°C thì triệu chứng bệnh biểu hiện rất chậm ở tất cả các chủng nấm, đến ngày thứ 5 trở đi mới bắt đầu có triệu chứng.

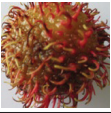
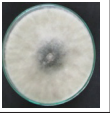
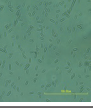
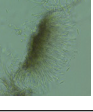
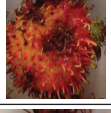
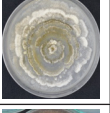
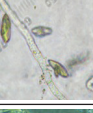
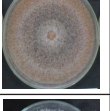
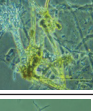
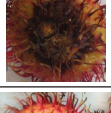
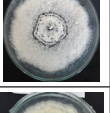
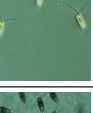
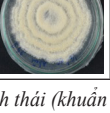
	Sau 1 ngày	Sau 2 ngày	Sau 3 ngày	Sau 4 ngày
<i>L. pseudotheobromae</i>				
<i>Phomopsis mali</i>				
<i>Lasmenia</i> sp.				

Hình 2: triệu chứng bệnh của *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Phomopsis mali* và *Lasmenia* sp. sau thời gian chủng theo quy trình Koch

Các triệu chứng được phân lập lại và kết quả phân lập lại ở ngày thứ 5 của tất cả 7 mẫu nấm đã chủng theo quy trình Koch đều là kết quả đúng 7 chủng nấm đã phân lập và đồng thời trên tất cả các mẫu đều phân lập được chủng nấm *L. pseudotheobromae* và *Phomopsis mali*. Điều này chứng tỏ, 2 chủng nấm này dễ xâm nhiễm và gây hại trên quả chôm chôm trong thời gian bảo quản sau thu hoạch.

Như vậy, qua phân lập và kiểm chứng cho thấy, ở chôm chôm trong thời gian bảo quản bị lây nhiễm tự nhiên bởi 7 chủng nấm. Trong đó, 2 chủng

Lasiodiplodia pseudotheobromae và *Phomopsis mali* có nguy cơ gây hại nghiêm trọng nhất (hình 3).

TT	Mô tả triệu chứng bệnh	Định danh (trình tự nucleotide 28S rRNA; tỷ lệ % đồng hình)	Triệu chứng	Hình dạng khuẩn ty của nấm	Bào tử của nấm quan sát dưới kính hiển vi
1	Vết bệnh dốm màu nâu xám, mờ, không đồng nhất. Phát triển lan rộng, khi già chuyển thành màu đen	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (714; 99%)			
2	Vết bệnh màu đen, ướt, không có hình dạng nhất định	<i>Fusarium verticillioides</i> (526; 99%)			
3	Vết bệnh tròn đều, đen, khô. Có vành xám mờ bên ngoài	<i>Phomopsis mali</i> (696; 95%)			
4	Vết bệnh không đồng nhất, màu đen, về sau lan rộng, mềm, nhũn nước	<i>Lasmenia</i> sp. (236; 98%)			
5	Các triệu chứng thối đen, mềm, nhũn nước là do chỉ nấm	<i>Gliocephalotrichum cylindrosporum</i> . (531; 99%)			
6	Vết bệnh đen, khô, tế bào biểu bì vỡ ra, sần sùi	<i>Pestalotiopsis virgatula</i> voucher (548; 99%)			
7	Triệu chứng thối đen ở múi râu của quả	<i>Pestalotiopsis clavisporea</i> (544; 100%)			

Hình 3: triệu chứng bệnh thối trên quả, đặc điểm hình thái (khuẩn ty và bào tử), tên định danh của tác nhân nấm gây thối quả chôm chôm sau thu hoạch

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng và phát triển của các nấm bệnh gây thối quả chôm chôm

Kết quả sau 7 ngày nuôi cấy, chủng nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* phát triển nhanh ở khoảng nhiệt độ từ 15-35°C (8,5 cm), khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các mức nhiệt độ còn lại. Chủng nấm *Fusarium verticillioides* phát triển ở 30 và 35°C tốt hơn so với các điều kiện nhiệt độ khác, với đường kính tán nấm là 2,37 và 2,33 cm. Hai chủng nấm *Phomopsis mali* và *Gliocephalotrichum cylindrosporum* lại phát triển thích hợp ở 30°C với đường kính lần lượt là 8,50 cm và 6,53 cm, khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các mức nhiệt độ còn lại. Hai chủng nấm *Lasmenia* sp. và *Pestalotiopsis virgatula* voucher phát triển thích hợp với mức nhiệt độ từ 25-30°C. Riêng chủng nấm *Pestalotiopsis clavisporea* ưa thích nhiệt độ thấp hơn (20-25°C) với đường kính tán nấm là 5,17 cm. Như vậy, hầu như tất cả 7 chủng nấm đều phát triển tốt ở 25-30°C, ngoại

trừ *Lasiodiplodia pseudotheobromae* và *Pestalotiopsis clavisporea* vẫn phát triển tốt ở mức nhiệt độ thấp hơn. Ngược lại, *Fusarium verticillioides* và *Lasmenia* sp. lại ưa thích với mức nhiệt độ cao hơn (bảng 1).

Bảng 1: ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng và phát triển của một số chủng nấm gây thối quả chôm chôm trên môi trường PDA

Chủng nấm	Nhiệt độ (°C)							LSD (0,05)	CV (%)
	10	15	20	25	30	35	40		
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	0,50c	8,50a	8,50a	8,50a	8,50a	8,50a	0,80b	0,00d	0,06
<i>Fusarium verticillioides</i>	0,70e	0,77e	1,27d	1,45c	2,37a	2,33a	1,90b	0,00f	0,18
<i>Phomopsis mali</i>	0,90f	4,77d	5,37c	7,77b	8,50a	4,10e	0,00g	0,00g	0,54
<i>Lasmenia</i> sp.	0,63c	3,57ab	3,60ab	3,93a	4,16a	2,83b	3,63ab	0,00c	0,90
<i>Gliocephalotrichum cylindrosporum</i>	0,00g	1,07f	1,97e	3,90d	6,53a	5,73b	5,37c	0,00g	0,31
<i>Pestalotiopsis virgatula</i> voucher	3,27d	7,17b	7,87ab	8,50a	8,50a	2,17e	4,33c	1,17f	0,97
<i>Pestalotiopsis clavisporea</i>	0,00d	1,73c	5,17a	5,17a	3,73b	0,20d	0,00d	0,00d	0,68

Ghi chú: trên cùng một hàng, giá trị có cùng ký tự thì không khác biệt có ý nghĩa trong phép thử LSD (0,05)
Chỉ tiêu theo dõi: đường kính tán nấm (cm)

Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng và phát triển của các dòng nấm bệnh gây thối quả chôm chôm

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, sau 7 ngày nuôi cấy ở 6 mức pH khác nhau (4; 4,5; 5; 6; 7; 8) thì chủng nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* phát triển đầy đĩa 9,00 cm, không khác biệt ở các mức pH khác nhau. Chủng nấm *Phomopsis mali* có khoảng pH rộng từ 5-8, kể đến là chủng nấm *Gliocephalotrichum cylindrosporum* có khoảng pH thích hợp là 6-8, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mức pH còn lại. Đối với chủng nấm *Lasmenia* sp. lại phát triển tốt ở mức pH 7 (5,00 cm) và pH 8 (5,10 cm). Hai chủng nấm còn lại là *Pestalotiopsis virgatula* voucher và *Pestalotiopsis clavisporea* phát triển tốt ở pH 6 với đường kính tán nấm đều là 7,83 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mức pH còn lại.

Bảng 2: ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm gây thối quả chôm chôm

Chủng nấm	pH						LSD (0,05)	CV (%)
	4	4,5	5	6	7	8		
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	ns	
<i>Fusarium verticillioides</i>	4,57d	5,10c	6,50b	6,57b	6,70ab	7,13a	0,44	3,97
<i>Phomopsis mali</i>	6,63b	6,40b	8,83a	8,40a	8,50a	9,0a	0,98	6,74
<i>Lasmenia</i> sp.	3,43b	3,53b	4,00b	3,60b	5,00a	5,10a	0,62	8,23
<i>Gliocephalotrichum cylindrosporum</i>	7,73c	7,57c	7,60c	8,60a	8,33ab	8,13abc	0,76	5,21
<i>Pestalotiopsis virgatula</i> voucher	4,13d	5,17c	6,50b	7,83a	6,50b	7,00b	0,78	6,92
<i>Pestalotiopsis clavisporea</i>	4,13d	4,90c	6,50b	7,83a	6,50b	6,93b	0,73	6,58

Ghi chú: trên cùng một hàng, giá trị có cùng ký tự thì không khác biệt có ý nghĩa trong phép thử LSD (0,05)
Chỉ tiêu theo dõi: đường kính tán nấm (cm)
ns: không khác biệt về mặt thống kê

Ảnh hưởng của môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của các nấm gây thối quả chôm chôm

Kết quả sau 7 ngày cấy mẫu ở 4 điều kiện môi trường PDA, PCA, MEA và WA (bảng 3) cho thấy, các dòng nấm đều phát triển khá tốt trên cả 4 loại môi trường, không khác biệt có ý nghĩa về thống kê, ngoại trừ chủng nấm *Lasmenia* sp. phát triển tốt ở môi trường MEA, còn chủng *Gliocephalotrichum cylindrosporum* ưa thích với môi trường PDA với đường kính tán nấm là 5,17 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các môi trường còn lại.

Nhìn chung, tất cả các chủng nấm đều có hướng phát triển khá tốt ở cả 3 môi trường PDA, PCA và MEA. Riêng đối với môi trường nước agar (WA), không có dinh dưỡng, nên các chủng nấm cũng sinh trưởng nhưng sợi nấm rất yếu.

Bảng 3: ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm (cm)

Chủng nấm	Đường kính tán nấm (cm)				LSD (0,05)	CV (%)
	PDA	PCA	MEA	WA		
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	9,00	9,00	9,00	9,00	ns	
<i>Fusarium verticillioides</i>	1,97a	1,93a	2,13a	1,70a	0,51	13,16
<i>Phomopsis mali</i>	7,27a	6,80a	7,62a	7,97a	1,21	8,18
<i>Lasmenia</i> sp.	3,07c	3,83b	4,92a	4,23b	0,49	6,14
<i>Gliocephalotrichum cylindrosporum</i>	5,17a	3,67b	3,77b	3,73b	0,72	8,86
<i>Pestalotiopsis virgatula voucher</i>	1,93a	1,83ab	1,8ab	1,53b	0,40	11,15
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	2,30a	2,27a	2,43a	2,23a	0,24	5,26

Ghi chú: trên cùng một hàng, giá trị có cùng ký tự thì không khác biệt ý nghĩa trong phép thử LSD (0,05)
Chỉ tiêu theo dõi: đường kính tán nấm (cm)

Kết luận

Kết quả phân lập và định danh đã xác định được tác nhân gây bệnh thối quả chôm chôm sau thu hoạch ở Đồng bằng sông Cửu Long là do các dòng nấm: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Fusarium verticillioides*, *Phomopsis mali*, *Lasmenia* sp., *Gliocephalotrichum cylindrosporum*, *Pestalotiopsis virgatula voucher* và *Pestalotiopsis clavispora* gây ra, với tỷ lệ đồng hình từ 95-100% trên trình tự nucleotit 28S rARN.

Ở chôm chôm trong thời gian bảo quản bị lây nhiễm tự nhiên bởi 7 chủng nấm, trong đó 2 chủng *Lasiodiplodia pseudotheobromae* và *Phomopsis mali* có nguy cơ gây hại nghiêm trọng nhất.

Các môi trường PDA, MEA và PCA đều thích hợp cho các dòng nấm sinh trưởng, riêng chủng nấm *G. cylindrosporum* ưa thích với môi trường PDA hơn. Tất cả các chủng nấm đều có khoảng nhiệt độ ưa thích là 25-30°C, ngoại trừ chủng *Lasiodiplodia pseudotheobromae* có khoảng nhiệt độ rộng từ 15-35°C. Các dòng nấm hầu như không sinh trưởng ở 45°C, ngoại trừ *P. virgatula voucher* còn phát triển nhưng chậm. Điều kiện pH 6 cho đến pH 8 đều thích hợp cho các dòng nấm sinh trưởng và phát triển. Trong 7 chủng nấm phân lập được thì chủng *Lasiodiplodia pseudotheobromae* có sức sống mạnh nhất, khoảng pH, nhiệt độ ưa thích rộng và sinh trưởng thích hợp ở cả 4 loại môi trường.

Tài liệu tham khảo

- [1] Cục Trồng trọt (2011), "Hiện trạng và giải pháp phát triển sản xuất, tiêu thụ cây ăn trái Nam Bộ trong thời gian tới", *Hội nghị lần thứ hai Hiện trạng sản xuất và tiêu thụ cây ăn trái ở Nam Bộ và giải pháp phát triển các vùng cây ăn trái tập trung theo VietGAP tại Tiền Giang 24/5/2011*, Nxb Nông Nghiệp.
- [2] Farungsang, U.N. Farungsang, S. Sangchote (1991), "Postharvest diseases of rambutan during storage", *8th Australian Plant Pathological Society Conference (Abstract)*, p.114.
- [3] B.H. Bowman, J.W. Taylor, A.G. Brownlee, J. Lee, S.D. Lu, T.J. White (1992), "Molecular evolution of the fungi: relationships of the basidiomycetes, ascomycetes and chytridiomycetes", *Mol Biol Evol*, **9**, pp.285-296.
- [4] J. Abdollahzadeh, A. Javadi, E. Mohammadi Goltapeh, R. Zare, A.J.L. Phillips (2010), "Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran", *Persoonia*, **25**, pp.1-10.
- [5] R. Jeewon, E.C.Y. Liew, K.D. Hyde (2004), "Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association", *Fungal Diversity*, **17**, pp.39-55.
- [6] L.M. Keith, T.K. Matsumoto Brower, K.A. Nishijima, M.M. Wall, M. Nagao (2011), "Field survey and fungicide screening of fungal pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*) fruit rot in Hawaii", *HortScience*, **46**, pp.730-735.
- [7] L. Lombard, L.M. Serrato-Diaz, R. Cheewangkoon, R.D. French-Monar, C. Decock4, P.W. Crous (2014), "Phylogeny and taxonomy of the genus *Gliocephalotrichum*", *Persoonia*, **32**, pp.127-140.
- [8] D.A. Rosenberger, T.J. Bur (1982), "Fruit decays of peach and apple cause by *Phomopsis mali*", *Plant Disease*, **66**, pp.1073-1075.
- [9] L.M. Serrato Diaz, R. Rivera Vargas, G.J. Goenaga, R.D. Verkley (2011), "French-Monar", *Plant Disease*, **95**, pp.11-21.
- [10] A.J.L. Phillips (2007), *Key to the various lineages in "Botryosphaeria" Version 01.2007*, http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/key.htm, 26.
- [11] Trần Thụy Ái Tâm (2012), "Nghiên cứu bệnh do nấm trên chôm chôm sau thu hoạch từ hình thức canh tác theo mô hình VietGAP và mô hình tự do", *Luận văn thạc sỹ chuyên ngành công nghệ sinh học*, Trường Đại học Cần Thơ.

Bước đầu đánh giá năng suất và giá trị dược liệu một số giống khổ qua rừng tại Bình Phước

Phan Đặng Thái Phương*, Trần Thị Đoàn Trang, Vũ Văn Ba

Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 28/7/2016, ngày chuyển phản biện 2/8/2016, ngày nhận phản biện 31/8/2016, ngày chấp nhận đăng 9/9/2016

Cây khổ qua (*Momordica charantia* L.) không chỉ được sử dụng làm rau trong bữa ăn hàng ngày mà từ lâu đã được sử dụng như là một bài thuốc quý để chữa trị nhiều căn bệnh hiểm nghèo ở nhiều nước trên thế giới. Đặc biệt, nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng cây khổ qua rừng mang nhiều đặc tính dược liệu hơn các giống khổ qua thương mại.

Ở Việt Nam, diện tích trồng khổ qua ngày càng tăng trong thời gian gần đây. Để cải thiện năng suất cũng như đặc tính dược liệu cho các giống khổ qua, quần thể khổ qua rừng gồm 9 dòng/giống tại tỉnh Bình Phước đã được thu thập và đánh giá làm vật liệu cho lai tạo sau này. Kết quả đánh giá thu được 1 giống (AB5) có tiềm năng năng suất cao (1,30 kg/cây) và 1 giống (BT2) cho phản ứng tạo bọt, biểu hiện của hoạt chất saponin cao hơn so với các dòng/giống khác.

Từ khóa: Bình Phước, dược liệu, khổ qua rừng, năng suất.

Chỉ số phân loại 4.1

Đặt vấn đề

Cây khổ qua (*Momordica charantia* L.) hay còn gọi là mướp đắng, mướp mũi, chua hao... thuộc họ bầu bí (*Cucurbitaceae*), được trồng phổ biến ở Việt Nam và một số quốc gia khác như Ấn Độ, Philippin, Malaysia, Trung Quốc, Australia, các nước ở châu Phi, Tây Á và Mỹ La Tinh [1]. Theo một số nghiên cứu về vai trò dược liệu của cây khổ qua đã ghi nhận: thịt quả khổ qua có chứa hai loại dược chất quan trọng là Saponin và Momordicin. Momordicin là hỗn hợp charantin, protein, adenin, betanin, vitamin B, C... là một glucosid đắng, có tác dụng diệt vi khuẩn và siêu vi khuẩn, giúp cơ thể chống lại các tế bào ung thư. Hợp chất saponin trong khổ qua là vị thuốc có chứa chất charantin, là một dạng như insulin có tác dụng hạ lượng đường cao trong máu một cách từ từ nên rất an toàn cho người bệnh [2]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các giống khổ qua đại mang đặc tính dược liệu cao hơn nhiều so với các giống khổ qua thương mại [3, 4].

Ở Việt Nam, diện tích trồng cây khổ qua trong những năm gần đây tăng lên đáng kể vì lợi nhuận kinh tế từ việc trồng cây khổ qua khá cao (gấp 4 lần trồng lúa). Vì vậy, cây khổ qua được trồng khá phổ biến trong cả nước. Các giống khổ qua đang được trồng rộng rãi tại các vùng sản xuất là các giống lai F1. Việc nhập

khẩu giống F1 đã và đang là vấn đề thời sự và mang nhiều tranh cãi. Theo báo cáo năm 2013, Việt Nam phải tiêu tốn khoảng 500 triệu USD để nhập khẩu các loại hạt giống [5]. Theo số liệu của Hiệp hội trồng khổ qua khu vực châu Á, Việt Nam là quốc gia trồng cây khổ qua chiếm 6% trong khu vực [6]. Vì vậy cần phải có một lượng lớn hạt giống khổ qua lai nhằm đáp ứng cho nhu cầu này.

Xuất phát từ thực trạng nêu trên và nhu cầu rau ăn quả mang giá trị dược liệu, chúng tôi đã tiến hành thu thập, đánh giá và sàng lọc một số giống khổ qua rừng có năng suất và giá trị dược liệu cao tại vùng Đông Nam Bộ để làm vật liệu ban đầu cho công tác lai tạo giống tiếp theo.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu dòng/giống khổ qua được thu thập từ tỉnh Bình Phước là nguồn vật liệu để tiến hành việc trồng, đánh giá các đặc tính nông học và đặc tính dược liệu. Lý do là vì Bình Phước có diện tích đất rừng rất lớn (chiếm khoảng hơn nửa tổng diện tích đất của tỉnh), với chủ yếu là đất đỏ bazan, loại đất rất thích hợp cho cây khổ qua rừng sinh trưởng và phát triển. Ngoài ra, nhiệt độ ở khu vực rừng Bình Phước thuộc loại nhiệt

*Tác giả liên hệ: Tel: 01212187879; Email: thaiphuong@hcmuaf.edu.vn

Initial, evaluation on the productivity and medicinal values of some wild bitter gourd varieties in Binh Phuoc province

Summary

Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) is used not only as a common vegetable for daily meals but also in traditional medicine to treat a number of serious diseases in many countries. Specially, a lot of studies have proved that the wild bitter gourd possesses more bioactive components than the bitter gourd.

In Vietnam, the area planting bitter gourds has been growing recently. To improve the yield and medicinal characteristics of the hybrid bitter gourd varieties, a population including nine wild bitter gourd varieties has been collected and evaluated for agronomical characteristics and medication activities in Binh Phuoc province. The result of evaluation and saponin test showed that one of nine collected varieties (AB5) demonstrated the higher potential yield (1.30 kg per plant) in comparison with that of the others, and the BT2 variety showed higher saponin activities (1.17 cm in foam test).

Based on these results, the AB5 and BT2 will be used as original materials for hybrid breeding of bitter gourds in further steps.

Keywords: Binh Phuoc, medicinal material, wild bitter gourd, yield.

Classification number 4.1

đới (dao động từ 25-30°C), rất thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây khổ qua rừng [7].

Phương pháp thu thập mẫu dòng/giống khổ qua

Các mẫu dòng/giống khổ qua rừng được thu thập từ những địa điểm khác nhau ngẫu nhiên trên địa bàn tỉnh Bình Phước. Mẫu được thu thập dưới dạng hạt, hạt được chọn là hạt mẩy, khỏe mạnh, lấy trên những cây riêng biệt. Mẫu hạt của từng cây khi thu thập được đánh dấu theo quy ước của người thu thập và ghi nhận một số thông tin về điều kiện môi trường xung quanh và hình ảnh của nơi thu thập mẫu hạt. Sau đó, hạt được mang về phòng thí nghiệm làm sạch và bảo quản để

làm vật liệu cho việc đánh giá nông học và dược liệu.

Phương pháp đánh giá tình trạng năng suất

Thí nghiệm trồng cây khổ qua trên đồng ruộng được bố trí theo khối đầy đủ ngẫu nhiên đơn yếu tố. Tổng số nghiệm thức thí nghiệm là 9 dòng/giống khổ qua, mỗi nghiệm thức trồng 3 cây tương ứng với 3 lần lặp lại, khoảng cách trồng 80 x 50 (cm). Quy trình trồng và chăm sóc cây khổ qua được tiến hành theo quy trình công bố của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2014).

Các tính trạng nông học được đánh giá theo phương pháp của Hemant Singh (2013). Một số chỉ tiêu về đặc điểm quả liên quan đến tình trạng năng suất được tính bằng cách đánh giá 20 quả trưởng thành/lần lặp lại của mỗi dòng/giống khổ qua. Chiều dài quả (cm) được đo từ đầu quả đến đuôi quả, đường kính quả (cm) được đo theo chiều cắt ngang của bụng quả. Khối lượng trung bình quả của mỗi dòng/giống được cân và tính trung bình của toàn bộ khoảng thời gian thu hoạch quả. Năng suất thu hoạch của mỗi dòng/giống được xác định bằng tổng khối lượng quả thu hoạch được trên 1 cây trong 1 chu kỳ sản xuất là 90 ngày tính từ khi trồng.

Phương pháp định tính dược chất saponin

Thí nghiệm khảo sát định tính dược chất saponin được đánh giá dựa trên phản ứng hóa học là phản ứng tạo bọt của thử nghiệm Salkowski Test.

Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm MSTATC để phân tích số liệu. Phân tích phương sai và sử dụng phép thử so sánh Duncan để đánh giá sự khác biệt giữa các dòng/giống thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả thu thập mẫu dòng/giống khổ qua rừng ở tỉnh Bình Phước

Quá trình thu thập mẫu dòng/giống khổ qua rừng đã được tiến hành tại tỉnh Bình Phước. Hai vùng sinh thái là huyện Lộc Ninh và thị xã Bình Long thuộc tỉnh Bình Phước là hai địa điểm đã tiến hành thu mẫu hạt giống khổ qua rừng vì tại đây các mẫu dòng/giống khổ qua mọc nhiều ven các rừng phòng hộ của vườn cao su. Điều kiện sinh thái như nhiệt độ, độ ẩm và đất đai tại khu vực này thích hợp cho cây khổ qua rừng. Bộ mẫu gồm 9 dòng/giống khổ qua rừng đã được thu thập và mã hóa tên mẫu: AB1, AB3, AB5, AB7, BT2, BT3, BT4, BT5, HC2. Các mẫu giống thu thập được đa số

là mọc tự nhiên ở hàng rào quanh sân, vườn nhà, trong các vườn trồng cây tiêu, cây điều và cây cao su. Một số cây khô qua rừng mọc thành khóm trên những bãi đất trống bỏ hoang hay trên đồng bê tông đổ vỡ của công trình. Trong đó, giống AB3 là giống thu thập từ hộ nông dân, giống này là giống khô qua rừng được người nông dân thường trồng vào mùa mưa và là giống do nông hộ tự lưu giữ và sản xuất giống (hình 1). Qua quá trình thu thập giống khô qua rừng đã đưa ra nhận xét, quỹ gene khô qua rừng đang bị mất đi vì việc thu thập và giữ giống của nông dân đã không được thực hiện phổ biến như thời gian trước. Cảnh báo hơn, cây khô qua rừng được nông dân xem như cây cỏ dại, ít quan tâm. Ngoài ra, việc đô thị hóa cũng là một trong những nguyên nhân chính làm mất đi quỹ gene khô qua rừng hiện tại và tương lai.



(a)

(b)

Hình 1: hình ảnh nơi thu thập mẫu giống khô qua rừng tại tỉnh Bình Phước
(a) Cây khô qua mọc trên bãi đất hoang; (b) Hoa và quả cây khô qua mọc ở hàng rào vườn trồng cây tiêu

Kết quả đánh giá đặc điểm năng suất quả của bộ mẫu dòng/giống khô qua

Bộ mẫu dòng/giống khô qua rừng được trồng từ tháng 1/2015 đến 5/2015, tại khu vườn thí nghiệm của Trường Đại học Nông lâm Tp Hồ Chí Minh. Kết quả đánh giá các đặc tính năng suất được phân tích qua số liệu của bảng 1. Đánh giá về kích thước quả ghi nhận: chiều dài quả của 9 dòng/giống khô qua dao động từ 2,79-4,38 cm, đường kính quả 1,54-1,82 cm. Trong số các dòng/giống thí nghiệm, BT2 và AB5 là hai giống có kích thước quả lớn. Kích thước quả được đánh giá là một trong các yếu tố quyết định đến khối lượng quả khô qua tươi, khối lượng quả khô qua tươi của các giống dao động từ 2,18 đến 4,85 g, trong đó BT2 và AB5 là hai giống có khối lượng quả tươi lớn nhất (4,85 và 3,41 g/quả). Tuy nhiên, đánh giá về số quả/cây ở 90 ngày sau trồng (NST) thì giống AB5 có số quả thu

hoạch gấp hơn 2 lần so với giống BT2 (374 so với 162 quả), nên năng suất quả tươi của giống AB5 là cao nhất và được đánh giá là giống triển vọng về năng suất (1,30 kg). Qua số liệu phân tích cho thấy, dòng AB5 là dòng có khả năng cải tiến năng suất khô qua thể hiện ở đặc điểm khối lượng quả lớn và số quả thu hoạch trên cây nhiều. Tuy nhiên, phân tích trên tính trạng khối lượng quả/cây thì dòng BT2 cũng được đánh giá là dòng có khả năng cải tiến khối lượng quả. Vì vậy, 2 dòng/giống này rất có ý nghĩa trong việc sử dụng làm vật liệu lai tạo nhằm cải tiến năng suất của giống khô qua rừng trong tương lai.

Bảng 1: kết quả đánh giá đặc điểm năng suất quả của 9 mẫu dòng/giống khô qua thu thập ở tỉnh Bình Phước

Nghiem thức	Chiều dài quả (cm)	Đường kính quả (cm)	Khối lượng quả (g)	Số quả/ cây 90 NST	Năng suất 90 NST (kg/cây)	Màu sắc vỏ quả
AB1	2,90 ± 0,18 ^{cd}	1,77 ± 0,04 ^a	2,95 ± 0,30 ^{bcd}	344 ± 54,6 ^{abc}	1,04 ± 0,32 ^{ab}	Trắng
AB3	3,12 ± 0,12 ^{bcd}	1,78 ± 0,08 ^a	3,25 ± 0,26 ^{bc}	329 ± 12,5 ^{abcd}	0,99 ± 0,12 ^{abc}	Xanh
AB5	3,48 ± 0,13 ^b	1,76 ± 0,09 ^a	3,41 ± 0,40 ^b	374 ± 63,6 ^a	1,30 ± 0,40 ^a	Xanh
AB7	3,32 ± 0,07 ^{bc}	1,69 ± 0,08 ^{ab}	3,02 ± 0,06 ^{bcd}	311 ± 31,4 ^{abcd}	0,86 ± 0,20 ^{bc}	Xanh
BT2	4,38 ± 0,40 ^a	1,82 ± 0,15 ^a	4,85 ± 0,08 ^a	162 ± 44,2 ^d	0,71 ± 0,11 ^{bc}	Trắng
BT3	2,79 ± 0,20 ^d	1,54 ± 0,06 ^b	2,18 ± 0,39 ^d	295 ± 63,2 ^{bcd}	0,65 ± 0,20 ^{bc}	Xanh
BT4	3,09 ± 0,09 ^{bcd}	1,64 ± 0,06 ^{ab}	2,94 ± 0,51 ^{bcd}	164 ± 27,2 ^d	0,50 ± 0,11 ^c	Xanh
BT5	3,27 ± 0,22 ^{bc}	1,56 ± 0,04 ^b	2,73 ± 0,28 ^{bcd}	360 ± 20,8 ^{ab}	0,99 ± 0,09 ^{abc}	Xanh
HC2	3,03 ± 0,04 ^{cd}	1,67 ± 0,04 ^{ab}	2,35 ± 0,06 ^{cd}	284 ± 42,7 ^{cd}	0,61 ± 0,20 ^{bc}	Xanh
LSD _{0.01}	0,45	0,18	0,95			
LSD _{0.05}				74,8	477,9	
CV (%)	5,83	4,64	13,07	38,35	32,42	



Hình 2: hình ảnh quả của mẫu dòng/giống khô qua thu thập ở tỉnh Bình Phước

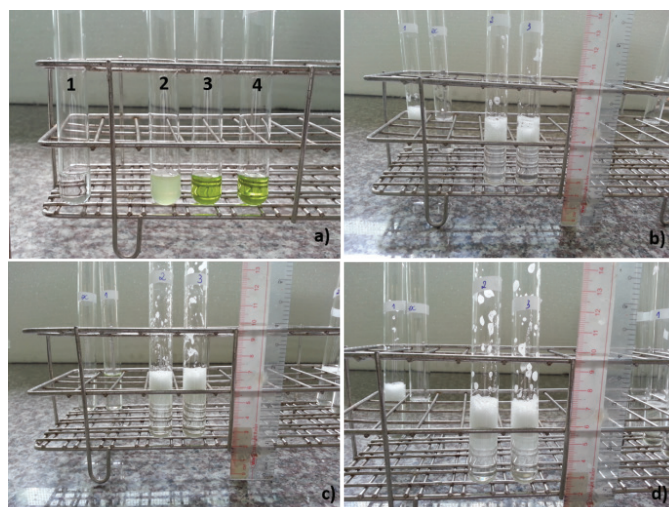
Kết quả định tính saponin của bộ mẫu dòng/giống khô qua

Thí nghiệm định tính saponin của 9 mẫu dòng/giống khô qua được đánh giá qua phân tích số liệu ở bảng 2. Kết quả cho thấy, các mẫu đều tạo bọt trong phản ứng xà phòng hóa (hình 3). Như vậy, cả 9 dòng/giống khô

qua rừng thu thập đều có chứa saponin. So sánh định tính của 9 dòng/giống cho thấy, BT2 là giống có hàm lượng được tính saponin cao nhất (chiều cao bọt khí là 1,17 cm với phản ứng xà phòng hóa sau 60 phút). Từ kết quả thu được cho thấy, giống BT2 là nguồn vật liệu triển vọng cho quá trình lai tạo và cải tiến giống khổ qua trồng trong tương lai.

Bảng 2: kết quả đánh giá chiều cao cột bọt (cm) của 9 mẫu dòng/giống khổ qua thu thập ở tỉnh Bình Phước

Thí nghiệm	Chiều cao cột bọt (cm)			
	Sau khi lắc	15 phút	30 phút	60 phút
AB1	2,13 ± 0,15 ^{bcd}	0,80 ± 0,10 ^{cd}	0,63 ± 0,06 ^{de}	0,47 ± 0,06 ^b
AB3	1,77 ± 0,21 ^{cde}	0,77 ± 0,12 ^{cd}	0,63 ± 0,15 ^{de}	0,53 ± 0,15 ^b
AB5	1,97 ± 0,25 ^{bcd}	0,70 ± 0,00 ^d	0,53 ± 0,06 ^e	0,47 ± 0,06 ^b
AB7	1,63 ± 0,06 ^{de}	0,77 ± 0,15 ^{cd}	0,57 ± 0,06 ^{de}	0,43 ± 0,06 ^b
BT2	3,03 ± 0,46 ^a	1,90 ± 0,01 ^a	1,60 ± 0,26 ^a	1,17 ± 0,38 ^a
BT3	2,03 ± 0,15 ^{bcd}	1,00 ± 0,20 ^c	0,83 ± 0,15 ^{cd}	0,60 ± 0,17 ^b
BT4	2,14 ± 0,12 ^{bc}	1,37 ± 0,06 ^b	1,13 ± 0,06 ^b	0,77 ± 0,06 ^b
BT5	2,47 ± 0,06 ^b	1,30 ± 0,17 ^b	1,03 ± 0,12 ^{bc}	0,80 ± 0,17 ^{ab}
HC2	1,53 ± 0,15 ^e	0,80 ± 0,00 ^{cd}	0,63 ± 0,06 ^{de}	0,50 ± 0,00 ^b
LSD _{0,01}	0,5	0,28	0,3	0,39
CV (%)	10,27	11,51	15,12	25,63



Hình 3: hình ảnh đánh giá khả năng tạo bọt/xà phòng hóa mẫu dòng/giống khổ qua thu thập ở tỉnh Bình Phước

Thảo luận

Cây khổ qua (*Momordica charantia* L.) từ lâu đã được sử dụng làm rau cho bữa ăn hàng ngày ở nhiều nước trên thế giới. Ngoài ra, cây khổ qua còn được sử dụng như một thành phần trong các bài thuốc quý từ rất lâu đời để chữa trị nhiều bệnh hiểm nghèo như tiểu đường, huyết áp, gan... [2]. Ngày nay, với sự phát triển của khoa học và công nghệ, các thành phần về dược

tính quý của cây khổ qua, đặc biệt là cây khổ qua rừng đã được phân tích và nghiên cứu để làm sáng tỏ thêm về chức năng dược liệu [3, 4, 8].

Việt Nam là nước nhiệt đới có điều kiện môi trường rất phù hợp cho cây khổ qua rừng phát triển. Do đó, quần thể khổ qua rừng ở đây rất đa dạng và phong phú. Việc thu thập và đánh giá những đặc điểm nông học cũng như dược liệu các quần thể dòng/giống khổ qua rừng này sẽ là cơ sở để sàng lọc các đặc tính giá trị nhằm tiến hành các nghiên cứu cải tiến giống khổ qua trồng trong tương lai. Kết quả đánh giá đã ghi nhận có sự khác nhau giữa các dòng/giống này về các đặc tính năng suất và dược liệu. Trong đó, chúng tôi thu được 1 giống có năng suất cao là AB5 và 1 giống vừa có khả năng cải tiến khối lượng quả vừa có đặc tính dược liệu là BT2. Kết quả này cũng tương tự với những nghiên cứu về tính dược liệu của cây khổ qua rừng của các nghiên cứu trên thế giới [9]. Chung-Huang Tsai và cộng sự đã bước đầu nghiên cứu và phát hiện ra một số dòng/giống khổ qua rừng mọc hoang dại có khả năng chứa hàm lượng hợp chất metabolic cao hơn so với các dòng/giống khổ qua đang được trồng và thương mại. Vì vậy, dòng AB5 và dòng BT2 sẽ được sử dụng làm vật liệu để lai tạo thành công giống khổ qua có giá trị dược liệu và năng suất cao trong tương lai. Chiến thuật sử dụng dòng/giống cây trồng hoang dã để cải tiến năng suất và chất lượng cho các giống cây trồng là một hướng nghiên cứu mới và đã được tiến hành thành công đối với cây khổ qua. Jong-Ho Chyuan và cộng sự đã công bố lai tạo thành công giống khổ qua F1, “Hualien No. 2”, nhóm này đã sử dụng dòng khổ qua hoang dại được thu thập tại vùng Ji-an, Trung Quốc để lai tạo giống F1 có những tính trạng cải tiến như cây sinh trưởng tốt, hoa cái xuất hiện sớm, tỷ lệ đậu quả cao và chất lượng quả tốt [10].

Kết luận

Quỹ gene khổ qua rừng đã và đang dần thoái hóa. Vì vậy, việc thu thập và đánh giá quỹ gene này là cần thiết. Qua quá trình thu thập mẫu tại tỉnh Bình Phước đã thu được 9 mẫu dòng/giống khổ qua rừng. Các mẫu dòng/giống khổ qua rừng mọc chủ yếu ở ven rừng bảo vệ của các lô cao su hoặc các khu vườn trồng hồ tiêu. Điều kiện sinh thái nơi đây rất thích hợp để cây khổ qua rừng sinh trưởng và phát triển. Quỹ gene khổ qua rừng ở huyện Lộc Ninh và thị xã Bình Long thuộc tỉnh Bình Phước rất có triển vọng trong việc cải tiến giống về một số đặc tính năng suất và dược liệu. Kết quả đánh giá năng suất của 9 dòng/giống khổ qua rừng ở

tỉnh Bình Phước đã kết luận, AB5 là dòng/giống có năng suất vượt trội với 1,30 kg quả/cây ở 90 ngày sau trồng. Kết quả định tính saponin của nguồn vật liệu này đã xác định, BT2 là dòng/giống vừa có khả năng cải tiến khối lượng quả và vừa có triển vọng về hàm lượng saponin cao, thể hiện trong phản ứng tạo bọt với chiều cao bọt khí là 1,17 cm sau 60 phút thử nghiệm. Vì vậy, 2 dòng/giống khổ qua rừng (AB5 và BT2) cần được sử dụng cho dự án nghiên cứu lai tạo giống khổ qua năng suất và mang giá trị dược liệu trong tương lai.

Tài liệu tham khảo

- [1] Phạm Hoàng Hộ (1991), *Cây cỏ Việt Nam*, Tập 2 (quyển 1), Nxb Trẻ, tr.568-713.
- [2] J.K. Grover, S.P. Yadav (2004), "Pharmacological action and potential uses of *Momordica charantia*: a review", *J Ethnopharmacol*, **93**, pp.123-132.
- [3] L.Y. Bai, Chang-Fang Chiu, Po-Chen Chu, Wei-Yu Lin, Shih-Jiuan Chiu, Y.L. Lu, Yuh-Hwa Liu, Jong-Ho Chyuan, Kur-Ta Cheng, Wen-Li Liang, and Wen-Chi Hou (2012), "Antioxidant activities of different wild bitter gourd (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Seringe) cultivars", *Botanical Studies*, **53**, pp.207-214.
- [4] A.C. Keller, Jun Ma, Adam Kavalier, Kan He, Anne-Marie B. Brillantes, Edward J. Kennelly (2011), "Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion *in vitro*", *Phytomedicine* **15**, **19(1)**, pp.32-37.
- [5] <http://xttm.mard.gov.vn/Site/vi-vn/64/95/83598/Default.aspx>.
- [6] <http://ksiconnect.icrisat.org/current-status-of-bitter-gourd-production-and-marketing-in-asia-and-market-potential-of-bitter-gourd-as-a-functional-vegetable>.
- [7] <http://sonongnghiepbp.gov.vn>.
- [8] Jing-Ru Weng (2016), "A triterpenoid from wild bitter gourd inhibits breast cancer cells", *Scientific Reports*, **6**, p.22419.
- [9] Chung-Huang Tsai, Emily Chin-Fun Chen, Hsin-Sheng Tsay, Ching-jang Huang (2012), "Wild bitter gourd improves metabolic syndrome: A preliminary dietary supplementation trial", *Nutrition Journal*, **11**, p.4.
- [10] Jong-Ho Chyuan, et al (2011), "New Bitter Gourd Variety - Hualien No.2", *Bulletin of the Hualien District Agricultural Improvement Station*, **No.24**, p. 37.

Đánh giá tính đa hình các kiểu gen cGH và cGHR trên giống gà Móng Tiên Phong

Nguyễn Trọng Tuyên^{1*}, Phùng Đức Tiến², Ngô Thị Kim Cúc³, Lưu Quang Minh³

¹Trường Trung học phổ thông B Phú Lý (Hà Nam)

²Ủy ban Khoa học, Công nghệ và Môi trường của Quốc hội

³Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 3/10/2016, ngày chuyển phản biện 7/10/2016, ngày nhận phản biện 31/10/2016, ngày chấp nhận đăng 7/11/2016

Gen cGH và cGHR đóng vai trò quan trọng đối với các tính trạng sản xuất của gà. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định tính đa hình đơn nucleotide (SNPs) tại vị trí đa hình G1705A (gen cGH-int3), G3037T (gen cGH-int4) và vị trí 561 trong sản phẩm khuếch đại PCR (gen cGHR-int2) trên quần thể giống gà Móng Tiên Phong bằng kỹ thuật PCR-RFLP kết hợp với giải trình tự gen. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tính đa hình tại locus cGH-int4 là cao nhất với tần số kiểu gen GG, TG và TT lần lượt là 0,361, 0,213 và 0,426; tương ứng với tần số alen cGH-int4/Bsh1236I/G là 0,468 và cGH-int4/Bsh1236I/T là 0,532. Đa hình tại locus cGH-int3 được tìm thấy trong quần thể là thấp hơn với tần số alen cGH-int3/EcoRV/G (0,92) và cGH-int3/EcoRV/A (0,08), trong khi đó, tại locus cGHR-int2 đã không phát hiện tính đa hình trên gen (100% cá thể gà nghiên cứu đều mang kiểu gen cGHR-int2/HindIII+/+). Các kết quả này là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu về mối quan hệ giữa tính đa hình di truyền các gen cGH, cGHR với những tính trạng sinh trưởng và sinh sản của gà Móng Tiên Phong nhằm lựa chọn được những quần thể gà có năng suất cao.

Từ khóa: đa hình gen, gà Móng Tiên Phong, gen cGH, gen cGHR và hormone sinh trưởng ở gà.

Chỉ số phân loại 4.2

Đặt vấn đề

Ở gà, gen cGH nằm ở phần cuối trên cánh dài của nhiễm sắc thể số 1, gồm 5 exon và 4 intron với chiều dài toàn bộ là 4,1 kb [1, 2]. Các sản phẩm của gen quy định các hormone tăng trưởng gà (cGH) bao gồm một phân tử protein hoàn chỉnh với 191 axit amin và một chuỗi polypeptit tín hiệu với 25 axit amin [1, 3]. Gen cGHR có kích thước trên 71 kb nằm ở nhiễm sắc thể giới tính Z, chứa 9 exon và 8 intron [4]. Sản phẩm do 2 gen này mã hóa đã được coi là các nhân tố cơ bản thuộc trực kích thích sinh dưỡng điều khiển sự sinh trưởng và phát triển ở gà.

Đa hình đơn nucleotide - SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) trên gen cGH đã được chứng minh có liên kết chặt chẽ với các đặc tính thân thịt, tốc độ tăng trưởng và chất lượng thịt xẻ [3, 5, 6], khối lượng cơ thể và tăng trưởng xương, tỷ lệ thịt đùi, sản lượng trứng [7], khả năng kháng bệnh, lượng chất béo ở bụng, hàm lượng chất béo thô của các cơ ngực, tỷ lệ ấp nở của gà [8]... Bên cạnh đó, các nghiên cứu đa hình SNPs trong gen cGHR cũng đã chứng minh có liên quan đến tốc độ tăng trưởng và tích tụ mỡ của các giống gà hướng thịt

nhẹ hơn các giống hướng trứng [5, 9].

Tại Việt Nam, trong một vài năm gần đây, đa hình các gen cGH và cGHR bước đầu được nghiên cứu trên các giống gà Tàu Vàng, Nòi, Mía, Chọi lai và Ri [10-12]. Các tác giả cũng đề xuất cần tiếp tục đánh giá tính đa hình các kiểu gen và tần số các alen của các gen này trên các giống gà nội khác để lựa chọn những tổ hợp vị trí đa hình có tiềm năng liên kết với các tính trạng sản xuất mong muốn ở gà.

Gà Móng Tiên Phong là giống gà địa phương nguyên chủng, hướng thịt với nhiều ưu điểm như: chân to, thịt chắc, thơm, da giòn, trứng thơm ngon... Tuy nhiên đến nay chưa có công bố nào trên đối tượng gà này về tính đa hình các gen cGH và cGHR cũng như mối tương quan với các tính trạng sản xuất của gà. Vì vậy, kết quả xác định tính đa hình các gen cGH và cGHR cũng như xác định tần số kiểu gen và tần số alen trong nghiên cứu của chúng tôi góp phần tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về mối tương quan giữa đa hình các gen cGH và cGHR đối với các tính trạng năng suất sinh trưởng và sinh sản của gà Móng Tiên Phong nhằm lựa chọn được những quần thể gà có năng suất cao.

*Tác giả liên hệ: Tel: 0913918682; Email: tuyenplb@gmail.com

The evaluation on the polymorphism of cGH and cGHR genes in the Mong Tien Phong chickens

Summary

The chicken growth hormone (cGH) gene and the chicken growth hormone receptor (cGHR) gene play a crucial role in production the traits of chicken. The objective of the research is to identify the single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the positions: G1705A in cGH-int3, G3037T in cGH-int4, and 561 in cGHR-int2 (amplified-PCR product) in Mong Tien Phong chicken populations by the PCR-RFLP technique and gene sequencing. The research results indicated that the polymorphism at the locus cGH-int4 was highest, and the genotype frequencies of GG, TG, and TT were observed as 0.361, 0.213, and 0.426, respectively. Consequently, cGH-int4/Bsh1236I/G and T allele frequencies were 0.468 and 0.532, respectively. The polymorphism at the locus cGH-int3 was found lower with the cGH-int3/EcoRV/G allele frequency of 0.92 and the cGH-int3/EcoRV/A allele frequency of 0.08. Whereas, no polymorphism was detected in the locus cGHR-int2 since all tested chickens carried cGHR-int2/HindIII+/+ genotype.

Keywords: cGH gene, cGHR gene and chicken growth hormone, genetic polymorphisms, Mong Tien Phong chicken.

Classification number 4.2

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

144 mẫu máu lấy từ tĩnh mạch cánh của 144 cá thể gà Móng Tiên Phong 20 tuần tuổi. Trong đó, số mẫu ADN sử dụng để phân tích điểm đa hình G1705A trên đoạn gen cGH-int3 là 144 mẫu; điểm đa hình G3037T trên đoạn gen cGH-int4 là 94 mẫu và số mẫu ADN phân tích điểm đa hình tại vị trí 561 trong sản phẩm PCR nhân đoạn gen cGHR-int2 là 100 mẫu.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN từ máu gà: ADN tổng số từ máu gà được tách chiết bằng bộ kit (GeneJET

Genomic ADN Purification, Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phản ứng PCR nhân các đoạn gen quan tâm:

- Sử dụng cặp mồi: cGH-int3-F (5'- TCC CAG GCT GCG TTT TGT TAC TC - 3') và cGH-int3-R (5'- ACG GGG GTG AGC CAG GAC TG - 3') được thiết kế để nhân đoạn gen cGH có kích thước 429 bp từ pos.2116 đến pos.2544 trên nhiễm sắc thể số 1 ở gà (GenBank: AY461843).

- Sử dụng cặp mồi: cGH-int4-F (5'- CCC AAC AGT GCC ACG ATT CCA TG - 3') và cGH-int4-R (5'- TGC GCA GGT GGA TGT CGA ACT TG - 3') được thiết kế để nhân đoạn gen cGH có kích thước 483 bp từ pos.3312 đến pos.3794 trên nhiễm sắc thể số 1 ở gà (GenBank: AY461843).

- Sử dụng cặp mồi: cGHR-int2-F (5'- GGC TCT CCA TGG GTA TTA GGA - 3') và cGHR-int2-R (5'- GCT GGT GAA CCA ATC TCG GTT - 3') được thiết kế để nhân đoạn gen cGHR có kích thước 718 bp trên nhiễm sắc thể giới tính Z ở gà [9]. Thành phần các phản ứng với tổng thể tích 25,0 µl bao gồm: H₂O 14,2 µl, Buffer (10X) 2,5 µl, MgCl₂ (25 mM) 1,5 µl, dNTPs (2 mM) 2,5 µl, mồi xuôi (10 pmol/µl) 1,0 µl, mồi ngược (10 pmol/µl) 1,0 µl, hot start Taq DNA Polymerase (5 U/µl) 0,3 µl, ADN khuôn 2,0 µl.

Phản ứng PCR được trộn kỹ bằng pipet trước khi đưa vào máy nhân gen Thermal - Cycler, sử dụng chu trình nhiệt với các giai đoạn như sau:

	Giai đoạn khởi đầu	Giai đoạn chính			Giai đoạn hoàn thành
		Biến tính	Gắn mồi	Kéo dài	
Nhiệt độ	95°C	94°C	59 hoặc 62°C*	72°C	72°C
Thời gian	10 phút	30 giây	40 giây	30 giây	5 phút
Số chu kỳ	1	35			1

* Đoạn gen cGH-int3 và cGH-int4: nhiệt độ gắn mồi 62°C

*Đoạn gen cGHR-int2: nhiệt độ gắn mồi 59°C

Phản ứng RFLP xác định đa hình các đoạn gen quan tâm: phản ứng được thực hiện với sự tham gia của các enzyme cắt giới hạn EcoRV có trình tự nhận biết và cắt GAT/ATC, Bsh1236I (CG/CG), HindIII (A/AGCTT) nhằm phát hiện đa hình các đoạn gen tương ứng cGH-int3, cGH-int4 và cGHR-int2 được nhân lên thành công.

Thành phần phản ứng với tổng thể tích 20 µl, bao gồm: H₂O 5,0 µl, Buffer phù hợp (10X) 2,0 µl, Enzyme giới hạn phù hợp (10 U/µl) 1,0 µl, sản phẩm PCR 12,0 µl.

Phản ứng được trộn kỹ bằng pipet, sau đó ủ cắt ở 37°C trong thời gian tối thiểu 4 giờ (có thể ủ qua đêm) trước khi kiểm tra trên gel agarose 1,5 hoặc 2,0% tùy theo kích thước sản phẩm cắt. Kết quả được phân tích dưới ánh sáng UV ở bước sóng 256 nm, sử dụng máy chụp ảnh GelDoc và phần mềm Dolphi - DOC.

Phương pháp giải trình tự gen: quá trình giải trình tự được tiến hành tuần tự theo 4 bước bao gồm: (a) Phản ứng sequencing được thực hiện theo quy trình bộ Kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing, (b) Làm sạch sau sequencing sử dụng bộ Kit BigDye® XTerminator™ Purification, (c) Tiến hành giải trình tự trên máy AB3130 của hãng AB được thực hiện theo module BigDye® XTerminator™ Sequencing (website hỗ trợ www.appliedbiosystems.com/support), sử dụng POP7 và Capillary loại 3130 và 3100 (Avent Capillary Array - 36cm) và (d) Phân tích dữ liệu giải trình tự sử dụng phần mềm chuyên dụng Bioedit v7.2.5 tại Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi.

Phương pháp xác định tần số kiểu gen và tần số alen các đoạn gen cGH và cGHR nghiên cứu:

+ Tần số kiểu gen được tính theo công thức:

$$\text{Tần số kiểu gen} = \frac{\text{Số cá thể mang kiểu gen tương ứng}}{\text{Tổng số cá thể trong quần thể}}$$

+ Tần số alen A ký hiệu là f(A) được tính theo công thức:

$$f(A) = f(AA) + 1/2 f(AB) + 1/2 f(AC) + \dots + 1/2 f(AN)$$

Trong đó: f(AA) là tần số xuất hiện kiểu gen đồng hợp tử alen A trong quần thể; f(AB)... f(AN) là tần số xuất hiện các kiểu gen dị hợp của alen A với các alen khác.

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft excel.

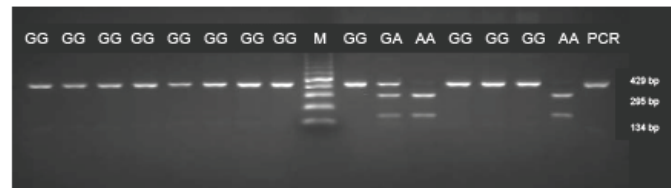
Kết quả và thảo luận

Xác định đa hình kiểu gen cGH và cGHR sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP

Các phản ứng PCR được tối ưu hóa và các đoạn gen quan tâm được nhân lên thành công, đảm bảo cho việc xác định đa hình các đoạn gen cGH-int3, cGH-int4 và cGHR-int2 bằng phản ứng RFLP, sử dụng lần lượt các enzyme cắt giới hạn EcoRV, Bsh1236I và HindIII. Kết quả cụ thể như sau:

Đối với đoạn gen cGH-int3, sản phẩm PCR (429 bp) được cắt bằng enzyme giới hạn EcoRV (GAT/ATC) nhằm phát hiện đa hình G1705A thuộc intron

3 [3]. Kết quả được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%. Hình ảnh trên điện di đồ cho thấy 3 kiểu gen GG, GA và AA đều xuất hiện trong quần thể gà nghiên cứu (hình 1).



Hình 1: đa hình đoạn intron 3 của gen cGH được cắt bởi enzyme giới hạn EcoRV

Đối với đoạn gen cGH-int4, sản phẩm PCR (483 bp) sau đó được cắt bằng enzyme giới hạn Bsh1236I nhằm phát hiện đa hình G3037T thuộc intron 4 [3]. Kết quả được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%. Hình ảnh trên điện di đồ cho thấy 3 kiểu gen TT, TG và GG đều có mặt trong quần thể (hình 2).



Hình 2: đa hình đoạn intron 4 của gen cGH được cắt bởi enzyme giới hạn Bsh1236I

Đối với đoạn gen cGHR-int2, sản phẩm PCR (718 bp) được cắt bởi enzyme HindIII nhằm phát hiện đa hình tại vị trí 561-PCR, kết hợp với 1 điểm cắt tại vị trí 314 trong sản phẩm PCR, tạo thành 2 alen và 3 kiểu gen. Kết quả trên điện di đồ (2% agarose) cho thấy tất cả các mẫu đều chứa vị trí cắt 561 intron 2 của đoạn gen cGHR, dẫn đến 100% cá thể gà Móng Tiên Phong nghiên cứu đều mang kiểu gen đồng hợp HindIII+/+ (hình ảnh không trình bày).

Tần số kiểu gen, tần số alen của các đa hình kiểu gen cGH và cGHR

Vị trí cGH-intr4/Bsh1236I có tính đa hình cao nhất với tần số kiểu gen GG là 0,361; TG là 0,213 và TT là 0,426; tần số alen G là 0,468 và alen T là 0,532. Tính đa hình tại điểm cGH-int3/EcoRV thấp hơn, cụ thể tần số kiểu gen GG là 0,847 cao hơn tần số kiểu gen GA (0,139), tần số kiểu gen AA (0,014) rất thấp trong quần thể. Tại điểm đa hình này, các tần số alen có sự chênh lệch rất cao, tần số các alen trội G và alen lặn A tương ứng là 0,92 và 0,08; đặc biệt trong tổng số 144 mẫu ADN, chỉ có 2 mẫu mang kiểu gen AA. Trong khi đó tại vị trí cGHR-int2/HindIII không phát hiện tính đa hình trên intron 2 gen cGHR, 100% cá thể gà phân tích đều có kiểu gen HindIII+/+.

Bảng 1: tần số kiểu gen và tần số alen gen cGH và cGHR trên quần thể gà Móng Tiên Phong

Locus	Tần số kiểu gen			Tần số alen	
	AA	GA	GG	A	G
cGH-int3/EcoRV	0,014	0,139	0,847	0,08	0,92
cGH-int4/Bsh1236I	0,426	0,213	0,361	0,532	0,468
cGHR-int2/HindIII	-/-	+/-	+/+	-	+
	0	0	1	0	1

Kết quả nghiên cứu của Nie và cs (2005) [3] về tính đa hình gen cGH-int3/EcoRV và cGH-int4/Bsh1236I cũng khẳng định, tính đa hình tại điểm G1705A trên cGH-int3 thấp hơn tính đa hình tại điểm G3037T trên cGH-int4. Tại điểm đa hình G1705A với tần số kiểu gen đồng hợp trội (GG) là 0,772, các kiểu gen (AA và GA) chiếm 0,228; tần số alen A là 0,134, tần số alen G là 0,866. Sự chênh lệch lớn về tần số alen tại điểm đa hình này phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

Tại 2 vị trí đa hình này, trên giống gà Mía, gà Chọi lai và gà Ri, nhóm tác giả Lưu Quang Minh và cs (2016) [12] cũng chỉ ra tần số alen G tại điểm đa hình G1705A trên cGH-int3 ở gà Mía (0,955), gà Chọi lai (0,93) và gà Ri (0,927), tương tự như tần số alen G của gà Móng Tiên Phong (0,92) trong nghiên cứu của chúng tôi. Tại điểm đa hình G3037T trên cGH-int4 tần số alen T và alen G tương ứng ở gà Mía (0,31 và 0,69), gà Chọi lai (0,495 và 0,505) và gà Ri (0,293 và 0,707), trong khi kết quả nghiên cứu của chúng tôi trên đối tượng gà Móng Tiên Phong, tần số alen T (0,532) cao hơn tần số alen G (0,468).

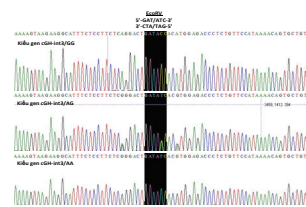
Tại vị trí cGHR-int2/HindIII trên giống gà bản địa Trung Quốc, Li và cs (2008) [13] đã chỉ ra rằng tần số alen "+" là 0,9935 và tần số alen "-" là 0,0065. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của B. Enayati và cs (2011) [14] trên giống gà Mazandaran, tần số alen "+" là 0,99 và tần số alen "-" là 0,01. Điều đặc biệt trong các kết quả công bố trên là không có kiểu gen dị hợp nào được xác định. Trên giống gà Tàu Vàng, đa hình cGHR-int5 và sử dụng enzyme giới hạn Eco72I, nhóm tác giả Đỗ Võ Anh Khoa (2014) [11] đã công bố tần số alen A là 0,92, tần số alen G là 0,08; trong khi đó ở quần thể gà Nòi, tác giả nhận thấy có 100% tần số alen A trong quần thể. So sánh với kết quả của các tác giả trên, chúng tôi nhận thấy, tần số kiểu gen HindIII+/+ và tần số alen HindIII+ chiếm một tỷ lệ rất cao trong các quần thể gà bản địa. Nói cách khác, có rất ít alen HindIII- tồn tại trong các quần thể gà bản địa trên thế

giới và Việt Nam. Đối với gà Móng Tiên Phong trong thí nghiệm của chúng tôi không xác định được tần số alen HindIII- trong quần thể.

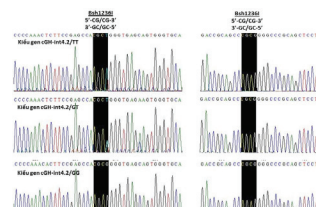
Như vậy, trên đối tượng gà Móng Tiên Phong đa hình tại 3 vị trí trên là khác nhau. Tính đa hình cao nhất ở vị trí G3037T trên đoạn gen cGH-int4, vị trí G1705A trên đoạn gen cGH-int3 có tính đa hình thấp hơn. Đặc biệt, chúng tôi không phát hiện tính đa hình ở vị trí 561 PCR nhân đoạn gen cGHR-int2. Vì vậy, việc nghiên cứu sàng lọc đánh giá đa hình kiểu gen liên kết với các tính trạng sản xuất cụ thể của gà là cần thiết trước khi đi sâu vào nghiên cứu ảnh hưởng của chúng đến các tính trạng quan tâm.

Kết quả giải trình tự gen cGH

Để khẳng định kết quả xác định đa hình kiểu gen bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP bởi các enzyme tương ứng như trên là chính xác và hơn nữa để đánh giá mức độ tương đồng về trình tự các đoạn gen này trong quần thể gà nghiên cứu, chúng tôi tiến hành giải trình tự các đoạn gen cGH-int3 và cGH-int4. Do trên đoạn gen cGHR-int2 không xác định được tính đa hình tại điểm nghiên cứu, nên chúng tôi không tiến hành giải trình tự đoạn gen này. Kết quả giải trình tự các đoạn gen cGH-int3 và cGH-int4 được thể hiện tương ứng trong hình 3 và 4.



Hình 3: sản phẩm giải trình tự 3 kiểu gen cGH-int3



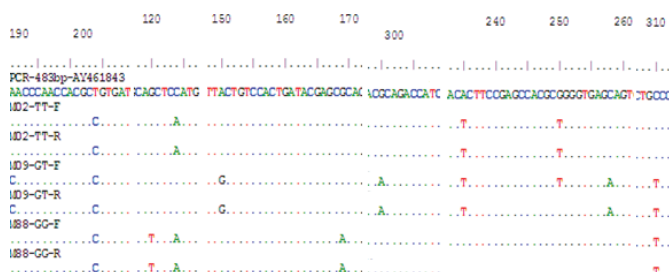
Hình 4: sản phẩm giải trình tự 3 kiểu gen cGH-int4

Kết quả giải trình tự các vùng cGH-int3 và cGH-int4 cho thấy, các vùng này được khuếch đại hoàn toàn đặc hiệu, các điểm đa hình được xác định tại vị trí G1705A thuộc intron 3 gen cGH [3] là hoàn toàn chính xác và phù hợp với các điểm cắt bởi enzyme giới hạn EcoRV; điểm đa hình tại vị trí G3037T thuộc intron 4 của gen cGH [3] cũng hoàn toàn chính xác và phù hợp với điểm cắt bởi enzyme giới hạn Bsh1236I.

Nhằm đánh giá mức độ tương đồng về trình tự các đoạn gen này trên quần thể gà Móng Tiên Phong nghiên cứu, chúng tôi tiến hành so sánh trình tự cGH-int3 và cGH-int4 của gà Móng Tiên Phong với các trình tự tương ứng lấy từ Ngân hàng gen thế giới (AY461843). Kết quả được thể hiện trong hình 5 và hình 6.



Hình 5: kết quả so sánh trình tự 3 kiểu gen cGH-int3 với trình tự đoạn gen cGH lấy từ Ngân hàng gen thế giới (AY461843)



Hình 6: kết quả so sánh trình tự 3 kiểu gen cGH-int4 với trình tự đoạn gen cGH lấy từ Ngân hàng gen thế giới (AY461843)

Phân tích kết quả so sánh này, chúng tôi nhận thấy: (1) Mức độ tương đồng nucleotide khá cao trong trình tự các đoạn gen cGH-int3 và 4 ở gà Móng Tiên Phong; (2) Bên cạnh điểm đa hình đã được biết đến, chúng tôi còn phát hiện một số điểm đa hình khác ở cGH-int3 và cGH-int4 khi so sánh với trình tự gen đã công bố trên Ngân hàng gen thế giới (AY461843). Cụ thể, trên đoạn gen cGH-int3, các đột biến điểm A239G, G247A và G251A xảy ra ở cả 3 kiểu gen GG, AG và AA. Ngoài ra, ở kiểu gen GG xuất hiện 2 đột biến điểm C129T và A189T, trong khi các kiểu gen AA và AG xuất hiện đột biến điểm ở 2 vị trí khác là G133A và T143C. Tương tự, đối với đoạn gen cGH-int 4, đều phát hiện đột biến thay thế T204C trên cả ở 3 kiểu gen TT, TG và GG; (3) Trong 2 vùng gen cGH-int3 và cGH-int4, đa số các đột biến điểm đều là sự thay thế nucleotide trong cùng nhóm (purine - giữa A và G hoặc pyrimidine - giữa T và C). Ngoài ra, xuất hiện một đột biến thay thế khác nhóm từ purine (A) sang pyrimidine (T) ở kiểu gen TT và TG trên đoạn gen cGH-int4 tại vị trí A235T và ở kiểu gen GG trên đoạn gen cGH-int3 tại vị trí A164T.

Kết luận

Locus cGH-int3 (sử dụng enzyme EcoRV) xuất hiện cả 3 kiểu gen (GG, GA và AA) trong quần thể gà Móng Tiên Phong, tuy nhiên tính đa hình thấp với tần số alen G là 0,92, tần số alen A là 0,08.

Locus cGH-int4 (sử dụng enzyme Bsh1236I) xuất hiện cả 3 kiểu gen (TT, TG và GG) trong quần thể với tính đa hình cao. Tần số các kiểu gen tương ứng lần lượt là 0,361; 0,213 và 0,426. Tần số alen G và T tương ứng được tính toán là 0,468 và 0,532.

Locus cGHR-int2 (sử dụng enzyme HindIII) đã không phát hiện tính đa hình trên đoạn gen này với 100% cá thể gà nghiên cứu mang kiểu gen HindIII+/+.

Tài liệu tham khảo

- [1] M. Tanaka, Y. Hosokawa, M. Watahiki, K. Nakashima (1999), "Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region", *Gene*, (112), pp.235-239.
- [2] Xiaopeng Feng (1996), "Chicken growth hormone receptor and growth hormone: search for genetic variants which affect commercially important traits", *Thesis of Doctor of Philosophy*, Department of Animal Science, Macdonald Campus of McGill University, Quebec.
- [3] Q. Nie, B. Sun, D. Zhang, C. Luo, N.A. Ishag, M. Lei, G. Yang, X. Zhang (2005), "High Diversity of the Chicken Growth Hormone Gene and Effects on Growth and Carcass Traits", *Oxford Journals*, 96(6), pp.698-703.
- [4] Lau Suk Ling, Joanna (2005), "Molecular characterization of the chicken growth hormone receptor gene", *The degree of Doctor of Philosophy* The University of Hong Kong, pp.2-17.
- [5] M. Lei, C. Luo, X. Peng, M. Fang, Q. Nie, D. Zhang, G. Yang, X. Zhang (2007), "Polymorphism of Growth- Correlated Genes Associated with Fatness and Muscle Fiber Traits in Chickens", *Poult Sci.*, (86), pp.835-842.
- [6] Muhammad Amrullah Pagala, Andi Murlina Tasse, Niken Ulupi (2015), "Association of cGH EcoRV Gene with Production in Tolaki Chicken", *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 24(7), pp.88-95.
- [7] Samaneh Gorji Makhsoos, Seyed Ziaeddin Mirhoseini, Mohammad Javadzami, Ali Niazi (2013), "Polymorphisms of Growth hormone gene in a native chicken population: Association with egg production", *Bull Vet Inst Pulawy*, (57), pp.73-77.
- [8] U. Kuhnlein, L. Ni, S. Weigend, J.S. Gavora, W. Fairfull, D. Zadworny (1997), "DNA Polymorphisms in the Chicken Growth Hormone Gene: Response to Selection for Disease Resistance and Association with Egg Production", *Anim Genet.*, 28, pp.116-123.
- [9] Mehdi Seyyedbabayi, Hamidreza Seyedabadi, Abolfazl Gorbani, Nosratalah Zarghami (2014), "Growth Hormone Receptor gene polymorphisms and its associations with some growth traits in West - Azarbaijan native chicken", *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, 3, pp.140-143.
- [10] Do Vo Anh Khoa, Nguyen Thi Kim Khang, Nguyen Trong Ngu, Joseph Matey, Huynh Thi Phuong Loan, Nguyen Thi Dieu Thuy (2013), "Single Nucleotide Polymorphisms in Gh, Ghr, Ghnr and Insulin Candidate Genes in Chicken Breeds of Vietnam", *Greener journal of Agricultural sciences*, 3(10), pp.716-724.
- [11] Đỗ Võ Anh Khoa (2014), "Đa hình di truyền C3199T của gen hoocmon tăng trưởng liên kết với các tính trạng năng suất thịt gà Tàu Vàng", *Tạp chí Khoa học công nghệ chăn nuôi*, 51, tr.57-64.
- [12] Lưu Quang Minh, Phạm Thị Phương Mai, Giang Thị Thanh Nhân, Trần Xuân Toàn (2016), "Tính đa hình SNPs trong 2 gen GH và GHR trên một số giống gà nuôi tại Việt Nam", *Tạp chí Khoa học công nghệ chăn nuôi*, 63, tr.14-19.
- [13] H. Li, W. Zhu, K. Chen, X. Wu, Q. Tang, Y. Gao (2008), "Associations between GHR and IGF-1 Gene Polymorphisms, and Reproductive Traits in Wenchang Chickens", *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 32, pp.281-285.
- [14] B. Enayati, G. Rahimi-Mianji (2011), "Genomic growth hormone, growth hormone receptor and transforming growth factor b-3 gene polymorphism in breeder hens of Mazandaran native fowls", *Afr. J. Biotechnol.*, 8(14), pp.3154-3159.

Nghiên cứu ảnh hưởng của cách phối hợp bột lá keo giậu vào khẩu phần ăn đến năng suất và chất lượng trứng của gà đẻ bố mẹ giống Lương Phượng

Từ Quang Hiên^{1*}, Trần Thị Hoan¹, Từ Quang Trung²

¹Trường Đại học nông lâm Thái Nguyên

²Trường Đại học sư phạm Thái Nguyên

Ngày nhận bài 10/10/2016, ngày chuyển phản biện 12/10/2016, ngày nhận phản biện 9/11/2016, ngày chấp nhận đăng 21/11/2016

Mục đích của nghiên cứu này là xác định ảnh hưởng của cách thức phối hợp bột lá keo giậu (BLKG) vào khẩu phần ăn đến năng suất và chất lượng trứng của gà đẻ bố mẹ giống Lương Phượng. Nghiên cứu được thực hiện với 270 gà mái đẻ, chia làm 3 lô, mỗi lô 90 con (30 x 3 lần nhắc lại), trong 120 ngày, bắt đầu lúc gà 31 tuần tuổi (tuần đẻ 9). Lô đối chứng (ĐC) được cho ăn khẩu phần cơ sở (KPCS) không có BLKG, khẩu phần này có mức năng lượng trao đổi (ME) và tỷ lệ protein thô (CP) theo tiêu chuẩn (2.750 kcal ME/kg và 17% CP). Lô thí nghiệm 1 (TN1) được cho ăn thức ăn theo cách phối hợp thứ 1 (cách 1), đó là thức ăn có chứa 6% BLKG, cân đối mức ME và CP ngang bằng lô ĐC (2.750 kcal và 17% CP). Lô TN2 được cho ăn thức ăn theo cách phối hợp thứ 2 (cách 2), đó là khẩu phần ăn gồm có 6% BLKG và 94% KPCS, không cân đối lại ME và CP theo KPCS. Kết quả cho thấy: cả 2 cách phối hợp BLKG vào khẩu phần đều có tác động tốt đến gà đẻ bố mẹ, các chỉ tiêu chính (năng suất trứng/mái bình quân, tỷ lệ gà con loại I/trứng ấp, tiêu tốn thức ăn/gà con loại I) đều sai khác rõ rệt so với lô ĐC. Cách phối hợp thứ nhất có năng suất trứng cao hơn so với cách thứ 2 với sự sai khác rõ rệt. Tuy nhiên, chỉ tiêu quan trọng hàng đầu là tỷ lệ gà con loại I/trứng ấp thì sai khác không có ý nghĩa thống kê. Do đó, trong điều kiện nông hộ có thể phối hợp theo cách thứ 2, vì nó đơn giản, dễ thực hiện.

Từ khóa: bột lá keo giậu, cân đối ME và CP, khẩu phần cơ sở.

Chỉ số phân loại 4.2

Đặt vấn đề

Sắc tố tuy chỉ có hàm lượng rất nhỏ trong thức ăn (tính bằng mg/kg) nhưng nó có vai trò sinh học quan trọng đối với cơ thể vật nuôi. Nó làm tăng tỷ lệ nuôi sống đối với cá con; tăng tỷ lệ đậu thai, tỷ lệ nuôi sống sau sinh và sinh trưởng ở lợn; tăng khả năng sản xuất trứng và chất lượng trứng giống đối với gia cầm, đặc biệt nó làm tăng độ đậm màu của da, thịt và lòng đỏ trứng gà, đáp ứng thị hiếu người tiêu dùng [1-7]. Lá keo giậu có hàm lượng carotenoids tổng số vào khoảng trên dưới 1.000 mg/kg vật chất khô (VCK), trong đó caroten có khoảng 227-518 mg và xanthophyll chiếm khoảng 741-865 mg/kg VCK [8]. Chính vì vậy, đã có nhiều nghiên cứu sử dụng lá keo giậu trong chăn nuôi (gia súc nhai lại, lợn, thỏ, gia cầm). Tuy nhiên, cách thức phối hợp BLKG vào khẩu phần ăn của gà đẻ bố mẹ như thế nào còn ít được nghiên cứu. Đề tài này thử nghiệm hai cách thức phối hợp BLKG vào khẩu phần: i) Cách thứ nhất là phối hợp bột lá vào khẩu phần có sự cân đối lại ME và protein theo tiêu chuẩn; ii) Cách thứ hai là thay thế một phần thức ăn hỗn hợp bằng BLKG, không cân đối lại ME và protein. Xác định ảnh hưởng của hai cách phối hợp này đến năng suất và chất lượng trứng của gà đẻ bố mẹ giống Lương Phượng; từ kết quả thu được sẽ

đưa ra khuyến cáo trong sản xuất.

Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Gà đẻ bố mẹ giống Lương Phượng.

BLKG (*Leucaena leucocephala*).

Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm với 270 gà mái đẻ bố mẹ giống Lương Phượng ở 31 tuần tuổi (tuần đẻ 9), chia làm 3 lô, mỗi lô 90 con (30 con x 3 lần nhắc lại), tỷ lệ gà trống/mái là 1/7,5, thí nghiệm kéo dài 120 ngày tại Trung tâm Nghiên cứu và phát triển chăn nuôi miền núi - Viện Chăn nuôi (Thái Nguyên).

Lô ĐC được ăn KPCS, khẩu phần này có mức ME/kg và CP theo tiêu chuẩn của gà đẻ lông màu (2.750 kcal ME/kg và 17% protein). Lô TN1 được ăn khẩu phần có chứa 6% BLKG, cân đối ME và CP theo tiêu chuẩn (ngang bằng KPCS). Lô TN2 được ăn khẩu phần gồm 94% KPCS + 6% BLKG, không cân đối lại ME và CP theo tiêu chuẩn. Khẩu phần được phối hợp từ ngô vàng, cám mỳ, bột cá khô, dầu đậu tương và một số thức ăn bổ sung khác. Nguyên liệu và thức ăn hỗn hợp được phân tích các thành phần dinh dưỡng chính, carotenoids trước và sau khi phối hợp.

*Tác giả liên hệ: Email: tqhien.dhtn@moet.edu.vn

A study on the effects of *L. leucocephala* leaf meal supplement ways into the diets of Luong Phuong parent chickens on their egg productivity and quality

Summary

The aim of this study is to determine the influences of different supplement ways of the *Leucaena leucocephala* leaf meal to the diets of Luong Phuong parent chickens on their egg productivity and quality. Total of 270 Luong Phuong laying hens were divided into 3 groups with 90 hens per each group (30x3 replications). The experiment was carried out in 120 days, starting at 31 weeks of age (9 weeks of laying). The control group was fed a basal diet (BD) without *L. Leucocephala* leaf meal (LLM) and with a metabolic energy (ME) level and the rate of crude protein (CP) based on nutrition standards (2,750 kcal ME/kg and 17% CP). The experimental group 1 (Exp 1) was fed a diet containing 6% *L. leucocephala* leaf meal and the same ME and CP as the control group (2,750 kcal ME/kg and 17% CP). The experimental group 2 (Exp 2) was given a diet containing 6% *L. leucocephala* leaf meal and 94% basal diet but without the balanced ME and CP as the control group. The results showed that the both ways of supplementing LLM into the diets had good effects on the laying hens; the main indexes (egg productivity/hen, the newly hatched chick class 1/hatching egg, feed consumption/chick class 1) were significantly different in comparison with those of the control group. The egg productivity of Exp 1 was higher than that of Exp 2 with a significant difference. However, the most important index, that is newly hatched chick class 1/hatching egg, had no significant difference between the two groups. Nevertheless, in household farming conditions, it is possible to apply the way supplementing the diet with *L. leucocephala* leaf meal of Exp 2 because it is easy to implement.

Keywords: balanced ME and CP, basal diet, *Leucaena leucocephala* leaf meal.

Classification number 4.2

ME (kcal/kg), CP (%) và hàm lượng carotenoids (mg/kg) trong thức ăn của các lô lần lượt là 2.758, 17,13 và 8,8 (ĐC); 2.761, 17,13 và 30,56 (TN1); 2723, 17,59 và 30,65 (TN2).

Gà thí nghiệm được nuôi nhốt trên nền cỏ đệm lót, chăm sóc nuôi dưỡng theo quy trình đối với gà đẻ trứng lông màu.

Các chỉ tiêu theo dõi

Tỷ lệ nuôi sống, năng suất trứng, một số chỉ tiêu lý, hóa học của trứng, tỷ lệ trứng có phôi, ấp nở, gà con loại I, tiêu thụ và tiêu tốn thức ăn cho sản xuất trứng.

Phương pháp theo dõi các chỉ tiêu

Tỷ lệ nuôi sống: theo dõi số con còn sống theo từng ngày thí nghiệm của mỗi lô (được gọi là ngày gà), tổng số ngày gà của mỗi lô trong 120 ngày thí nghiệm bằng tổng ngày gà từ ngày 1 đến ngày thứ 120. Số mái bình quân bằng tổng số ngày gà chia cho thời gian thí nghiệm (120 ngày).

Năng suất trứng: thu trứng hàng ngày và chọn trứng đủ tiêu chuẩn trứng giống. Năng suất trứng/mái bình quân bằng tổng số trứng mỗi lô trong 120 ngày thí nghiệm chia cho số mái bình quân. Năng suất trứng giống/mái bình quân cũng tính tương tự như vậy.

Các chỉ tiêu lý học: khảo sát trứng 5 đợt (n = 5) vào các thời điểm 20, 40, 60, 80 và 100 ngày thí nghiệm; mỗi đợt khảo sát 5 quả/lô với các chỉ tiêu khối lượng trứng, lòng trắng, lòng đỏ và vỏ.

Các chỉ tiêu hóa học: phân tích trứng 5 lần (n = 5) ở cùng thời điểm và số lượng trứng/lô nêu trên với các chỉ tiêu vật chất khô, protein, lipid thô, carotenoids tại Viện Khoa học sự sống (Đại học Thái Nguyên) theo phương pháp được quy định trong Tiêu chuẩn phòng thí nghiệm Việt Nam.

Chất lượng trứng ấp (tỷ lệ trứng có phôi, ấp nở, gà con loại I): mỗi lô ấp 1.980 trứng (6 đợt x 330 quả/đợt). Trứng, khay ấp, khay nở của từng lô được đánh dấu riêng. Soi trứng ở ngày thứ 6 để xác định trứng có phôi, sau đó theo dõi số gà con nở ra và gà con loại I của từng lô.

Kết quả thí nghiệm được xử lý theo phương pháp thống kê sinh vật học của Nguyễn Văn Thiện và cs (2002) [9], xử lý thống kê ANOVA - GLM bằng phần mềm Minitab phiên bản 14.

Kết quả và thảo luận

Tỷ lệ nuôi sống

Trong 4 tháng thí nghiệm, mỗi lô chỉ chết 2-3/90 gà mái đẻ. Tuy nhiên, thời điểm gà chết ở mỗi lô có sự khác nhau nên số ngày gà của các lô có sự khác nhau, của lô ĐC là 10.008, lô TN1 là 10.028, còn lô TN2 là 9.996 ngày

gà. Từ đó dẫn tới số mái bình quân của các lô cũng khác nhau, lô ĐC là 89,36 con, TN1 là 89,54 con, còn TN2 là 89,25 con (bảng 1). Nhìn chung, khẩu phần có hay không có BLKG và phối hợp BLKG vào khẩu phần theo cách 1 hay cách 2 đều không ảnh hưởng đến tỷ lệ nuôi sống của gà thí nghiệm.

Bảng 1: tỷ lệ nuôi sống của gà thí nghiệm

Chỉ tiêu	Đơn vị	Lô ĐC	Lô TN1	Lô TN2
Tỷ lệ nuôi sống	%	96,67	97,78	96,69
Ngày gà/lô	Ngày	10.008	10.028	9.996
Số mái bình quân/lô	Con	89,36	89,54	89,25

Khả năng sản xuất trứng của gà thí nghiệm

Khả năng sản xuất trứng của gà thí nghiệm được thể hiện ở các chỉ tiêu như: tỷ lệ đẻ và năng suất trứng.

Tỷ lệ đẻ của lô TN1 và TN2 cao hơn đối chứng 6,33 và 5,03%, còn lô TN1 lớn hơn TN2 là 1,30% với sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Như vậy, cách thức phối hợp BLKG vào khẩu phần có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ đẻ của gà bố mẹ giống Lương Phượng.

Tỷ lệ đẻ của các lô khác nhau tất yếu dẫn đến sản lượng và năng suất trứng khác nhau. Sản lượng trứng của lô TN1 và TN2 nhiều hơn ĐC là 648 và 495 quả, còn lô TN1 lớn hơn TN2 là 153 quả. Năng suất trứng/mái bình quân của lô TN1 và TN2 lớn hơn ĐC lần lượt là 7,09 quả (9,62%) và 5,64 quả (7,65%), còn của lô TN1 lớn hơn TN2 là 1,45 quả (1,97%) với sự sai khác rõ rệt ($p < 0,05$). Do tỷ lệ trứng giống của 3 lô gà gần tương đương nhau (96,28; 96,64 và 96,72%), nên năng suất trứng giống/mái bình quân có cùng diễn biến tương tự như năng suất trứng/mái bình quân (TN1, TN2 lớn hơn ĐC và TN1 lớn hơn TN2 với sự sai khác rõ rệt). Kết quả về khả năng sản xuất trứng của gà thí nghiệm được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2: năng suất và sản lượng trứng của các lô thí nghiệm

Chỉ tiêu	Đơn vị	Lô ĐC	Lô TN1	Lô TN2
Tỷ lệ đẻ	%	65,82 ^a	72,15 ^b	70,85 ^c
Sản lượng trứng/lô	Quả	6.587	7.235	7.082
Năng suất trứng/mái bình quân	Quả	73,71 ^a	80,80 ^b	79,35 ^c
So sánh	%	100,00	109,62	107,65
Tỷ lệ trứng giống	%	96,28 ^a	96,64 ^b	96,72 ^b
Số lượng trứng giống/lô	Quả	6.342	6.992	6.850
Năng suất trứng giống/mái bình quân	Quả	70,97 ^a	78,09 ^b	76,75 ^c
So sánh	%	100,00	110,03	108,15

Ghi chú: theo hàng ngang, các số liệu mang chữ cái khác nhau thì sai khác giữa chúng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Kết quả trên chứng tỏ BLKG có ảnh hưởng tốt đến khả năng sản xuất trứng của gà mái đẻ. Kết quả này khẳng định lại các kết quả nghiên cứu trước đây của Từ Quang Hiền và cs [10].

Cách thức phối hợp BLKG vào khẩu phần có ảnh hưởng không lớn đến khả năng sản xuất trứng của gà mái đẻ. Cách thức nhất do khẩu phần được cân đối ME theo tiêu chuẩn và dùng dầu thực vật để bổ sung năng lượng nên có

ảnh hưởng tốt hơn cách thứ 2. Tuy nhiên, sự thiếu hụt ME trong thức ăn theo cách phối hợp thứ 2 cũng không nhiều so với tiêu chuẩn, bù lại tỷ lệ protein thô lại cao hơn tiêu chuẩn. Do đó, lô này vẫn có khả năng sản xuất trứng cao hơn so với lô ĐC và thua kém không lớn so với lô TN1.

Thành phần lý, hóa học của trứng

Một số chỉ tiêu lý học của trứng như khối lượng trứng, lòng trắng, lòng đỏ và vỏ trứng đã được khảo sát. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: một số chỉ tiêu lý học của trứng

Chỉ tiêu	Đơn vị	Lô ĐC	Lô TN1	Lô TN2
Khối lượng lượng trứng	g	55,988	56,488	56,364
Khối lượng lòng trắng	g	32,178	32,425	32,439
Khối lượng lòng đỏ	g	17,240	17,546	17,417
Khối lượng vỏ	g	6,570	6,517	6,508
Tỷ lệ lòng trắng	%	57,47	57,40	57,55
Tỷ lệ lòng đỏ	%	30,79	31,06	30,90
Tỷ lệ vỏ	%	11,74	11,54	11,55

Nhìn chung, khẩu phần có hay không có bột lá, phối hợp bột lá theo cách thứ 1 hay cách thứ 2 đều không ảnh hưởng lớn đến khối lượng của trứng, lòng trắng, lòng đỏ và vỏ trứng, các chỉ tiêu này của 3 lô gần tương đương nhau và không sai khác nhau rõ rệt ($p > 0,05$).

Kết quả phân tích thành phần hóa học trứng cho thấy VCK, CP và lipit trong lòng đỏ trứng của lô TN1 và TN2 có xu hướng tăng hơn so với lô ĐC nhưng chỉ có VCK và CP là có sự sai khác rõ rệt so với ĐC ($p < 0,05$). Cụ thể là VCK tăng 0,80 và 0,84%, CP tăng 0,52 và 0,53%, tương ứng với TN1 và TN2. Các chỉ tiêu này của lòng trắng trứng không có xu hướng như vậy, chúng gần tương đương nhau (bảng 4).

Bảng 4: một số chỉ tiêu hóa học của trứng

Chỉ tiêu	Đơn vị	Lô ĐC	Lô TN1	Lô TN2
a) Lòng đỏ				
VCK	%	50,62 ^a	51,42 ^b	51,46 ^b
CP	%	16,25 ^a	16,77 ^b	16,78 ^b
Lipit thô	%	32,51	32,74	32,84
Carotenoids	mg % VCK	13,68 ^a	40,13 ^b	39,65 ^b
b) Lòng trắng				
VCK	%	13,10	13,10	13,04
CP	%	11,35	11,43	11,34
Lipit thô	%	0,225	0,226	0,225

Carotenoids trong lòng đỏ trứng của lô TN1 và TN2 cao hơn lô ĐC là 26,45 và 25,97 mg % VCK lòng đỏ với sự sai khác rõ rệt ($p < 0,05$). Gouveia và cs [11], Goodwin [12] cho biết, carotenoids sẽ được huy động đến buồng trứng khi thành thực và tích tụ trong lòng đỏ; kết quả trên đã khẳng định lại thông tin này. Carotenoids trong lòng đỏ trứng của lô TN1 có xu hướng cao hơn nhưng không rõ rệt so với TN2. Điều này có thể do thức ăn của lô TN1 có bổ sung thêm dầu thực vật, mà dầu, mỡ là môi trường tốt cho việc hấp thu carotenoids.

Kết quả theo dõi chất lượng trứng ấp

Chất lượng trứng giống được đánh giá bằng các chỉ tiêu như tỷ lệ trứng có phôi, ấp nở, gà con loại I và chỉ tiêu đánh giá tổng hợp từ các chỉ tiêu nêu trên là tỷ lệ gà con loại I/ trứng ấp. Kết quả theo dõi các chỉ tiêu này được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: chất lượng trứng ấp

Chỉ tiêu	Đơn vị	Lô ĐC	Lô TN1	Lô TN2
Số lượng trứng ấp	Quả	1.980	1.980	1.980
Số lượng trứng có phôi	Quả	1.799	1.866	1.858
Số lượng trứng ấp nở	Quả	1.676	1.805	1.795
Số lượng gà con loại I	Con	1.652	1.779	1.762
Tỷ lệ phôi	%	90,86 ^a	94,24 ^b	93,84 ^b
Tỷ lệ nở	%	93,16 ^a	96,73 ^b	96,61 ^b
Tỷ lệ gà con loại I/ấp nở	%	98,57 ^a	98,56 ^a	98,16 ^a
Tỷ lệ gà con loại I/trứng ấp	%	83,43 ^a	89,95 ^b	88,99 ^b

Tỷ lệ trứng có phôi của lô TN1 và TN2 cao hơn lô ĐC là 3,38 và 2,98%, còn tỷ lệ trứng ấp nở thì cao hơn 3,57 và 3,45% với sự sai khác rõ rệt ($p < 0,05$). Tỷ lệ gà con loại I/ấp nở của 3 lô tương đương nhau và không sai khác rõ rệt ($p > 0,05$). Tỷ lệ gà con loại I/trứng ấp của lô TN1 và TN2 lớn hơn lô ĐC là 6,52 và 5,56% với sự sai khác rõ rệt ($p < 0,05$). Các chỉ tiêu trên của lô TN1 đều lớn hơn TN2 nhưng không có sự sai khác rõ rệt ($p > 0,05$). Tuy nhiên, sự lặp đi lặp lại ở cả 3 chỉ tiêu này có thể không phải là sự trùng lặp ngẫu nhiên mà phần nào đó có tác động của cách thức phối hợp BLKG vào khẩu phần. Bởi vì, năng lượng trao đổi và carotenoid trong 1 kg thức ăn của lô TN1 đều lớn hơn lô TN2.

Tiêu tốn thức ăn cho sản xuất trứng và gà con loại I

Căn cứ vào sản lượng trứng, trứng giống (bảng 2), tỷ lệ trứng có phôi, ấp nở, gà con loại I (bảng 5) và lượng thức ăn tiêu thụ của mỗi lô để tính tiêu tốn thức ăn cho 10 trứng, 10 trứng giống và 1 gà con loại I. Kết quả được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6: tiêu tốn thức ăn cho sản xuất trứng và gà con loại I

Chỉ tiêu	Đơn vị	Lô ĐC	Lô TN1	Lô TN2
Tiêu tốn thức ăn/lô	kg	1.501,2	1.504,0	1.499,0
Tiêu tốn thức ăn/10 trứng	kg	2,279 ^a	2,079 ^b	2,117 ^c
So sánh	%	100	91,22	92,89
Tiêu tốn thức ăn/10 trứng giống	kg	2,367 ^a	2,151 ^b	2,189 ^c
So sánh	%	100	90,87	92,48
Tiêu tốn thức ăn/1 gà con loại I	kg	0,284 ^a	0,239 ^b	0,246 ^c
So sánh	%	100	84,15	86,62

Tiêu thụ thức ăn của 3 lô gần tương đương nhau nên lô nào có sản lượng trứng cao hơn thì tiêu tốn thức ăn cho sản xuất trứng thấp hơn. Sản lượng trứng (bảng 2) của lô TN1 cao hơn lô TN2 và của lô TN2 cao hơn ĐC, vì vậy tiêu tốn thức ăn/10 trứng và 10 trứng giống của lô TN1 thấp nhất,

sau đó đến lô TN2 và cuối cùng là lô ĐC. Tiêu tốn thức ăn cho 10 trứng của lô TN1 và TN2 thấp hơn lô ĐC là 8,78 và 7,11%, còn cho 10 trứng giống thì thấp hơn là 9,13 và 7,25%, chênh lệch này có sự sai khác rõ rệt ($p < 0,05$).

Tiêu tốn thức ăn/1 gà con loại I không chỉ phụ thuộc vào tiêu tốn thức ăn cho sản xuất trứng giống mà còn phụ thuộc vào chất lượng trứng ấp, cụ thể là tỷ lệ gà con loại I/ trứng ấp. Tỷ lệ này của lô TN1 đạt cao nhất, sau đó đến lô TN2 và cuối cùng là lô ĐC (xem bảng 5), do đó tiêu tốn thức ăn/1 gà con loại I của lô TN1 cũng thấp nhất, sau đó đến lô TN2 và cao nhất là lô ĐC.

Kết luận

Trong hai cách phối hợp BLKG vào khẩu phần ăn thì cách thứ nhất có các chỉ tiêu năng suất trứng và trứng giống/mái bình quân cao hơn so với cách thứ 2 với sự sai khác có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, tỷ lệ gà con loại I/ trứng ấp của hai lô lại không có sự sai khác nhau rõ rệt. Mặt khác, lô TN2 có hầu hết các chỉ tiêu về năng suất và chất lượng trứng cao hơn và tiêu tốn thức ăn cho sản xuất trứng và gà con loại I thấp hơn so với lô ĐC với sự sai khác rõ rệt. Do đó, trong điều kiện nông hộ có thể phối hợp theo cách thứ 2, vì nó đơn giản, dễ thực hiện.

Tài liệu tham khảo

- [1] R. Aquis, T. Watanabe, S. Satoh, V. Kiron, H. Imaizumi, T. Yamazaki, K. Kawano (2001), "Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for broodstock yellowtail", *Aquaculture Research*, **32**(1), pp.263-272.
- [2] T. Latscha (1990), *Carotenoids in Animal Nutrition*, F. Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland.
- [3] U. Luzzano, M. Scolari, M. Grispan, L. Papi, J. Dore (2003), "Haematococcus pluvialis algae meal as a natural source of astaxanthin for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pigmentation", *Presented at the Acquacultura International trade show for aquaculture*, Verona, Italy.
- [4] S.D. Sidibè (2001), "Untersuchungen an Leghennen zur Eidotter pigmentierung mit Citranaxanthin und Canthaxanthin", *Agricultural Thesis*, University of Hohenheim, Germany.
- [5] F. Sirri, N. Iaffaldano, G. Minelli, A. Meluzzi, M.P. Rosato, A. Franchini (2007), "Comparative pigmentation efficiency of high dietary levels of apoester and marigold extract on quality traits of whole liquid egg of two strains of laying hens", *J. Appl. Poultry Res*, **16**, pp.429-437.
- [6] T. Watanabe, R. Vassallo-Auis (2003), "Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan", *Aquaculture*, **227**(1-4), pp.75-88.
- [7] W.D. Williams (1992), "Origin and impact of color on consumer preference for food", *Poultry Science*, **71**, pp.744-746.
- [8] Từ Quang Hiền, Trần Văn Phùng, Phan Đình Thắm, Trần Thanh Vân, Từ Trung Kiên (2013), *Dinh dưỡng và thức ăn chăn nuôi*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
- [9] Nguyễn Văn Thiện, Nguyễn Khánh Quắc, Nguyễn Duy Hoan (2002), *Giáo trình phương pháp nghiên cứu trong chăn nuôi*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
- [10] Từ Quang Hiền, Nguyễn Đức Hùng, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Inh (2008), *Nghiên cứu sử dụng keo giậu (Leucaena) trong chăn nuôi*, Nxb Đại học Thái Nguyên.
- [11] L. Gouveia, V. Veloso, A. Reis, H. Fernandes, J. Novais, J. Empis (1996), "Chlorella vulgaris used to colour egg yolk", *J. Sci. Food Agric.*, **10**, pp.167-172.
- [12] T.W. Goodwin (1986), "Metabolism, nutrition and function of

Nghiên cứu cải tiến quy trình thu nhận chitin từ phế liệu tôm bằng kết hợp xử lý nhiệt và tẩy màu

Nguyễn Công Minh¹, Nguyễn Văn Hòa², Phạm Thị Đan Phượng², Trang Sĩ Trung^{2*}

¹Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

²Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nha Trang

Ngày nhận bài 16/6/2016, ngày chuyển phản biện 24/6/2016, ngày nhận phản biện 13/7/2016, ngày chấp nhận đăng 20/7/2016

Nghiên cứu được thực hiện nhằm rút ngắn thời gian và nâng cao chất lượng của chitin thu nhận từ vỏ tôm, đồng thời giúp kiểm soát tốt quá trình gia nhiệt và khử màu trong quá trình tách chiết chitin. Phế liệu vỏ tôm được xử lý qua 3 giai đoạn: (i) khử khoáng với dung dịch HCl 4%, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch acid 1/5 (w/v) ở 50°C trong 10 giờ; (ii) khử protein với dung dịch NaOH 3%, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch 1/5 (w/v) ở 70°C trong 12 giờ, (iii) khử màu với dung dịch H₂O₂ 0,5%, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch 1/15 (w/v) ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Sản phẩm chitin thu được có độ deacetyl thấp (7,2%) với khối lượng phân tử trung bình (1076 kDa), cùng hàm lượng protein (0,73%) và khoáng (0,86%) còn lại rất nhỏ, đảm bảo tiêu chuẩn sử dụng cho thương mại.

Từ khóa: chitin, khử khoáng, khử màu, khử protein, phế liệu tôm, tách chiết chitin.

Chỉ số phân loại 4.5

Improvement of chitin quality from shrimp wastes by the combination of heat treatment and decolorization

Summary

This study aims to reduce reaction time but improve the chitin quality in the isolation of chitin from shrimp shells as well as control properly reaction temperature and decolorization. The raw shrimp shells was treated by three steps: (i) demineralization in 4% HCl solution with raw material/solution ratio of 1/5 (w/v) at 50°C for 10 hours, (ii) deproteinization in 3% NaOH solution with raw material/solution ratio of 1/5 (w/v) at 70°C for 12 hours, (iii) decolorization in 0.5% H₂O₂ solution with raw material/solution ratio of 1/15 (w/v) at room temperature for 12 hours. The as-prepared chitin has low acetyl degree of 7.2 % with medium molecular weight of 1076 kDa. The protein (0.73 wt.%) and mineral (0.86 wt.%) contents are acceptable for using as a commercial chitin product.

Keywords: chitin, decolorization, demineralization, deproteinization, extraction of chitin, shrimp wastes.

Classification number 4.5

Đặt vấn đề

Chitin là polymer sinh học được tạo thành từ các đơn phân N-acetyl-β-D-glucosamin liên kết với nhau qua liên kết β-1,4-glucosid. Chitin có trong thành phần cấu tạo của vỏ tôm, vỏ cua, vỏ ghẹ, côn trùng và một số loài nấm [1]. Trong tự nhiên, chitin là nguồn polysaccharide nhiều thứ hai sau cellulose [2]. Chitin trong vỏ tôm thuộc nhóm α-chitin, liên kết bền vững với các thành phần khác như protein, lipid, khoáng và chất màu. Do đó, để thu nhận chitin từ vỏ tôm cần sử dụng các quá trình loại bỏ các thành phần nêu trên bao gồm khử khoáng, khử protein và khử màu [1, 2].

Các phương pháp phổ biến để thu nhận chitin từ vỏ tôm là phương pháp hóa học, phương pháp sinh học hoặc kết hợp phương pháp hóa học với sinh học [1, 3, 4]. Mỗi phương pháp trên đều có ưu và nhược điểm riêng. Khi xử lý bằng phương pháp hóa học, quá trình khử protein tiến hành với dung dịch kiềm, khử khoáng với dung dịch acid loãng, trong khi khử màu thường sử dụng các loại dung môi hữu cơ kết hợp với các chất có tính oxy hóa (KMnO₄, H₂O₂...) hoặc sử dụng ánh sáng mặt trời [3].

*Tác giả liên hệ: Email: trungts@ntu.edu.vn

Hiện nay, việc thu nhận chitin từ phế liệu tôm tại Việt Nam thường không sử dụng nâng nhiệt nên thời gian xử lý bằng NaOH để khử protein dài từ 2-3 ngày, khử khoáng bằng HCl từ 1-2 ngày. Tuy nhiên, khi nâng nhiệt quá cao và không được kiểm soát thì dù có rút ngắn thời gian xử lý nhưng vẫn ảnh hưởng lớn đến chất lượng chitin. Mặt khác, đối với quá trình tẩy màu thì thường dùng hoá chất, phổ biến nhất là chlorine mà không kiểm soát tốt điều kiện xử lý nên cũng ảnh hưởng lớn đến chất lượng chitin thu được.

Trên thế giới, đã có nhiều công bố về sử dụng phương pháp hóa học kết hợp gia nhiệt để thu nhận chitin từ vỏ tôm. Theo Kim và cộng sự [2], quá trình khử protein trong vỏ tôm được tiến hành trong dung dịch NaOH hoặc KOH 1-10% ở 30-100°C. Còn No và cộng sự [4] cho rằng, để đạt yêu cầu về chất lượng chitin cần áp dụng các chế độ khử protein và khử khoáng riêng cho từng loại nguyên liệu [5]. Kết quả tương tự đối với nghiên cứu của Shahidi và cộng sự [6]. Khi xử lý vỏ tôm trong dung dịch KOH 1-2% ở 90°C, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch kiềm 1/20 (w/v) trong 1 giờ có thể khử 90% protein. Theo Whistler và cộng sự [5], chiết tách chitin từ vỏ tôm bằng dung dịch NaOH 10% ở 100°C sẽ rút ngắn đáng kể thời gian của quy trình sản xuất chitin - chitosan. Các công bố trên đã cho biết ảnh hưởng của nồng độ chất phản ứng và nhiệt độ đến thời gian tách chiết và chất lượng sản phẩm chitin thu được. Tuy nhiên, các công bố này mới chỉ tập trung vào khảo sát các công đoạn riêng lẻ. Mặt khác, khi tiến hành phản ứng ở nhiệt độ cao trong thời gian dài sẽ dẫn đến quá trình cắt mạch chitin [1, 3]. Hơn nữa, một lượng lớn hóa chất sử dụng cho các quá trình khử protein, khoáng và chất màu cũng sẽ hạn chế ứng dụng của các quy trình trên vào thực tế sản xuất công nghiệp.

Từ những vấn đề nêu trên, nghiên cứu này sẽ khảo sát một cách hệ thống ảnh hưởng của nồng độ chất phản ứng và nhiệt độ đến thời gian tách chiết và chất lượng sản phẩm chitin thu được. Từ đó, lựa chọn điều kiện thích hợp để có thể ứng dụng trong sản xuất công nghiệp vừa rút ngắn thời gian, giảm lượng hóa chất sử dụng nhưng vẫn thu được sản phẩm chitin đạt chất lượng tốt.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu đầu vỏ tôm được thu nhận tại Công ty cổ phần chế biến thủy sản (F17) Nha Trang, Khánh

Hòa. Nguyên liệu được vận chuyển lạnh về phòng thí nghiệm bằng dụng cụ cách nhiệt và bảo quản ở -20°C đến khi tiến hành thí nghiệm.

Quá trình khử khoáng, protein và màu

Trong quá trình khử khoáng, 50 kg bã vỏ tôm được ngâm chiết với dung dịch HCl (2, 3, 4%) ở 30, 50, 70°C trong 2-16 giờ với tỷ lệ bã rắn/dung dịch là 1/5. Trong quá trình khử protein, nguyên liệu được ngâm với dung dịch NaOH (2, 3, 4, 5%) ở 30, 50, 70, 90°C trong 6-27 giờ với tỷ lệ rắn/dung dịch là 1/5. Quá trình khử màu được tiến hành với H₂O₂ (0,1; 0,3; 0,5; 0,7 và 0,9%) trong 4-24 giờ với các tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch khác nhau.

Xác định hàm lượng khoáng, độ ẩm, lipid và protein

Hàm lượng khoáng, độ ẩm của vỏ tôm và chitin được xác định theo phương pháp chuẩn của AOAC [7] ở 105 và 550°C. Hàm lượng lipid trong nguyên liệu vỏ tôm được phân tích theo phương pháp Folch [8].

Hàm lượng protein trong nguyên liệu vỏ tôm và trong chitin được xác định bằng phương pháp Biuret [9, 10]. Nguyên liệu (vỏ tôm, chitin) được ủ trong dung dịch NaOH 3% ở 80°C trong 8 giờ. Sau khi ủ, tiến hành lọc và rửa bằng 15 ml NaOH 3% và định mức dịch lọc đến một thể tích nhất định. Dịch lọc sau ly tâm được phản ứng với thuốc thử Biuret trong 15 phút ở nhiệt độ phòng và đo phổ UV-Vis ở bước sóng 570 nm. Hàm lượng protein của mẫu chitin - chitosan được xác định theo công thức sau:

$$\text{Protein(\%)} = \frac{V_1(\text{ml}) \times C(\text{mg/ml})}{w(\text{g}) \times \frac{(100-MC)}{100} \times 100 (\text{mg/g})}$$

Trong đó, V_1 là thể tích dịch lọc (ml), C là hàm lượng protein tính theo đường chuẩn Biuret (mg/ml), w là khối lượng mẫu ủ (g), MC là độ ẩm của mẫu (%).

Xác định hàm lượng chitin

Phân tích hàm lượng chitin trong nguyên liệu vỏ tôm được xác định theo công bố trước đây [11]. Cân 2 g vỏ tôm cho vào bình chứa 50 ml HCl 1 M trong thời gian 1 giờ ở 80°C, sau quá trình xử lý với acid, nguyên liệu được rửa đến trung tính và xử lý tiếp tục với 100 ml NaOH 1 M trong thời gian 1 giờ ở 90°C trong bể ổn nhiệt, bã sau xử lý acid và kiềm được rửa lại 2 lần với 15 ml acetone và sấy khô sản phẩm ở 110°C đến

trọng lượng không đổi. Hàm lượng chitin được tính theo công thức:

$$CT(\%) = \frac{m_2 \times 100}{m_1 \times \frac{100-MC}{100}}$$

Trong đó, m_1 , m_2 là khối lượng nguyên liệu trước và sau khi sấy. MC là độ ẩm của nguyên liệu ban đầu.

Xác định hàm lượng astaxanthin

Hàm lượng astaxanthin trong nguyên liệu vỏ tôm và trong chitin được xác định theo phương pháp [12, 13]. Nguyên liệu được đồng hóa trong hệ dung môi hexan/isopropanol 3/2 (v/v). Sau đó, lọc để loại phần bã và bổ sung thêm 12 ml eter dầu mỏ, 10 ml nước muối sinh lý (0,9%) vào phần dịch lọc, lắc nhẹ bình chiết và để yên trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Thu nhận pha trên và cô quay chân không ở 40°C để bay hơi dung môi. Hòa tan mẫu sau cô quay với eter dầu mỏ và định mức lên 10 ml, đo độ hấp thụ của dung dịch ở 468 nm (A468). Hàm lượng astaxanthin được tính theo công thức của Simpson và Haard [13]:

$$C(\mu g/g) = \frac{A_{468}}{0,2G}$$

Trong đó, C là hàm lượng astaxanthin trong mẫu ($\mu g/g$ mẫu), A là độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 468 nm, V là thể tích mẫu chiết (ml), D là hệ số pha loãng, G là trọng lượng mẫu khô (g), 0,2 là độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 468 nm của astaxanthin chuẩn 1 $\mu g/ml$.

Xác định độ deacetyl

Độ deacetyl chitin được xác định theo phương pháp của Tao và Svetlana [14]. Chitin được hòa tan trong H_3PO_4 đậm đặc trong 40 phút ở 60°C. Sau đó pha loãng dung dịch với nước (pha loãng 10 lần) và tiến hành ở 60°C trong 2 giờ rồi đo độ hấp phụ quang học ở bước sóng 210 nm. Độ deacetyl của chitin được xác định theo công thức:

$$DD = 100 * \left[1 - \frac{mMGlCNAC}{mMGlCNAC + mMGlC} \right]$$

$$mMGlC = \frac{W - (mMGlCNAC * 0,2032)}{0,16117}$$

Trong đó, DD là độ deacetyl của chitin, W là khối lượng của mẫu, $mMGlCNAC$ là hàm lượng NAC Glc tính theo đường chuẩn, $mMGlC$ là hàm lượng glucosamine.

Xác định trọng lượng phân tử trung bình của chitin

Trọng lượng phân tử trung bình của chitin được xác định theo phương pháp đo độ nhớt nội [15]. Chitin được hòa tan trong dung dịch NaOH 10%, độ nhớt nội của dung dịch chitin được xác định qua hệ mao quản của nhớt kế Ostwald. Phân tử lượng trung bình của chitin được xác định theo công thức:

$$\mu = KM^a$$

Trong đó, μ là độ nhớt nội của dung dịch chitin; K và a là các hằng số phụ thuộc vào dung môi, $K = 0,1a = 0,68$ (đối với NaOH 10%); M là trọng lượng phân tử trung bình của chitin.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu báo cáo là kết quả của 3 lần phân tích và được xử lý thống kê với phần mềm Minitab và các đồ thị được biểu diễn bằng phần mềm Origin 8.0.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Thành phần nguyên liệu và sản phẩm

Kết quả phân tích thành phần hóa học của nguyên liệu đầu vỏ tôm và sản phẩm chitin thu được trước và sau khi khử màu được trình bày trong bảng 1. Theo đó, thành phần hóa học của vỏ tôm chủ yếu chứa protein (45,2%), khoáng (21,5%), chitin (17,2%) và một số thành phần khác như lipid và chất màu. Protein trong nguyên liệu vỏ tôm chủ yếu là phần thịt còn sót lại ở vỏ tôm và một phần protein liên kết trong cấu trúc chitin. Chất khoáng trong vỏ tôm chủ yếu là $CaCO_3$, $Ca_3(PO_4)_2$ và một số muối vô cơ khác. Thông thường phần khoáng này sẽ bị hòa tan khi xử lý với dung dịch HCl, tuy nhiên lượng nhỏ khoáng liên kết sâu trong cấu trúc chitin rất khó tách. Hàm lượng chitin trong vỏ tôm ở đây cao hơn so với công bố trước đây [3]. Sự khác nhau này có thể do mùa vụ thu hoạch và thành phần nguyên liệu.

Hàm lượng sắc tố trong vỏ tôm là 143,5 ppm, được biết đến chủ yếu là astaxanthin [3]. Trong quá trình sản xuất chitin, astaxanthin sẽ bị mất một phần do tác động của HCl và NaOH, tuy nhiên sản phẩm chitin vẫn còn chứa một lượng astaxanthin nhất định và chính lượng astaxanthin này tạo nên màu đặc trưng cho sản phẩm chitin. Ngoài các thành phần trên, trong phế liệu tôm còn chứa một lượng đáng kể lipid (8,1%). Thành phần lipid này có thể được loại bỏ trong quá trình khử protein với NaOH thông qua phản ứng xà phòng hóa [3].

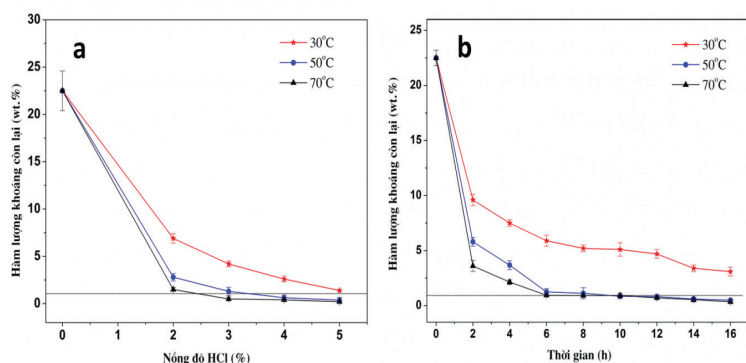
Bảng 1: thành phần và tính chất của vỏ tôm ban đầu và của chitin trước và sau khi khử màu

Chỉ tiêu	Vỏ tôm	Chitin trước khử màu	Chitin sau khử màu
Protein (%)	45,2±1,7	0,83±0,08	0,73±0,2
Khoáng (%)	21,5±0,5	0,97±0,05	0,86±0,1
Lipid (%)	8,12±0,4	-	-
Chitin (%)	17,2±1,6	-	-
Màu sắc	-	Đỏ hồng	Trắng sáng
Phân tử lượng (kDa)	-	1135±34	1076±42
Astaxanthin (ppm)	143,4±41,3	7,6±1,4	2,8±0,1
Độ deacetyl (%)	-	7,2±2,4	7,2±2,2

So với nguyên liệu thô, sau khi xử lý với dung dịch HCl và NaOH, hàm lượng khoáng và protein còn lại trong chitin rất nhỏ, tương ứng là 0,83 và 0,97%. Khối lượng phân tử của chitin là 1135 kDa với độ acetyl thấp (7,2%). Tuy nhiên, sản phẩm vẫn có màu đỏ hồng do lượng chất màu còn lại khá cao (7,6 ppm), nên cần tiến hành khử màu. Kết quả sau khi xử lý với dung dịch H_2O_2 , màu sắc sản phẩm trở nên trắng sáng với lượng astaxanthin giảm đi gần 3 lần (2,8%) trong khi khối lượng phân tử và độ acetyl gần như không bị thay đổi. Tóm lại, kết quả phân tích cho thấy sản phẩm chitin thu được có độ tinh khiết cao, khối lượng phân tử cao, độ acetyl thấp và có màu sắc trắng sáng.

Ảnh hưởng của nồng độ HCl và nhiệt độ đến quá trình khử khoáng

Hình 1 thể hiện ảnh hưởng của nồng độ dung dịch HCl và nhiệt độ phản ứng đến hiệu quả của quá trình khử khoáng. Nguyên liệu sau quá trình ép được khử khoáng với dung dịch HCl 2, 3, 4, 5% ở các nhiệt độ 30, 50, 70°C trong thời gian 2-16 giờ.



Hình 1: (a) Ảnh hưởng của nồng độ HCl và nhiệt độ đến hiệu quả khử khoáng, (b) Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hiệu quả khử khoáng (đường nét đứt là hàm lượng khoáng còn lại tại 1%)

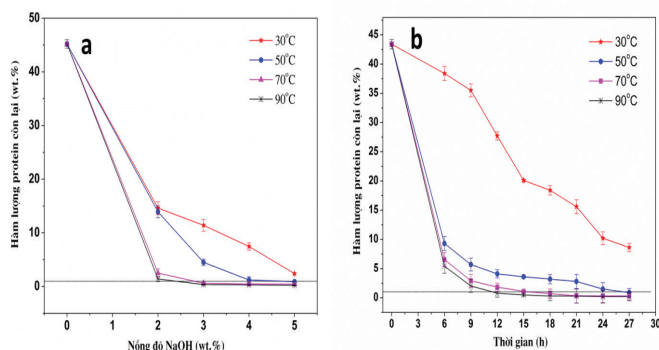
Theo kết quả thí nghiệm, hiệu suất quá trình khử khoáng phụ thuộc nhiều vào nồng độ HCl và nhiệt độ phản ứng (hình 1a). Khi xử lý ở nhiệt độ thấp (30°C) hiệu quả khử khoáng đạt được tương đối thấp. Cụ thể, khi dùng dung dịch HCl 2, 3, 4, 5% thì hàm lượng khoáng còn lại trong sản phẩm chitin sau 16 giờ tương ứng là 13,9; 10,2; 8,6; 6,4%. Tất cả các mẫu chitin chưa đạt yêu cầu thương mại về hàm lượng khoáng. Tuy nhiên, nếu tăng nhiệt độ xử lý lên 50°C, lượng khoáng được loại bỏ gần như hoàn toàn. Cụ thể, khi xử lý với HCl 2, 3, 4, 5% thì hàm lượng khoáng còn lại là 5,8; 3,3; 0,7; 0,5. Do đó, khử khoáng ở 50°C với HCl 4% trong 12 giờ có thể thu được chitin đạt yêu cầu về chất lượng thương mại (khoáng < 1%). Tiếp tục tăng nhiệt độ xử lý lên 70°C, hiệu suất khử khoáng tăng rõ rệt, hàm lượng khoáng còn lại trong chitin đạt yêu cầu ở nồng độ HCl 3%. Tuy nhiên, việc xử lý ở nhiệt độ cao là khó áp dụng ở quy mô lớn do HCl rất dễ bay hơi dẫn đến lượng hóa chất bị tổn thất lớn và dễ gây hư hỏng thiết bị. Hơn nữa, khi xử lý ở nhiệt độ cao sản phẩm chitin bị vụn do quá trình cắt mạch xảy ra mạnh [3]. Như vậy, việc xử lý với HCl 4% ở 50°C được xem là phù hợp do hàm lượng khoáng còn lại sau xử lý là 0,8% (đạt yêu cầu về chất lượng chitin thương mại).

Thời gian phản ứng là một yếu tố quan trọng quyết định đến hiệu quả của phản ứng hóa học. Theo kết quả thí nghiệm (hình 1b), lượng khoáng bị khử phần lớn trong khoảng 1 giờ đầu. Ví dụ, sau 1 giờ thì hàm lượng khoáng còn lại của mẫu xử lý ở 30 và 70°C đạt được lần lượt là 10,6 và 3,1%. Kết quả này tương đồng với nhận định của nguyên cứu trước đây [3]. Khi tăng thời gian xử lý thì hàm lượng khoáng bị khử tương đối chậm, nguyên nhân có thể do lượng khoáng còn lại liên kết vững chắc trong cấu trúc chitin. Mặt khác, nhiệt độ càng tăng thì thời gian xử lý được rút ngắn. Tuy nhiên, việc xử lý ở nhiệt độ cao có khả năng gây cắt mạch chitin. Do đó, tùy theo yêu cầu về chất lượng chitin và công nghệ hiện tại của các nhà máy sản xuất mà có thể áp dụng các điều kiện xử lý khử khoáng khác nhau. Trong nghiên cứu này, nguyên liệu xử lý với HCl 4% trong 10 giờ ở 50°C được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho quá trình khử khoáng.

Ảnh hưởng của nồng độ NaOH và nhiệt độ đến quá trình khử protein

Sau khi khử khoáng (HCl 4%, 50°C, 10 giờ), nguyên

liệu được khử protein với NaOH 2, 3, 4, 5% ở 30, 50, 70, 90°C trong 6-27 giờ. Kết quả phân tích được thể hiện ở hình 2.



Hình 2: (a) Ảnh hưởng của nồng độ NaOH và nhiệt độ đến hiệu quả khử protein, (b) Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hiệu quả khử protein (đường nét đứt là hàm lượng protein còn lại tại 1%)

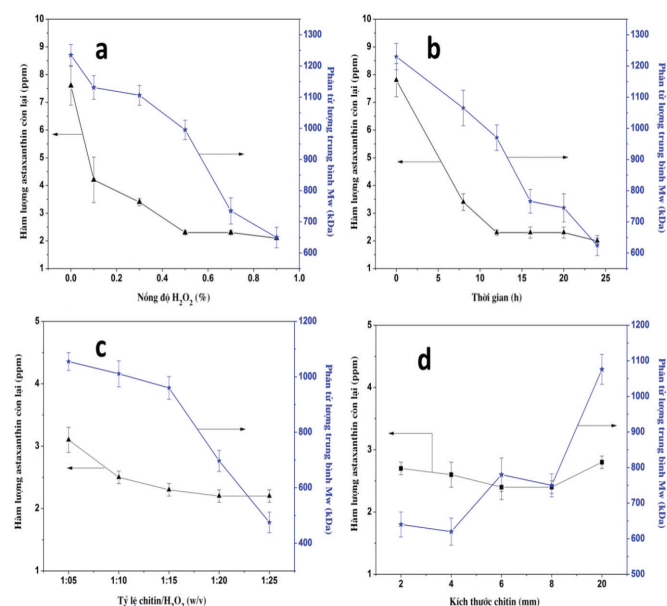
Theo kết quả thí nghiệm, khả năng khử protein trong nguyên liệu vỏ tôm phụ thuộc nhiều vào nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý. Khi nhiệt độ xử lý thấp (30 và 50°C), hàm lượng protein còn lại trong chitin khi xử lý ở các nồng độ NaOH 2, 3, 4, 5% là tương đối lớn. Tuy nhiên khi tăng nhiệt độ lên 70 và 90°C thì sự khác biệt giữa ba nồng độ (3, 4, 5%) nghiên cứu là không nhiều. Điều này có thể do ở nhiệt độ thấp quá trình khử protein phụ thuộc chủ yếu vào nồng độ NaOH, còn ở nhiệt độ cao thì sự tác động đồng thời của NaOH và nhiệt độ đã đẩy nhanh quá trình tách protein ra khỏi nguyên liệu. Cụ thể, khi NaOH sử dụng là 2% thì sự tăng nhiệt độ đến trong khoảng 30-90°C không làm giảm hàm lượng protein trong chitin xuống thấp hơn 1%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ NaOH lên 3 và 4% ở 70°C thì hàm lượng protein trong chitin giảm mạnh khi tăng nhiệt độ và đạt được yêu cầu (protein < 1%). Tiếp tục tăng NaOH lên 5%, chitin đạt chất lượng khi xử lý ở 50°C với hàm lượng protein còn lại là 0,8%. Như vậy, chitin chỉ đạt yêu cầu về hàm lượng protein còn lại thấp hơn 1% khi xử lý với NaOH 3% hoặc 4% ở 70°C, hoặc NaOH 5% ở 50°C trong 12 giờ. Tuy nhiên, quá trình khử protein ở nhiệt độ và nồng độ NaOH cao gây cắt mạch chitin [3]. Hơn nữa, khi xử lý trong điều kiện nhiệt độ cao có khả năng gây hư hỏng thiết bị. Do vậy, để ứng dụng trong sản xuất quy mô lớn thì xử lý với NaOH 3% ở 70°C là thích hợp nhất và kết quả này được lựa chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Theo hình 2b, thời gian phản ứng có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả khử protein. Khi tăng từ 6 giờ lên 9 giờ, hiệu suất khử protein tăng từ 88,1% lên 96,3%. Tuy nhiên, sau đó hiệu suất khử protein hầu như không tăng, điều này có thể do trong 6 giờ đầu NaOH chủ yếu chỉ phản ứng với protein của thịt tôm nên phản ứng khử protein xảy ra nhanh chóng. Ví dụ, hàm lượng protein còn lại trong chitin khi xử lý 6 và 9 giờ là 4,5 và 2,1% nhưng khi tăng thời gian xử lý 12, 15, 18, 21 giờ thì hàm lượng protein trong chitin đạt được thấp hơn 1% (tương ứng là 0,8; 0,6; 0,3; 0,3%). Do vậy, lựa chọn xử lý trong 12 giờ để tiết kiệm thời gian là phù hợp với yêu cầu và kết quả này được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của nồng độ H_2O_2 , tỷ lệ chất phản ứng và kích thước nguyên liệu đến hiệu quả khử màu

H_2O_2 là một tác nhân oxy hóa mạnh và nó có thể thực hiện quá trình oxy hóa astaxanthin có trong chitin giúp cho sản phẩm có màu trắng sáng [3]. Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ H_2O_2 (0,1-0,9%) đến hiệu quả khử màu chitin được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 1-24 giờ với tỷ lệ chitin/dung dịch khác nhau. Chitin sau khi khử màu được phân tích hàm lượng astaxanthin và phân tử lượng, kết quả phân tích được trình bày ở hình 3.

Kết quả cho thấy, khi tăng nồng độ H_2O_2 thì hiệu quả khử màu tăng nhưng khối lượng phân tử của chitin thu được lại giảm ở các mức độ khác nhau (hình 3a). Ví dụ, khi tăng nồng độ H_2O_2 từ 0,1 lên 0,3% thì hàm lượng astaxanthin giảm từ 4,2 còn 3,4 ppm nhưng trọng lượng phân tử của chitin giảm ít, từ 1131 còn 1106 (kDa) (hình 3a). Tuy nhiên, nếu tăng nồng độ H_2O_2 lên cao hơn thì khối lượng phân tử chitin giảm mạnh trong khi hàm lượng astaxanthin giảm không đáng kể. Ví dụ, hàm lượng astaxanthin khi xử lý với H_2O_2 ở các nồng độ 0,7 và 0,9% đạt được tương ứng là 2,3 và 2,1 ppm, trong khi phân tử lượng chitin tương ứng là 735 và 650 kDa. Ngoài ra, sự sai khác về hàm lượng astaxanthin khi xử lý H_2O_2 với các nồng độ cao từ 0,5 đến 0,9% là không có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Do vậy, nồng độ H_2O_2 0,5% được xem là thích hợp cho quá trình khử màu. Tóm lại, nồng độ H_2O_2 thích hợp cho quá trình khử màu chitin là 0,5% và kết quả này được sử dụng cho các thí nghiệm sau.



Hình 3: ảnh hưởng của (a) nồng độ H_2O_2 , (b) thời gian, (c) tỷ lệ chitin/dung dịch H_2O_2 và (d) kích thước chitin đến hiệu quả khử màu

Thời gian xử lý có ảnh hưởng khác nhau đến phân tử lượng của sản phẩm chitin và hiệu quả khử màu (hình 3b). Ví dụ, sau 8 giờ thì hàm lượng astaxanthin giảm 68,4%. Tuy nhiên, tiếp tục tăng thời gian lên 12 giờ hàm lượng astaxanthin chỉ giảm 5,83%, trong khi sau 24 giờ hàm lượng astaxanthin không thay đổi so với mức xử lý 12 giờ. Điều này có thể do ban đầu astaxanthin tồn tại nhiều ngoài mạch chitin nên dễ bị oxy hóa. Nhưng khi lượng astaxanthin liên kết ngoài mạch bị oxy hóa hoàn toàn thì việc tách các phân tử chất màu liên kết sâu bên trong cấu trúc chitin là khó khăn.

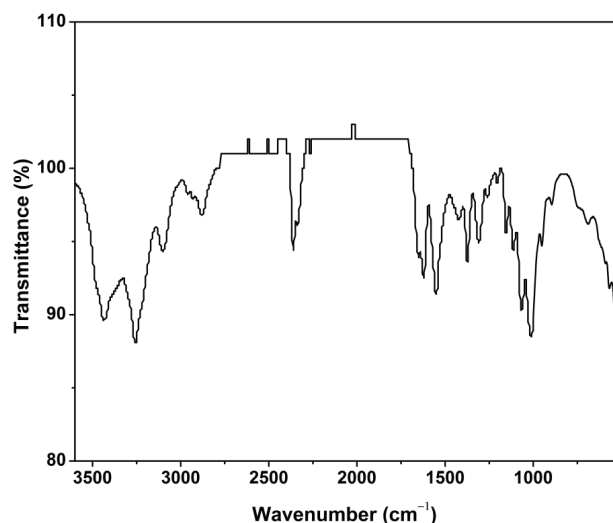
Xét về phân tử lượng chitin, thời gian xử lý càng tăng thì chitin bị cắt mạch càng mạnh, càng tăng thời gian xử lý phân tử lượng chitin càng bị giảm. Ví dụ, phân tử lượng chitin sau thời gian xử lý 8, 12, 16, 20, 24 giờ đạt lần lượt là 1065; 970; 766; 745; 624 kDa. Như vậy, sau 12 giờ, phân tử lượng chitin giảm 21,71%. Tiếp tục tăng thời gian xử lý lên trên 12 giờ thì phân tử lượng chitin giảm mạnh. Do đó, thời gian để thực hiện quá trình khử màu và không giảm khối lượng phân tử của chitin là 12 giờ. Kết quả này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ chitin/dung dịch H_2O_2 đối với hiệu quả khử màu cũng được khảo sát (hình 3c). Khi tăng lượng dung dịch H_2O_2 làm giảm đáng kể hàm

lượng chất màu còn lại trong chitin. Cụ thể, hàm lượng astaxanthin khi xử lý với tỷ lệ chitin/dung dịch H_2O_2 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25 (w/v) tương ứng là 3,1; 2,5; 2,3; 2,2; 2,2 ppm. Mặt khác, tỷ lệ chitin/dung dịch H_2O_2 thấp (1/5, 1/10 và 1/15) dẫn đến khả năng tiếp xúc giữa chitin và H_2O_2 kém nên chitin ít bị cắt mạch (1055, 1011 và 860 kDa). Tuy nhiên, khi tăng lượng dung dịch H_2O_2 (1/20 và 1/25) quá trình cắt mạch chitin diễn ra mạnh (697 và 475 kDa). Hơn nữa, việc tăng lượng dung dịch H_2O_2 cũng làm thay đổi giá trị cảm quan của sản phẩm chitin sau xử lý. Ví dụ, những mẫu xử lý H_2O_2 với tỷ lệ chitin/dung dịch H_2O_2 1/20, 1/25 (w/v), chitin dễ bị vụn nát và màu chitin không được trắng sáng. Tóm lại, tỷ lệ chitin/dung dịch H_2O_2 thích hợp để khử màu chitin là 1/15 (w/v).

Việc xay nhỏ kích thước chitin sẽ làm tăng khả năng tiếp xúc giữa chitin với tác nhân oxy hóa để giúp việc khử màu chitin hiệu quả hơn. Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của kích thước chitin đến quá trình khử màu được tiến hành với chitin xay có các kích thước là 2, 4, 6, 8, 20 mm. Điều kiện khử màu là dung dịch H_2O_2 0,5%, nhiệt độ phòng và tỷ lệ chitin/dung dịch H_2O_2 là 1/15 (w/v). Theo hình 3d, kích thước chitin càng nhỏ thì hiệu suất khử màu càng tăng. Ví dụ, mẫu chitin có kích thước 20, 8, 6 mm, hàm lượng astaxanthin còn lại sau quá trình xử lý là 2,8; 2,7; 2,6 ppm. Đối với chitin kích thước 2 và 4 mm thì hàm lượng astaxanthin còn lại sau xử lý tương ứng là 1,6 và 2,1 ppm. Tuy nhiên, chitin xay có kích thước 2 mm bị cắt mạch nhiều nhất. Do đó, lựa chọn chitin có kích thước 20 mm để tiến hành quá trình khử màu là phù hợp. Tóm lại, để quá trình khử màu hiệu quả nhưng hạn chế ảnh hưởng đến phân tử lượng của chitin thì quá trình khử màu nên tiến hành với dung dịch H_2O_2 0,5% với tỷ lệ chitin/dung dịch H_2O_2 1/15 trong 12 giờ với kích thước chitin 20 mm là thích hợp.

Độ tinh khiết của sản phẩm chitin được khẳng định trên phổ hồng ngoại chuỗi Fourier (hình 4). Kết quả cho thấy, các dao động đặc trưng ứng với các nhóm chức trong phân tử chitin tại 3439 cm^{-1} (-OH), 2878, 1429 và 1379 cm^{-1} (-CH), 1657 và 1622 cm^{-1} (Amide bậc 1), 1554 cm^{-1} (Amide bậc 2). Kết quả này phù với nghiên cứu của Rinaudo [1].



Hình 4: phổ hồng ngoại chuỗi Fourier của chitin tách chiết từ vỏ tôm

Kết luận

Chitin đã được tách chiết thành công từ phế liệu vỏ tôm bằng phương pháp xử lý nhiệt trong quá trình khử khoáng và protein kết hợp với khử màu bằng H_2O_2 . Thời gian tách chiết được rút ngắn đáng kể với thời gian khử khoáng (10 giờ) và khử protein (12 giờ). Đặc trưng hóa, lý của sản phẩm chitin được cải thiện so với sản phẩm thương mại với độ deacetyl thấp (7,2%) và khối lượng phân tử trung bình (1076 kDa). Hàm lượng protein và khoáng còn lại đều nhỏ hơn 1%. Với các thông số xác định được ở đây, phương pháp chiết tách này có thể ứng dụng trong sản xuất quy mô lớn.

Lời cảm ơn

Tập thể tác giả cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí triển khai nội dung nghiên cứu thuộc nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ theo Nghị định thư “Nghiên cứu sản xuất các sản phẩm giá trị gia tăng từ phế liệu tôm để ứng dụng trong nông nghiệp”; cảm ơn ThS Hoàng Ngọc Cương đã hỗ trợ phân tích và xử lý số liệu.

Tài liệu tham khảo

- [1] M. Rinaudo (2006), “Chitin and chitosan: Properties and applications”, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, pp.603-632.
- [2] S.K. Kim (2010), “Chitin, chitosan, Oligosaccharides and Their derivatives”, *Biological Activities and Applications*.
- [3] Trang Sĩ Trung và cộng sự (2010), *Chitin - Chitosan từ phế liệu thủy sản và ứng dụng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [4] H.K. No, S.P. Meyers (1997), *Preparation of chitin and chitosan*, ed. C. Handbook., Italy: Atec Edizioni.
- [5] R.L. Whistler, J.N. BeMiller (1962), “Alkaline degradation of amino sugars”, *J Org Chem*, **27**(4), pp.1161-1164.
- [6] F. Shahidi, J. Synowiecki (1991), “Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards”, *Agric Food Chem Biol Interact*, **39**, pp.1527-1532.
- [7] AOAC (1990), “Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry”, *The Association of Official Analytical Chemistry*, Washington DC.
- [8] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley (1957), “A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues”, *J. Biol. Chem*, **226**, pp.497-509.
- [9] R.F. Boyer (1993), *Modern Experimental Biochemistry (Vol 2)*, California: Benjamin/Cummings Series in the Life Sciences and Chemistry.
- [10] P. Lertsutthiwong, et al (2002), “Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan”, *Journal of Metals, Materials and Minerals*, **12**, pp.11-18.
- [11] M.M. Black, H.M. Schwartz (1950), “The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products”, *Analyst*, **75**, pp.185-189.
- [12] N.M. Sachindra, N. Bhaskar, N.S. Mahendrakar (2005), “Carotenoids in different body components of Indian shrimps”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, pp.167-172.
- [13] B.K. Simpson, N.F. Haard (1985), “The use of enzymes to extract carotenoprotein from shrimp waste”, *J. Appl. Biochem*, **7**, pp.212-222.
- [14] W. Tao, Z. Svetlana (2008), “Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method”, *Carbohydrate Polymers*, **73**, pp.248-253.
- [15] A. Einbu, et al (2004), “Solution Properties of Chitin in Alkali”, *Biomacromolecules*, **5**(5), pp.2048-2054.

Chọn tạo giống lúa chống chịu nóng bằng phương pháp hồi giao cải tiến nhờ chỉ thị phân tử

Nguyễn Thị Lang^{1*}, Phạm Thị Thu Hà¹, Phạm Công Trứ¹
Cho Young Chan², Trần Bảo Toàn³, Bùi Chí Bửu⁴

¹Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long (CLRRI)

²Viện Quốc gia về khoa học cây trồng Hàn Quốc (NICS)

³Công ty TNHH MTV Công nghệ sinh học PCR (Cần Thơ)

⁴Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền Nam (IAS)

Ngày nhận bài 2/6/2016, ngày chuyển phản biện 10/6/2016, ngày nhận phản biện 1/8/2016, ngày chấp nhận đăng 8/8/2016

Trong nghiên cứu này, chỉ thị phân tử SSR bao gồm RM3586, RM160 trên nhiễm sắc thể (NST) số 3 và RM3735, RM3471, RM3687, RM3536 trên NST số 4 được sử dụng để chọn lọc các dòng lúa triển vọng từ các quần thể con lai hồi giao. Các cá thể thuộc quần thể hồi giao BC_3F_2 , BC_4F_1 và 50 cá thể chọn lọc của BC_4F_2 cùng với nguồn vật liệu bố mẹ được trồng trong vụ xuân hè của năm 2013 và 2014 tại Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long, dưới điều kiện nhiệt độ nóng tự nhiên ở ngoài đồng ruộng và điều kiện nhân tạo trong phytotron để đánh giá tính chống chịu nóng trong giai đoạn lúa trổ đến thu hoạch. Kết quả, 4 dòng lúa bao gồm HTL1 của tổ hợp lai OM5930/N22, HTL2 của OM5930/Dular, HTL3 của AS996/N22 và HTL4 của AS996/Dular, đã được chọn thành công bằng phương pháp hồi giao cải tiến nhờ chỉ thị phân tử (MAB) thông qua chỉ thị RM3586 và RM3735. Các dòng lúa này đang được đưa vào khảo nghiệm quốc gia.

Từ khóa: chống chịu nóng, lúa, phương pháp hồi giao cải tiến nhờ chỉ thị phân tử (MAB).

Chỉ số phân loại 4.6

Rice breeding for heat tolerance using marker-assisted backcrossing in Vietnam

Summary

The microsatellite markers RM3586, RM160 on chromosome 3 and RM3735, RM3471, RM3687, RM3536 on chromosome 4 were used to select promising rice lines from backcrossing populations. The selected lines from BC_3F_2 and BC_4F_1 , 50 plants of BC_4F_2 , and their parents were planted in 2013 and 2014 dry seasons at the Cuu Long Delta Rice Research Institute (CLRRI) field under natural heat stress and green house to evaluate heat tolerance during the reproductive stage. Four genotypes as HTL1, HTL2, HTL3, HTL4 from OM5930/N22, OM5930/Dular, AS996/N22 and AS996/Dular, respectively, via RM3586 and RM3735 were successfully selected to be in national yield trials.

Keywords: heat tolerance, marker-assisted backcrossing, rice.

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Nhiệt độ là yếu tố ngoại cảnh có ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Đặc biệt, trong thời kỳ phát dục, cây lúa bị ảnh hưởng nghiêm trọng nhất bởi tác động của stress nhiệt [1, 2]. Nhiệt độ ở ngưỡng 35°C trở lên vào giai đoạn lúa trổ được xem là yếu tố gây ảnh hưởng tiêu cực đến phản ứng khác nhau của các giống lúa thể hiện qua tỷ lệ hạt có thể thụ tinh được, hạt có thể tích lũy chất khô và năng suất lúa [3, 4]. Vì vậy, các stress do nóng gây ra trong giai đoạn lúa trổ đến thu hoạch làm giảm mạnh năng suất [5, 6].

Biến đổi khí hậu đang và sẽ dẫn đến những tác động cực đoan của khô hạn, nhiệt độ nóng và sâu bệnh hại gia tăng ở Việt Nam. Trong đó, vùng canh tác lúa thuộc Duyên hải

*Tác giả liên hệ: Email: ntlang@hcm.vnn.vn

Nam Trung Bộ của nước ta có nhiệt độ nóng xảy ra vào lúc lúa trổ bông ở vụ hè thu. Điều này đã làm gia tăng tỷ lệ hạt lép của lúa nghiêm trọng trong những năm gần đây. Ngoài ra, tốc độ hạt vào chắc (GFR - grain filling rate) cũng bị ảnh hưởng [7], làm tăng tỷ lệ hạt lép, lép, giảm khối lượng 1.000 hạt. GFR là tốc độ vận chuyển chất khô từ lá vào bông, tính bằng mg chất khô/bông/ngày. Vì vậy, nghiên cứu về cơ chế di truyền học và sinh lý học của tính chống chịu nóng ngày càng trở thành nhu cầu quan trọng phục vụ cho việc cải tiến giống lúa chống chịu nóng.

Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử (MAS) được phát triển với MAB là một quy trình sử dụng vài chỉ thị phân tử chủ lực. Chúng đã được nghiên cứu trước, có liên quan đến tính trạng chống chịu stress nào đó như tính chịu nhiệt độ nóng. Nội dung được thực hiện theo trình tự như sau: (1) Điều tra đa hình ADN trên giống đối chứng chống chịu và nhiễm; (2) Xây dựng bản đồ di truyền; (3) Thực hiện “fine-map”; (4) So sánh kiểu gen và kiểu hình [8-10]. Đây là một công cụ hữu ích trong cải tiến giống lúa, đã và đang được phát triển thành công trong những năm đầu của thế kỷ XXI [11]. Mức độ thành công của phương pháp này tùy thuộc vào sự phát triển các chỉ thị phân tử liên kết chặt chẽ với các loci quyết định tính trạng số lượng (QTL: quantitative trait loci). Nó còn tùy thuộc vào mức độ phân giải trên vùng giả định của gen đích hoặc loci có gen ứng cử viên; đặc biệt là những công cụ thuộc về máy tính, phần mềm chuyên dụng [11].

Avisé (2007) đã tập hợp nhiều công trình nghiên cứu về mức độ thành công của ứng dụng di truyền phân tử, đặc biệt là MAS trong chọn tạo giống [12]. Thành công của gen đích lấy từ lúa hoang dại chuyển vào giống lúa trồng, với phương pháp làm giảm thiểu được bất lợi của liên kết gen không mong muốn (linkage drags) cũng được ghi nhận với sự giúp đỡ của chỉ thị phân tử [13]. Cuối cùng, người ta phải xác định được kiểu gen mong muốn theo kế hoạch chọn tạo giống [14].

Trong nghiên cứu này, 310 cá thể con lai thuộc quần thể BC_2F_2 của tổ hợp lai OM5930/N22 được sử dụng để lập bản đồ di truyền thông qua 264 chỉ thị SSR đa hình [15]. Những chỉ thị RM3586, RM160 trên NST 3 và RM3735 trên NST 4 đã được khuyến cáo sử dụng cho MAS. Đây là kết quả nghiên cứu của đề tài cấp bộ (thực hiện từ năm 2011 đến 2014) do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn quản lý. Đề tài tiếp tục

được thực hiện thông qua dự án hợp tác với Tổng cục Phát triển nông thôn Hàn Quốc (đứng đầu là tiến sỹ Cho Young Chan) với mục tiêu chọn các dòng lúa cao sản triển vọng chống chịu nóng ở phía Nam thông qua phương pháp MBA phục vụ cho sản xuất lúa ở Duyên hải Nam Trung Bộ - Việt Nam [15, 16].

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Giống lúa *indica* OM5939 (loại hình cao sản, nhạy cảm với nhiệt độ nóng), giống lúa loại hình *aus* là N22 (nguồn cho gen chống chịu nóng) được sử dụng để xây dựng bản đồ QTL [15]. Phương pháp MAB được thực hiện trên quần thể hồi giao của tổ hợp lai OM5939/N22, AS996/N22, AS996/Dular và Gayabeyo/N22. Chọn ít nhất 50 cá thể trong từng thế hệ hồi giao có băng alen trùng với băng N22 hoặc Dular.

36 chỉ thị SSR được sử dụng cho MAS, đặc biệt là chỉ thị RM3586, RM160 trên NST 3 và RM3735, RM3471, RM3687 trên NST 4.

Cá thể được chọn nhờ chỉ thị phân tử có nguồn gốc từ quần thể BC_3F_2 , BC_4F_1 , 50 BC_4F_2 cùng với bố mẹ đã được trồng trong vụ xuân hè năm 2013-2014 tại đồng ruộng của Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long. Số liệu khí tượng được thu thập nhờ công cụ của Đài khí tượng đặt ngay trên ruộng và được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng.

Điểm chống chịu nóng (HT) căn cứ trên phần trăm hạt lép theo thang điểm như sau: 0 (0-10%), 1 (10-15%), 3 (15-20%), 5 (20-25%), 7 (25-30%) và 9 (>30%).

Tách chiết ADN và thực hiện kỹ thuật PCR

Sử dụng phương pháp CTAB để tách chiết ADN [17]. Lá non được nghiền và tách chiết trong dung dịch có 400 μ l dung môi (50 mM tris-HCl pH = 8,0; 25 mM EDTA, 300 mM NaCl và 1% SDS).

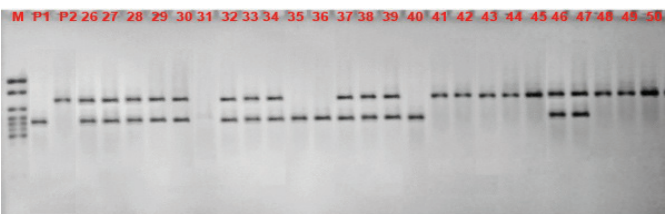
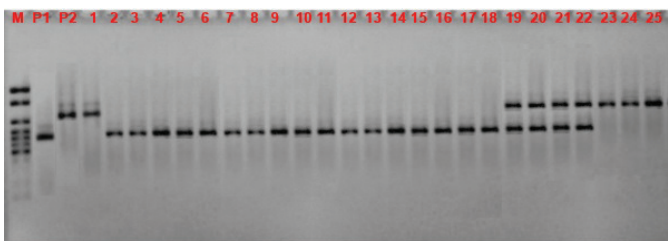
Thực hiện PCR với chỉ thị phân tử SSR được khuếch đại và ghi nhận kết quả trong dung môi 10 mM Tris-HCl (pH = 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 TAKARA *Taq*, 4 nmole dNTP, 10 pmole của primer. Chu trình PCR được thực hiện 35 chu kỳ, biến tính ở 94°C (1 phút), bắt cặp 55°C (1 phút) và kéo dài mỗi ở 72°C (2 phút, lần cuối 5 phút). Điện di được thực hiện trên 3% agarose gel có chứa thuốc nhuộm ethidium bromide và quan sát trên tia cực tím.

Kết quả và thảo luận

Kết quả chọn giống lúa nhờ chỉ thị phân tử trên NST 4 (bảng 1)

Bảng 1: kết quả điện di trên NST 4 thuộc quần thể BC₄F₂ của 3 tổ hợp lai

STT	Locus	AS996/N22	OM5930/N22	Gayabeyo/N22
1	RM537	Đa hình	Đa hình	Đa hình
2	RM335	Đơn hình	Đa hình	Đa hình
3	RM2416	Đa hình	Đa hình	Đơn hình
4	RM2811	Đơn hình	Đơn hình	Đa hình
5	RM8213	Đơn hình	Đa hình	Đa hình
6	RM6475	Đơn hình	Đơn hình	Đơn hình
7	RM3471	Đa hình	Đa hình	Đa hình
8	RM4835	Không rõ	Không rõ	Không rõ
9	RM401	Đa hình	Đa hình	Đa hình
10	RM5900	Đa hình	Đa hình	Đa hình
11	RM5687	Không rõ	Không rõ	Không rõ
12	RM16745	Đa hình	Đơn hình	Đơn hình
13	RM6314	Đơn hình	Đa hình	Đa hình
14	RM471	Đa hình	Đa hình	Đa hình
15	RM417	Đơn hình	Đơn hình	Đơn hình
16	RM3735	Đơn hình	Đa hình	Đa hình
17	RM241	Đơn hình	Đa hình	Đa hình
18	RM6457	Đơn hình	Đơn hình	Đơn hình
19	RM2441	Không rõ	Không rõ	Không rõ
20	RM317	Đa hình	Đơn hình	Đơn hình
21	RM6148	Đa hình	Đa hình	Đa hình
22	RM3217	Đa hình	Đa hình	Đa hình
23	RM255	Đa hình	Đơn hình	Đơn hình
24	RM3687	Đa hình	Đa hình	Đa hình



Hình 1: sản phẩm PCR tại locus RM3735 trên NST 4 được quan sát trong quần thể BC₃ của tổ hợp lai OM5930/N22. Đường P1: OM5930 (200 bp); P1: N22 (220 bp) với 12 dòng được chọn (đường 1, 23, 24, 25, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 49 và 50)

Sản phẩm PCR tại locus RM3735 trên NST 4 của quần thể BC₄F₁ từ tổ hợp lai OM5930/N22 cho thấy có 15 dòng được chọn biểu hiện alen đồng hợp tử với N22; quần thể BC₄F₁ của Gayabeyo/N22 có 24 dòng được chọn. Trong khi đó, sản phẩm PCR tại locus RM3687 trên NST 4 của quần thể BC₄F₂ từ tổ hợp lai OM5930/N22 có 6 dòng được chọn biểu hiện alen đồng hợp tử với N22 (hình 1).

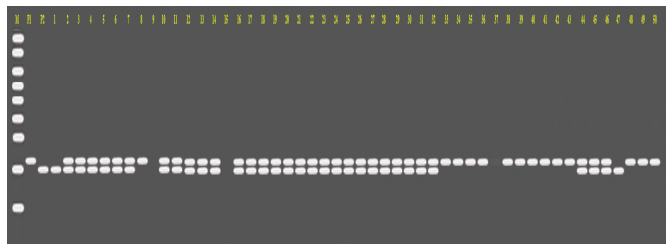
Các dòng hồi giao tại thế hệ BC₄F₁ biểu hiện khả năng chịu nóng cao hơn hẳn so với giống mẹ tái tục OM5930 trong cùng điều kiện đồng ruộng. Quan sát quần thể BC₄F₂ (quần thể tự thụ từ thế hệ BC₄F₁) biến động kiểu hình tính trạng hạt lép vẫn còn rất cao cho phép tiếp tục chọn lọc cá thể.

Trong quần thể BC₄F₂ của OM5930/N22 có 5 dòng được chọn là BC4-1-10-1, BC4-5-8, BC4-5-9-4, BC4-6-3 và BC4-5-6 theo kết quả điện di tại loci RM3687, RM3471, RM3735 và RM3586.

Kết quả chọn giống lúa nhờ chỉ thị phân tử trên NST 3

Sản phẩm PCR tại locus RM3586 trên NST 3 của quần thể BC₂F₂ thuộc OM5930/N22 có 15 dòng được chọn biểu hiện alen đồng hợp tử với N22; AS996/N22 không chọn được vì các băng ở trạng thái dị hợp tử biểu hiện kiểu hình chống chịu nóng cần được tiếp tục đánh giá ở thế hệ con lai. Trong quần thể của AS996/Dular có 2 dòng được chọn.

Sản phẩm PCR tại locus RM3586 trên NST 3 của quần thể BC₂F₂ thuộc AS996/N22 biểu thị đa số các băng ở trạng thái dị hợp tử, đối với kiểu hình chống chịu nóng (hình 2). Trong quần thể BC₄F₂ của AS996/Dular có 5 dòng được chọn, biểu hiện alen đồng hợp tử với Dular.



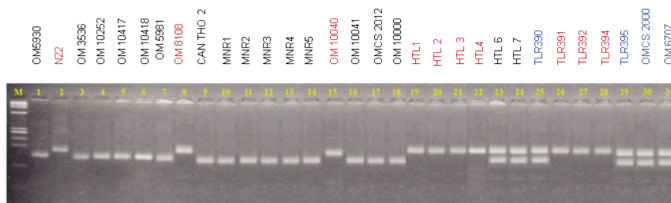
Hình 2: sản phẩm PCR tại locus RM3586 trên NST 3 được quan sát trong quần thể BC₃ của tổ hợp lai AS996/N22. Đường P1: AS996 (220 bp); P1: N22 (200 bp) với 2 dòng được chọn ở đường 1, 47

Các dòng triển vọng nhờ chỉ thị phân tử kết hợp với kiểu hình chấp nhận được

Bảng 2: tổng hợp kết quả chạy PCR tại loci RM3687, RM3471, RM3735 và RM3586 trên quần thể BC₄F₂ của OM5930/N22

TT	Dòng hồi giao	RM3687	RM 3471	RM3735	RM3586	Phản ứng với stress nóng
Mẹ	P1: OM5930	230	215	200	220	S
Bố	P2: N22	200	200	210	210	R
1	BC4-1-10-1	200	215	210	220	R
2	BC4-2-4-6-	230	215	200	210/220	S
3	BC4-5-8	230	215	210	220	R
4	BC4-5-9-4	230	215	210	220	R
5	BC4-9-10	230	215	200	220	S
6	BC4-5-10	230	215	200	220	S
7	BC4-34-15	230	215	200	220	S
8	BC4-16	230	215	200	220	S
9	BC4-19	230	200/215	200	220	S
10	BC4-21	230	200/215	200	220	S
11	BC4-31-15	230	200/215	200	220	S
12	BC4-25-10	230	200/215	200	220	S
13	BC4-16-15	230	200/215	200	220	S
14	BC4-7-17	230	200/215	200	220	S
15	BC4-9-19	230	215	200	220	S
16	BC4-8-6	230	215	200	220	S
17	BC4-7-29	230	215	200	220	S
18	BC4-28-10	230	215	200	220	S
19	BC4-7-5	230	215	200	220	S
20	BC4-6-1	230	215	200	220	S
21	BC4-6-3	230	215	210	220	R
22	BC4-5-6	230	215	210	220	R

R: kháng; S: nhiễm



Hình 3: sản phẩm PCR tại locus RM3735 trên NST 4 cho thấy 9 mẫu giống lúa biểu hiện alen đồng hợp tử với N22 (OM5930: 200 bp, N22: 220 bp)

Bảng 3: năng suất và tình trạng nông học các dòng được chọn (vụ xuân hè 2014; nhiệt độ ban ngày lúc trở đến thu hoạch 37-40°C) - bộ giống so sánh sơ khởi (PYT)

Dòng	TGST (ngày)	Cao cây (cm)	Bông/m ²	Hạt chắc/bông	Khối lượng 1.000 hạt (g)	Năng suất (tấn/ha)
HTL2	97	97 cd	350 a-d	80 c	29,0 a	7,63 a
HTL3	100	99 bc	370 ab	93 ab	26,5 ab	6,93 b
HTL4	105	105 a	380 a	98 a	26,5 ab	6,90 b
HTL14	90	90 e	370 ab	92 ab	27,0 ab	6,53 bc
HTL1	98	96 cd	340 b-e	91 ab	28,0 ab	6,21 c
HTL15	103	103 ab	340 b-e	89 ab	28,0 ab	5,72 d
OM4900 (C)	100	94 de	360 abc	90 ab	26,0 ab	5,64 de
HTL5	98	97 cd	350 a-d	85 bc	24,8 b	5,62 de
HTL7	96	97 cd	320 de	89 ab	26,0 ab	5,61 de
HTL13	100	99 bc	360 abc	93 ab	26,0 ab	5,61 de
HTL10	100	101 bc	310 e	86 bc	26,0 ab	5,44 de
HTL6	95	94 de	330 cde	92 ab	28,5 a	5,20 e
HTL12	100	99 bc	350 a-d	87 bc	27,0 ab	4,51 f

Ghi chú: DMRT ở mức độ 0,05 với 3 lần nhắc lại;
HTL: heat tolerance lines (dòng chịu nóng);
TGST: thời gian sinh trưởng

Kết quả hình 3 cho thấy, giống OM8108, OM10040 và 4 dòng lúa được chọn tạo nhờ chỉ thị phân tử (HTL1, HTL2, HTL3 và HTL4) có alen đồng hợp tử giống như N22. Đây là minh chứng khá rõ ràng về hiệu quả chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử đối với tính trạng chống chịu nóng. Biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL tại quãng giữa 2 marker RM3586-RM160. Riêng đối với chỉ thị RM3735 trên NST 4 giải thích được 32,28%, 20,73% và 9,95% biến thiên kiểu hình trên các quần thể hồi giao OM5930/N22, AS996/N22 và AS996/Dular theo thứ tự (OM4900 và IR64 được sử dụng làm đối chứng) [15]. Trong quần thể BC₄F₂ của OM5930/N22 có 5 dòng được chọn là BC4-1-10-1 (HTL1), BC4-5-8 (HTL2), BC4-5-9-4 (HTL3), BC4-6-3 (HTL4) và BC4-5-6 (HTL5) theo kết quả điện di tại loci RM3687, RM3471, RM3735, RM3586.

Bảng 4: nguồn gốc các dòng chống chịu nóng có dạng hình chấp nhận được thông qua chọn lọc bằng chỉ thị phân tử (hình 3)

Dòng	Tổ hợp	Dòng hồi giao
HTL1	OM 5930/N22	BC4-1-10-1
HTL2	OM5930/Dular	BC4-5-8
HTL3	AS996/N22	BC4-5-9-4
HTL4	AS996/Dular	BC4-6-3
HTL5	Gayabyeo/N22	BC4-5-6
HTL6	HT114/IR66	BC3-4
HTL7	H111/IKO547	BC3-21

Dòng HTL1, HTL2, HTL3 và HTL4 biểu hiện alen đồng hợp với alen của giống cho gen chống chịu nóng N22; dòng HTL6 và HTL7 biểu hiện alen dị hợp tử cần phải tiếp tục chọn cá thể ưu việt. Bảng 3 cho thấy, năng suất cao nhất thuộc về dòng lúa BC4-5-8 (HTL2) của quần thể hồi giao OM5930/N22; kế đến là BC4-5-9 (HTL3), BC4-6-3 (HTL4). Trong quần thể hồi giao OM5930/Dular có dòng BC3F2-1-9 cho năng suất triển vọng. Dòng HTL1 (BC4-4-10-1) cho năng suất thấp nhất trong bộ giống quan sát (2013) và năng suất trung bình khá (6,21 tấn/ha) trong bộ giống so sánh sơ khởi. Dòng HTL2 (BC4-5-8) vẫn cho năng suất cao nhất (7,63 tấn/ha) trong bộ giống so sánh sơ khởi, kế đến là dòng HTL3, HTL4 và HTL1.

Kết luận

Có 4 dòng lúa cao sản (HTL1, HTL2, HTL3 và HTL4) chống chịu nóng được chọn nhờ chỉ thị phân tử trong quần thể hồi giao. 4 dòng này đang được đưa vào khảo nghiệm giống quốc gia.

Chỉ thị phân tử SSR cho kết quả so sánh giữa kiểu gen và kiểu hình đạt hiệu quả cao nhất là RM3735 trên NST 4 và RM3586 trên NST 3.

Tài liệu tham khảo

- [1] D.J. Mackill, W.R. Coffman, J.N. Rutger (1982), "Pollen shedding and combining ability for high temperature tolerance in rice", *Crop Science*, **22**, pp.730-733.
- [2] H.C. Kuang, S.S. Wen, G.M. Liu (2002), "Studies on the heat tolerance of Luhui 17 and its cross II You 7 at head sprouting", *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, **15**, pp.106-108.
- [3] S. Matsushima, H. Ikewada, A. Maeda, S. Honma, N. Niki (1982), "Studies on rice cultivation in the tropics 1: yielding and ripening responses of the rice plant to the extremely hot and dry climate in Sudan", *Japan J. Trop Agri.*, **26**, pp.19-25.
- [4] C.D. Li (2003), "Analysis on a large of empty grains of rice due to high temperature", *Shanxi J. Agric. Sci.*, **49**, p.4547.
- [5] S. Morita S, J.I. Yonemaru, J.I. Takanashi (2005), "Grain growth and endosperm cell size under high night temperatures in rice (*Oryza sativa* L.)", *Annals of Botany*, **95**, pp.695-701.
- [6] S.B. Peng, J.L. Huang, J.E. Sheehy, R.C. Laza, R.M. Visperas, X.M. Zhong, G.S. Centeno, G.S. Khush, K.G. Cassman (2004), "Rice yields decline with high temperature from global warming", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **101**, pp.9971-9975.
- [7] T.L. Nguyen, T.T.H. Pham, C.T. Pham, T.Q. Tran, T.M. Luong, H.G. Ly, V.B. Hoang, T.D.P. Tran, T.G. Nguyen, T.H. Nguyen, V.H. Truong, B.N. Mai, B.C. Bui (2015), "Rice lines with heat tolerance via marker-assisted selection", *Vietnam Science and Technology Review*, **1(3)**, pp.53-59.
- [8] S.D. Tanksley, N.D. Young, A.H. Paterson, M.W Bonierbale (1989), "RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science", *Biotechnology*, **7**, pp.257-263.
- [9] S.D. Tanksley, S.R. McCouch (1997), "Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild", *Science*, **277**, pp.1063-1066.
- [10] A. Gur, D. Zamir (2004), "Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding", *PLoS Biol*, **2**, pp.245.
- [11] Y. Xu, J.H. Couch (2008), "Marker-assisted selection in plant breeding: from publication to practice", *Crop Sci.*, **48**, pp.391-407.
- [12] J.C. Avise (2007), *Molecular markers, natural history and evolution*, University of Georgia.
- [13] N.D. Young, S.D. Tanksley (1989), "RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding", *Theor Appl Genet*, **77**, pp.353-359.
- [14] S. Hurni, S. Brunner, D. Stirnweis, G. Herren, D. Peditto, R.A. McIntosh, et al (2014), "The powdery mildew resistance gene *Pm8* derived from rye is suppressed by its wheat ortholog *Pm3*", *Plant Journal*, **79**, pp.904-913.
- [15] B.C. Bui, T.T.H. Pham, P.T. Bui, T.N. Tran, V.H. Nguyen, T.P. Nguyen, T.M. Luong, H.G. Ly, N.T. Nguyen (2014), "Quantitative trait loci associated with heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)", *Plant Breeding and Biotechnology*, **2(1)**, pp.14-24.
- [16] B.C. Bui, P.T. Thu Ha, B.P. Tam, C.T. Nha, N.T. Nguyen (2013), "Study on genetic variation of heat tolerance trait in BC population of rice (*Oryza sativa* L.)", *J. Agric Rural Dev*, **2**, pp.10-15.
- [17] T.L. Nguyen (2002), *Protocol for basic biotechnology*, Agricultural Publisher, Ho Chi Minh City, Vietnam.

Đánh giá đa dạng di truyền các loài quế Thanh Hóa bằng chỉ thị RAPD

Khuất Hữu Trung^{1*}, Kiều Thị Dung¹, Lưu Cảnh Trung², Nguyễn Huy Hoàng², Hồ Trung Lương²

¹*Viện Di truyền nông nghiệp*

²*Viện Nghiên cứu lâm sinh*

Ngày nhận bài 18/12/2015, ngày chuyển phản biện 5/1/2016, ngày nhận phản biện 7/3/2016, ngày chấp nhận đăng 29/4/2016

Nghiên cứu phân loại các loài quế ở Việt Nam chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái và chịu ảnh hưởng nhiều bởi yếu tố môi trường. Chỉ thị phân tử RAPD là một phương pháp đáng tin cậy để xác định các loài quế một cách chính xác. Trong nghiên cứu này, phân tích RAPD-PCR gồm 22 mẫu ngẫu nhiên đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền 32 mẫu giống quế Thanh Hóa. Kết quả phân tích PCR nhận được 3.137 băng bao gồm 126 loại băng với kích cỡ khác nhau. Trong đó có 61 băng cho đa hình (chiếm 48,41%) và 65 băng đơn hình (chiếm 51,59%). Số băng nhận được ở mỗi mẫu dao động từ 3 đến 11 loại băng, trung bình 5,8 băng/mẫu. Hệ số tương đồng di truyền của 32 mẫu giống quế dao động từ 0,67 đến 0,97. Dựa vào hệ số tương đồng di truyền, có thể chia 32 mẫu giống nghiên cứu thành 6 nhóm lớn. Kết quả nghiên cứu cũng đã xác định được 2 băng cá biệt xuất hiện ở 2 mẫu có thể sử dụng làm marker nhận dạng chính xác 2 nguồn gen khác nhau. Mẫu OPN20 và UBC728 có thể nhận biết được mẫu giống tương ứng là TT02 và XC24.

Từ khoá: chỉ thị RAPD, *Cinnamomum*, đa dạng di truyền, quế.

Chỉ số phân loại 4.6

Đặt vấn đề

Chi Quế (*Cinnamomum*) thuộc họ *Lauraceae*, gồm khoảng 250 loài có hương thơm. Các loài trong họ này có đặc trưng là vỏ dầu thơm, cay nồng, dùng làm hương liệu, gia vị trong thực phẩm hay làm thuốc kháng viêm, chống tiểu đường và chống oxy hóa [1]. Ở Việt Nam có 3 loài quế chính là quế Thanh Hóa, Nghệ An (*Cinnamomum obtusifolium* Ness var *Loureirii*. Perot Ebernh); quế đơn, quế bì (*Cinnamomum cassia* Blume) và quế quan (*Cinnamomum zeylanicum* Ness).

Quế Thanh Hóa (quế Thanh) là loài cây bản địa, đa tác dụng. Sản phẩm chính của quế Thanh là tinh dầu dùng làm dược liệu và hương liệu trong công nghiệp thực phẩm. Vỏ quế thường được mài ra cho vào nước đun sôi để nguội để uống. Ngoài ra, vỏ quế cũng thường được dùng trong các bài thuốc để chữa một số bệnh về đường tiêu hóa, đường hô hấp, kích thích sự tuần hoàn của máu, lưu thông huyết mạch, làm cho cơ thể ấm lên, chống lại giá lạnh và làm chất sát trùng. Trong đông y, quế được xếp vào 4 loại thuốc quý: sâm, nhung, quế, phụ. Quế Thanh, theo như người dân Thanh Hóa gọi là “Ngọc quế châu thường”. Quế có vị thơm, cay và ngọt, có thể khử bớt được mùi tanh nên được sử dụng nhiều để làm gia vị, kích thích tiêu hóa. Hương liệu quế là

sản phẩm rất phổ biến và được nhiều người ưa chuộng khi sử dụng cho các loại bánh kẹo, rượu... Gỗ quế với vân thớ mịn, dễ gia công và có mùi thơm thường được sử dụng làm đồ thủ công mỹ nghệ cao cấp.

Trên thế giới, các nghiên cứu ứng dụng chỉ thị RAPD để phân tích đa dạng di truyền đã được thực hiện. Năm 2007, Govinden và cs đã sử dụng 11 mẫu RAPD để đánh giá sự khác biệt giữa 2 loài *Cinnamomum camphora* và *Cinnamomum verum* [2]. Kết quả phân tích 11 mẫu RAPD thu được các băng ADN dao động từ 400 tới 3.800 bp. Số băng thu được ở mỗi mẫu dao động từ 1 tới 14 băng, trung bình 8 băng/mẫu. Tất cả mẫu được sử dụng đều cho số băng đa hình cao, điều này cho thấy sự khác biệt giữa 2 loài. Như vậy, chỉ thị RAPD là một kỹ thuật nhanh để phân biệt các kiểu gen và đánh giá đa dạng di truyền 2 loài *Cinnamomum camphora* và *Cinnamomum verum*. Năm 2010, Miss Jittra Jansote đã thu thập 73 mẫu giống quế thuộc 17 loài (trong đó có 8 loài đã biết và 9 loài chưa xác định) được chọn lọc từ 6 tỉnh ở miền Nam Thái Lan [3]. Tác giả đã sàng lọc 50 mẫu RAPD và 10 mẫu cho kết quả đa hình thu được 78 băng ADN, trong đó có 75 băng đa hình (chiếm 96,15%). Sử dụng phần mềm NTSYS version 2.1 để phân tích hệ số tương đồng di truyền và cây phân loại.

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

Genetic diversity of *Cinnamomum* samples in Thanh Hoa based on RAPD markers

Summary

The classification of *Cinnamomum* species is still based on morphological characters which are influenced by environmental factors. Therefore, molecular markers such as randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) were employed in order to find a more reliable approach for identifying *Cinnamomum* samples correctly. RAPD-PCR analysis involving the 22 random primers was used to assess the genetic diversity of 32 *Cinnamomum* sp. samples that have been originated from Thanh Hoa province. The results showed that a total of 3137 bands were detected, with 126 type bands at different sizes. Out of which, 61 polymorphic bands (48.41%) and 65 monomorphic bands (51.59%) were amplified. The number of polymorphic bands detected by each RAPD marker ranged from 3 to 11, with a mean of 5.8 bands per locus. Genetic similarity coefficients of 32 *Cinnamomum* samples ranged from 0.67 to 0.97. Based on genetic similarity coefficient, 32 *Cinnamomum* samples were divided into six major groups. Identification of 2 unique bands observed in 2 primers that can be used to identify exactly 2 different genetic resources. The OPN20 and UBC728 primers can be used to identify TT02 and XC24 varieties, respectively. The obtained results are useful for classification and exact identification of some genetic resources that will be provided for the conservation and breeding.

Keywords: *Cinnamomum* sp., genetic diversity, RAPD marker.

Classification number 4.6

Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống quế dao động từ 0,397 đến 0,987, trung bình 0,641. 73 mẫu giống quế được chia làm 5 nhóm. Hai nhóm loài *C. porrectum* và *C. ilicioides* có mối quan hệ di truyền gần gũi nhất, hệ số tương đồng di truyền trung bình cao nhất là 0,843. Hai nhóm loài *C. porrectum* và *C. mollesimum* hệ số tương đồng di truyền trung bình nhỏ nhất là 0,522. Tác giả A.M. Sandigawad và cs (2011) [4] đã sử dụng 40 marker RAPD để đánh giá mối quan hệ di truyền giữa 8 loài thuộc chi *Cinnamomum* ở Nam Ấn Độ. Kết quả thu được 111 băng ADN, trong đó có 98% đa hình. Hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,17 (giữa *C. zeylanicum* và *C. travancoricum*) đến 0,81 (giữa *C. macrocarpum* và *C. travancoricum*). Dựa vào sơ đồ hình cây, 8 loài thuộc chi *Cinnamomum* được chia thành 2 nhóm. Như vậy, chỉ thị RAPD được sử dụng thành công trong việc phân loại và nghiên cứu phát sinh loài ở các loài thuộc chi *Cinnamomum*.

Hiện nay, các nghiên cứu trên đối tượng cây quế ở nước ta chủ yếu tập trung vào mô tả đặc điểm hình thái, phân bố, đặc điểm sinh lý, sinh thái, giá trị sử dụng. Ngoài ra cũng có một số nghiên cứu về kỹ thuật nhân giống, chọn tạo giống mới có năng suất cao, kỹ thuật gây trồng, sơ chế và tách chiết tinh dầu quế. Trong khi ở nước ta có một số xuất xứ quế cho năng suất chất lượng dầu cao, điển hình như quế Thanh Hóa, có thể phát triển theo hướng sản xuất hàng hóa, nhưng cho đến nay, việc xác định giá trị nguồn gen và khai thác, phát triển nguồn gen của xuất xứ quế này vẫn chưa được quan tâm đúng mức. Vì vậy, mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi là xác định nguồn gốc và đánh giá mối quan hệ di truyền của 32 nguồn gen quế được thu thập ở Thanh Hóa, Nghệ An và Yên Bái, từ đó tìm ra giải pháp nâng cao năng suất, chất lượng tinh dầu và khai thác tối ưu tiềm năng của rừng quế, góp phần bảo tồn nguồn gen cây rừng và phát triển kinh tế - xã hội.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu được sử dụng trong nghiên cứu là cây trội dự tuyển và cây được chọn (sau đây gọi là cây được chọn). Trong đó có 28 cây được chọn ở Thanh Hóa, 4 cây được chọn ở Nghệ An và Yên Bái (bảng 1).

Bảng 1: danh sách 32 cây trội dự tuyển và cây được chọn

STT	Ký hiệu	Ghi chú	Xã	Huyện	Tỉnh
1	XC11	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
2	XC01	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
3	XL03	Cây trội dự tuyển	Xuân Lệ	Thường Xuân	Thanh Hóa
4	XC02	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
5	XC07	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
6	XC18	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
7	XC14	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
8	XC24	Cây trội dự tuyển, cây có nguồn gốc từ rừng tự nhiên	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
9	XC25	Không phải cây trội	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
10	XL01	Cây trội dự tuyển, cây có nguồn gốc từ rừng tự nhiên	Xuân Lệ	Thường Xuân	Thanh Hóa
11	XL04	Cây trội dự tuyển	Xuân Lệ	Thường Xuân	Thanh Hóa
12	XL07	Cây trội dự tuyển	Xuân Lệ	Thường Xuân	Thanh Hóa
13	TX01	Cây trội dự tuyển	Thường Xuân	Thường Xuân	Thanh Hóa
14	NP01	Không phải cây trội	Ngọc Phụng	Thường Xuân	Thanh Hóa
15	XCM07	Cây trội dự tuyển	Xuân Cẩm	Thường Xuân	Thanh Hóa
16	YN6	Cây trội dự tuyển, cây có nguồn gốc từ rừng tự nhiên	Yên Nhân	Thường Xuân	Thanh Hóa
17	VX12	Cây trội dự tuyển	Vạn Xuân	Thường Xuân	Thanh Hóa
18	XCH20	Cây trội dự tuyển	Xuân Chinh	Thường Xuân	Thanh Hóa
19	YB01	Không phải cây trội	Nghĩa Lộ	Văn Chấn	Yên Bái
20	YB02	Không phải cây trội	Nghĩa Lộ	Văn Chấn	Yên Bái
21	NA01	Không phải cây trội	Châu Kim	Quế Phong	Nghệ An
22	NA02	Không phải cây trội	Tiền Phong	Quế Phong	Nghệ An
23	LC 02	Không phải cây trội	Giao An	Lang Chánh	Thanh Hóa
24	NL02	Không phải cây trội	Kiên Thọ	Ngọc Lặc	Thanh Hóa
25	NL01	Không phải cây trội	Nguyệt Ấn	Ngọc Lặc	Thanh Hóa
26	NX01	Không phải cây trội	Thuận Ninh	Như Xuân	Thanh Hóa
27	CT02	Không phải cây trội	Cầm Liên	Cầm Thủy	Thanh Hóa
28	BT01	Không phải cây trội	Điện Quang	Bá Thước	Thanh Hóa
29	TT02	Cây trội dự tuyển	Tân Thành	Thường Xuân	Thanh Hóa
30	LC 021	Không phải cây trội	Quang Hiến	Lang Chánh	Thanh Hóa
31	NX03	Không phải cây trội	Thuận Ninh	Như Xuân	Thanh Hóa
32	TT01	Cây trội dự tuyển	Tân Thành	Thường Xuân	Thanh Hóa

Hóa chất

Một số hóa chất thông dụng dùng trong sinh học phân tử của các hãng Sigma, Merck... CTAB, Tris base, Boric acid, NaCl, dNTPs, EDTA, 6X orange loading dye solution, Taq Polymeraza, Ethanol, 2-propanol, Acetic acid glacial, Phenol, Chloroform, isoamylalcohol, Ribonuclease A, Agarose, các môi RAPD (bảng 2).

Bảng 2: trình tự các môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự	STT	Tên môi	Trình tự
1	UBC728	GTGGGTGGTG	12	OPN10	ACAACTGGGG
2	OPC10	TGTCTGGGTG	13	OPN20	GGTGCTCCGT
3	OPO15	TGGCGTCCTT	14	UBC701	CCCACAACCC
4	UBC706	GGTGGTTGGG	15	OPM12	GGGACGTTGG
5	OPC2	GTGAGGCGTG	16	OPL7	AGGCGGGAAC
6	OPA12	TCGGCGATAC	17	OPA19	CAAACGTCGG
7	S201	GGGCCACTCA	18	OPA9	GGGTAACGCC
8	OPO14	AGCATGGCTC	19	OPB10	CTGCTGGGAC
9	BIO24	CTGGCGGCTG	20	OPC1	TTCGAGCCAG
10	OPN4	GACCGACCCA	21	OPC5	GATGACCGCC
11	OPN6	GAGACGCACA	22	OPB17	AGGGAACGAG

Phương pháp nghiên cứu

* Tách chiết ADN tổng số: trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp tách CTAB có cải tiến của Asif và Cannon (2005) [5] để tiến hành tách chiết ADN từ 32 mẫu giống quế nghiên cứu.

Quy trình:

- Chuẩn bị sẵn dung dịch đệm chiết CTAB ở 60°C (100 mM Tris HCl, pH = 8,0; 20 mM EDTA, pH = 8,0; 3 M NaCl; 2% CTAB; 1% PVP).

- Cân 0,3 g mẫu lá quế đã làm khô và nghiền trong nitor lỏng đến khi thành dạng bột mịn (mẫu quế, chày, cối được giữ trước ở -80°C).

- Hoà tan mẫu đã nghiền nhỏ trong 800 ml CTAB buffer và 60 ml SDS 10%. Ủ mẫu ở 65°C trong bể ổn nhiệt, thời gian 60 phút.

- Bổ sung chloroform:isoamyl alcohol (24:1), lắc nhẹ cho tới khi thành dạng nhũ sữa. Ly tâm 11.000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C.

- Hút dung dịch phía trên chuyển sang ống mới và bổ sung 1/3 thể tích 3 M sodium acetate (pH = 5,2) và 2/3 thể tích chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Ly tâm 11.000 vòng/phút trong 15 phút thu được dịch chiết chứa ADN.

- Tủa ADN bằng isopropanol đã làm lạnh. Để ở -20°C trong 1 giờ.

- Ly tâm thu tủa 11.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Rửa tủa bằng ethanol 70%, ly tâm thu tủa, làm khô và hoà tan trong đệm TE.

* Chạy PCR: các phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: 94°C (5 phút), 35-37 chu kỳ [94°C (1 phút), 32-36°C (1 phút 10 s), 72°C (1 phút 50 s)] và kết thúc ở 72°C (5 phút).

* Phân tích và xử lý số liệu: kết quả được thống kê dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng ADN (các allele) theo thang ADN chuẩn (ADN marker). Số liệu được xử lý, phân tích bằng chương trình Exel version 5.0 và phần mềm NTSYSpc 2.1 của F.J. Rohlf (2000) để tính ma trận tương đồng giữa các cặp mẫu giống [6].

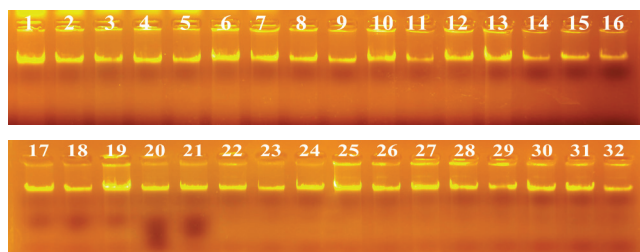
Kết quả và thảo luận

Kết quả tách chiết ADN tổng số

Tách chiết axit nucleic là công việc đầu tiên đóng vai trò quan trọng cho các nghiên cứu phân tử tiếp theo. Tuy

nhiên, lá quế tươi chứa nhiều tinh dầu, polysaccharide, polyphenol làm ức chế quá trình thu tủa ADN. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã sử dụng các kit tách chiết thương mại của Thermo, Qiagen nhưng không thu được kết quả mong muốn. Vì vậy, chúng tôi đã làm khô lá và sử dụng phương pháp CTAB có cải tiến của Asif và Cannon (2005) [5] bằng cách bổ sung sodium acetate 3 M trong quá trình chiết chloroform:isoamylalcohol để giúp loại bỏ các polysaccharide và protein. Kết quả tách chiết ADN tổng số của 32 cây được chọn được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% [5, 7].

Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy, các băng ADN thu được của các mẫu quế khá gọn và đồng đều chứng tỏ chất lượng ADN của các mẫu là khá tốt, không bị lẫn tạp chất. Kết quả điện di cũng cho thấy, ADN có nồng độ tương đối cao, chất lượng tốt, đủ tiêu chuẩn thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1: ảnh điện di ADN tổng số của 32 mẫu quế được chọn

Kết quả phân tích đa dạng di truyền, xác định mối quan hệ di truyền giữa 32 mẫu giống quế

Để tiến hành phân tích và đánh giá mức độ đa hình di truyền của 32 cây được chọn nghiên cứu, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2%. Kết quả phân tích PCR-RAPD với tổng số 22 mẫu thuộc các nhóm OPA, OPC, OPM, OPB, OPL, BIO, UBC, OPN, OPO và nhóm S cho kết quả đa hình là các mẫu: OPA9, OPA12, OPA19, OPB10, OPB17, OPC1, OPC2, OPC5, OPC10, OPM12, OPN4, OPN6, OPN20, OPO10, OPO14, OPO15, BIO24, UBC701, UBC706, UBC728, OPL7 và S201.

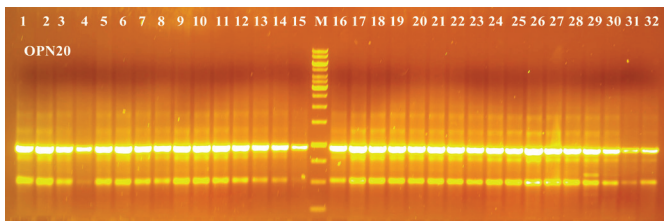
Kết quả phân tích tính đa hình bằng kỹ thuật PCR-RAPD với 22 mẫu được trình bày ở bảng 2 cho thấy, với 704 phản ứng PCR nhận được tổng số 3.137 băng thuộc 126 loại băng có kích cỡ khác nhau. Trong đó 61 băng cho đa hình (chiếm 48,41%) và 65 băng đơn hình (chiếm 51,59%). Kích thước băng có chiều dài nhỏ nhất khoảng 250 bp và băng có kích thước lớn nhất khoảng 3.500 bp. Xuất hiện 2 băng cá biệt, trong

đó mỗi OPN20 nhận được 86 băng và ở mẫu cây được chọn TT02 (mẫu 29) xuất hiện một băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 600 bp. Mỗi UBC728 nhận được 186 băng và ở mẫu cây được chọn XC24 (mẫu 8) khuyết băng ở vị trí khoảng 2.500 bp. Mỗi UBC701 nhận được tổng số băng nhiều nhất là 236 băng. Mỗi OPO14 nhận được số băng ít nhất là 79 băng. Số băng nhận được trung bình cho cả 22 mẫu là 142,59 băng/mẫu.

Bảng 3: số băng thu được trên từng mẫu

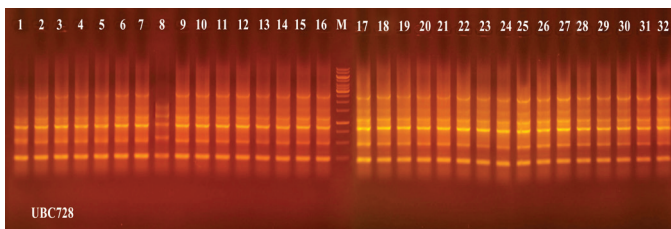
STT	Tên mẫu	Kích thước băng	Loại băng	Số băng đơn hình	Số băng đa hình	Tổng số băng
1	UBC728	250-2500	6	3	3	186
2	OPC10	700-1500	4	2	2	98
3	OPO15	400-1500	4	3	1	97
4	UBC706	600-1600	3	2	1	94
5	OPC2	300-1200	7	4	3	195
6	OPA12	400-2000	7	5	2	168
7	S201	300-2500	7	2	5	163
8	OPO14	400-2200	4	2	2	79
9	BIO24	750-1800	4	2	2	104
10	OPN4	250-2000	5	2	3	83
11	OPN6	500-1500	5	2	3	111
12	OPN10	500-1400	6	4	2	137
13	OPN20	500-1700	6	4	2	150
14	UBC701	270-2000	11	2	9	236
15	OPM12	700-1700	5	3	2	137
16	OPL7	350-2250	8	7	1	228
17	OPA19	280-1250	5	3	2	147
18	OPA9	700-3500	8	4	4	213
19	OPB10	400-1400	6	4	2	172
20	OPC1	250-1600	7	3	4	175
21	OPC5	300-1500	4	3	1	101
22	OPB17	250-1700	6	1	5	127
Tổng			126	65	61	3.137

Kết quả phân tích với mẫu OPN20: kết quả điện di sản phẩm PCR của 32 mẫu quế nghiên cứu với mẫu OPN20 thu được tổng số 6 loại băng với các kích thước khác nhau, trong đó 2 băng đa hình và 4 băng đơn hình. Kích thước băng dao động từ 500 bp đến khoảng 1.700 bp và ở mẫu giống TT02 (mẫu 29) xuất hiện một băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 600 bp. Mỗi OPN20 thu được tổng số 150 băng, các băng xuất hiện rất tách biệt, rõ ràng và đậm nét.



Hình 2: kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR của 32 mẫu giống nghiên cứu với đoạn môi OPN20; (M: marker 1 kb)

Kết quả phân tích với môi UBC728: kết quả điện di sản phẩm PCR với môi UBC728 thu được tổng số 186 băng, thuộc 6 loại băng, trong đó có 3 băng cho đa hình và 3 băng đơn hình. Kích thước băng dao động từ 250 bp đến khoảng 2.500 bp và ở mẫu giống XC24 (mẫu 8) khuyết băng ở vị trí khoảng 2.500 bp. Các mẫu xuất hiện băng khá đậm và tách biệt rõ ràng.



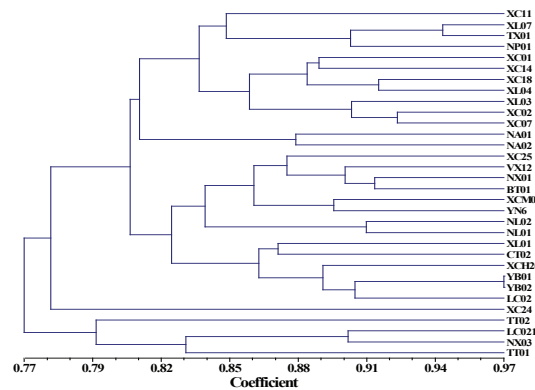
Hình 3: kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR của 32 mẫu giống nghiên cứu với đoạn môi UBC728; (M: marker 1kb)

Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống phản ánh mức độ sai khác di truyền của các mẫu giống với nhau. Hệ số tương đồng di truyền của 32 mẫu giống nghiên cứu là khá cao, dao động trong khoảng 0,67-0,97. Cặp mẫu giống TT01 và XC24 có mức sai khác di truyền lớn nhất (hệ số tương đồng di truyền nhỏ nhất là 0,67). Hai mẫu YB01 và YB02 có hệ số tương đồng cao nhất (gần gũi về mặt di truyền nhất) là 0,97, hai mẫu này đều được thu ở thị trấn Nghĩa Lộ - Văn Chấn - Yên Bái. Từ sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống nghiên cứu cho thấy, ở mức tương đồng khoảng 82% (hệ số tương đồng 0,82) có thể chia 32 mẫu giống nghiên cứu thành 6 nhóm lớn:

Nhóm I: gồm 11 mẫu giống được chia làm 2 nhóm phụ: 1) *Nhóm phụ 1.1:* gồm 4 mẫu giống là XC11, XL07, TX01 và NP01, trong đó có 3 mẫu giống là cây trội dự tuyển, chỉ có mẫu giống NP01 không phải là cây trội dự tuyển. Nhóm này có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,84 (giữa XC11 và XL07) đến 0,94 (giữa XL07 và TX01); 2) *Nhóm phụ 1.2:* gồm 7 mẫu giống là XC01, XC14, XC18, XL04, XL03, XC02 và XC07. Bảy mẫu giống trong nhóm này đều là cây trội dự tuyển và có hệ số tương đồng di truyền dao động từ

0,83 (giữa XL03 đến XL04) đến 0,92 giữa 2 cặp mẫu giống (XC18 - XL04) và (XC02 - XC07).

Nhóm II: gồm 2 mẫu giống NA01, NA02 được thu thập ở Quế Phong, Nghệ An. Hai mẫu này không phải là cây trội dự tuyển và có hệ số tương đồng di truyền với nhau là 0,88.



Hình 4: sơ đồ mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống quế nghiên cứu

Nhóm III: gồm 14 mẫu giống được chia làm 3 nhóm phụ: 1) *Nhóm phụ 3.1:* gồm 6 mẫu giống là XC25, VX12, NX01, BT01, XCM07 và YN6 có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,83 (giữa YN6 và VX12) đến 0,91 (giữa NX01 và BT01). Hai mẫu giống XCM07, YN6 đều là cây trội dự tuyển và thuộc cùng một nhánh phụ của nhóm này; 2) *Nhóm phụ 3.2:* gồm 2 mẫu giống NL02 và NL01 không phải là cây trội, có hệ số tương đồng di truyền với nhau là 0,91; 3) *nhóm phụ 3.3:* gồm 6 mẫu giống là XL01, CT02, XCH20, YB01, YB02 và LC02 có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,83 (giữa XL01 và XCH20) đến 0,97 (giữa YB01 và YB02). YB01 và YB02 đều được thu ở huyện Văn Chấn (Yên Bái) và không phải cây trội.

Nhóm IV: gồm duy nhất mẫu giống XC24, có hệ số tương đồng di truyền với các mẫu giống nghiên cứu dao động từ 0,67 (giữa XC24 và TT01) đến 0,85 (giữa XC24 và XC14).

Nhóm V: gồm duy nhất mẫu giống TT02, có hệ số tương đồng di truyền với các mẫu giống nghiên cứu dao động từ 0,7 (giữa TT02 và NP01) đến 0,83 (giữa TT02 và VX12).

Nhóm VI: gồm 3 mẫu giống là LC021, NX03 và TT01, có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,82 (giữa NX03 và TT01) đến 0,90 (giữa LC021 và NX03).

Kết luận

Kết quả thực hiện 704 phản ứng PCR-RAPD với

22 mẫu ngẫu nhiên trên tập đoàn 32 mẫu giống quế thu được tổng số 3.137 băng, thuộc 126 loại băng có kích cỡ khác nhau, trong đó có 61 băng cho đa hình (chiếm 48,41%), 65 băng đơn hình (chiếm 51,59%). Kích thước băng có chiều dài nhỏ nhất khoảng 250 bp và kích thước băng lớn nhất khoảng 3.500 bp. Ở mức tương đồng khoảng 82%, 32 mẫu giống nghiên cứu được chia thành 6 nhóm cách biệt di truyền.

Sử dụng mỗi OPN20 có thể nhận biết được cây trội dự tuyển TT02 (băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 600 bp) và mỗi UBC728 có thể nhận biết được cây trội dự tuyển XC24 (khuyết băng ở vị trí khoảng 2.500 bp).

Tài liệu tham khảo

[1] S.C. Lee, S.J. Chiou, J.H. Yen, T.Y. Lin, K.T. Hsieh, J.C. Yang (2010), "DNA barcoding *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. based on the partial non-coding ITS2 region of ribosomal genes", *J Food Drug Anal*, **18**, pp.128-135.

[2] S.J. Govinden, V.M. Ranghoo, S.D. Seeburrun (2007), "Tissue culture and RAPD analysis of *Cinnamomum camphora* and *Cinnamomum verum*", *Biotechnology*, **6(2)**, pp.239-244.

[3] J.J. Miss (2010), "Genetic Diversity of *Cinnamomum* spp. In Southern Thailand Based on RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique", *Master thesis in Plant Science*, pp.1-4.

[4] A.M. Sandigawad, C.G. Patil (2011a), "Genetic diversity in some south-Indian *Cinnamomum* Scha. Species revealed by RAPD markers", *Indian J. Genet.*, **71(1)**, pp.87-90.

[5] M.J. Asif, H. Cannon (2005), "DNA extraction from processed wood - a case study for the identification of an endangered species", *Plant Mol Biol Rep*, **23**, pp.185-192.

[6] F.J. Rohlf (2000), "NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system", *Version 2.1. Exeter Publication*, New York, USA.

[7] P.S. Valya, A.P. Viswanath, E.S. Thotten, S. Bhaskaran (2014), "Isolation and amplification of genomic DNA from barks of *Cinnamomum* spp", *Turkish Journal of Biology*, **38**, pp.151-155.

Nghiên cứu môi trường nuôi trồng tạo stroma nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*)

Nguyễn Thị Ngọc Sương*, Trần Minh Mẫn, Nguyễn Đỗ Thanh Phương

Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp công nghệ cao

Ngày nhận bài 22/6/2016, ngày chuyển phản biện 30/6/2016, ngày nhận phản biện 11/8/2016, ngày chấp nhận đăng 15/8/2016

Trong nghiên cứu này, nấm *Cordyceps militaris* được sử dụng là chủng CM3 được lưu trữ trong bộ sưu tập của Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp công nghệ cao. Kết quả thu được khi nghiên cứu trên 9 môi trường cho thấy môi trường tối ưu nhất là M9 (có thành phần gồm gạo lức 60 g, nhộng tằm 10 g, CaCl_2 0,1 g/l, folic acid 5 $\mu\text{g/l}$, nước 90 ml). Trọng lượng tươi, trọng lượng khô và số lượng stroma thu được ở môi trường M9 có kết quả lần lượt là 19,54 g/bình, 3,8404 g/bình, 70,3 stroma/bình. Hàm lượng một số hoạt chất chủ yếu có trong stroma đã được xác định, bao gồm cordycepin (7,7551 mg/g), adenosine (2,0027 mg/g), polysaccharide (166,20 mg/g), ergosterol (1,7369 mg/g).

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, môi trường nuôi trồng thích hợp.

Chỉ số phân loại 4.6

A study into stroma cultivation medium of *Cordyceps militaris*

Summary

In this study, *Cordyceps militaris* strain CM3 stored in the collection of Research and Development Center for High Technology Agriculture was used. 9 media for *C. militaris* cultivation were investigated, and the optimal cultivation medium was found as M9 which consisted of the following components: brown rice 60 g, silkworm pupae 10 g, CaCl_2 0.1 g/l, folic acid 5 $\mu\text{g/l}$, distilled water 90 ml; this medium is suitable for stroma production of *C. militaris*. Fresh weight, dry weight, and the number of stroma reached 19.54 g/bottle, 3.8404 g/bottle, 70.3 stroma/bottle, respectively. Biologically active substance contents of *Cordyceps militaris* stroma are adenosine (2.0027 mg/g), cordycepin (7.7551 mg/g), polysaccharide (166.20 mg/g), ergosterol (1.7369 mg/g).

Keywords: *Cordyceps militaris*, cultivation medium.

Classification numbers 4.6

Đặt vấn đề

Nhộng trùng thảo là loài nấm thuộc chi nấm *Cordyceps* (Fr.) Link thuộc lớp Ascomycetes, được tìm thấy trên ấu trùng, côn trùng trưởng thành. *Cordyceps* có một lịch sử lâu đời như một loại nấm được liệu quý hiếm. Hầu hết người phương Tây chỉ biết đến *Cordyceps* trong vòng 20 năm gần đây, trong suốt khoảng thời gian này, các phương pháp khoa học hiện đại được ứng dụng mạnh mẽ để nghiên cứu phạm vi ứng dụng rộng rãi trong y học của nhóm nấm này [1]. Nấm *Cordyceps* được cho là có khả năng chống ung thư, chống di căn, chống oxy hóa, chống viêm, diệt khuẩn, hạ đường huyết, chống lão hóa, bảo vệ thần kinh và bảo vệ thận [2, 3], tăng cường hệ thống miễn dịch và ức chế khối u [4]. *Cordyceps* đã được thu mẫu và miêu tả trên 400 loài khác nhau ở các vùng khác nhau trên thế giới. Trong đó có nhiều loài được chú ý nhiều đến được lý và dùng làm thuốc chữa bệnh với 2 loài chính là *Cordyceps sinensis* và *Cordyceps militaris*.

Hiện nay, Nhộng trùng thảo có nguồn gốc tự nhiên rất hiếm, giá rất cao, trong khi đó nhu cầu của con người ngày càng tăng. Do đó, cần có một nguồn cung cấp Nhộng trùng thảo số lượng lớn với chất lượng cao. Để đáp ứng yêu cầu này, mô hình công nghệ sản xuất Nhộng trùng thảo *in vitro* trên nguồn cơ chất sẵn có, dễ tìm, giá thành thấp đã được quan tâm nghiên cứu.

Cordyceps là dạng nấm ký sinh có thể nuôi cấy nhân tạo trên cơ thể côn trùng nhưng côn trùng có giá cao và

*Tác giả liên hệ: ngocsuongnguyen10@gmail.com

không có nguồn cung liên tục [5], thêm vào đó thao tác trên côn trùng khó và dễ nhiễm khuẩn nên những chất hữu cơ thay thế được nghiên cứu và thử nghiệm cho việc sản xuất thương mại stroma *C. militaris*. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định môi trường nuôi trồng thích hợp cho Nhộng trùng thảo, từ đó ứng dụng vào sản xuất tạo ra một lượng lớn stroma Nhộng trùng thảo trong thời gian ngắn, với chi phí thấp nhưng chất lượng cao.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: *C. militaris* CM3 thuộc bộ sưu tập giống vi sinh vật của Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp công nghệ cao.

Môi trường thí nghiệm có thành phần gồm gạo lức 60 g, nhộng tằm 10 g, nước cất 90 ml có bổ sung chất khoáng 0,1 g/l và vitamin 5 µg/l. Chất khoáng được sử dụng là KH_2PO_4 , MgSO_4 hoặc CaCl_2 . Vitamin được sử dụng là thiamin, biotin hoặc folic acid.

Các nghiệm thức bao gồm:

M0 (đối chứng): không bổ sung khoáng và vitamin;

M1: có bổ sung KH_2PO_4 + thiamin;

M2: có bổ sung KH_2PO_4 + biotin;

M3: có bổ sung KH_2PO_4 + folic acid;

M4: có bổ sung MgSO_4 + thiamin;

M5: có bổ sung MgSO_4 + biotin;

M6: có bổ sung MgSO_4 + folic acid;

M7: có bổ sung CaCl_2 + thiamin;

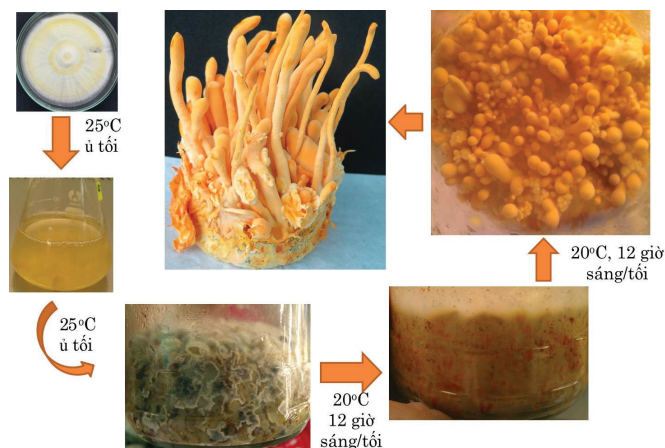
M8: có bổ sung CaCl_2 + biotin;

M9: có bổ sung CaCl_2 + folic acid.

C. militaris CM3 được nuôi cấy tĩnh trên môi trường PGB (potato glucose broth) trong 5 ngày ở nhiệt độ 25°C, ủ tối để tạo nguồn giống cho thí nghiệm. Môi trường PGB có thành phần gồm khoai tây 200 g/l, glucose 20 g/l.

Môi trường nuôi trồng được chuẩn bị theo công thức thí nghiệm và được hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 40 phút. Giống dạng lỏng được cấy vào môi trường cơ chất với lượng giống là 5 ml/bình. Các bình nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 25°C trong tối. Sau khi tơi phủ kín cơ chất, các mẫu thí nghiệm được nuôi trồng trong điều kiện 20°C, chu kỳ chiếu sáng 12

giờ sáng/tối, cường độ ánh sáng 700-1.000 lux, độ ẩm không khí 80-90%.



Sơ đồ: quy trình nuôi trồng *C. militaris*

Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được thu thập sau 50 ngày nuôi cấy. Các chỉ tiêu theo dõi là trọng lượng tươi (g/bình), trọng lượng khô (g/bình), số lượng stroma (stroma/bình), hàm lượng adenosine (mg/g), hàm lượng cordycepin (mg/g), hàm lượng ergosterol (mg/g) và hàm lượng polysaccharide (mg/g).

Trọng lượng tươi của stroma được ghi nhận ngay sau khi stroma được lấy ra khỏi bình nuôi cấy. Stroma của từng bình được đem sấy khô ở nhiệt độ 50°C đến trọng lượng không đổi. Các chỉ tiêu này được thu nhận bằng cân phân tích có độ chính xác cao. Số lượng stroma được đếm là số stroma có chiều cao lớn hơn 3 cm.

Stroma được phân tích hàm lượng hoạt chất cordycepin, adenosine và ergosterol bằng phương pháp HPLC-DAD và hàm lượng polysaccharide bằng phương pháp so màu tại Viện Công nghệ hóa học (Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam).

Tất cả số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1.3.

Kết quả và thảo luận

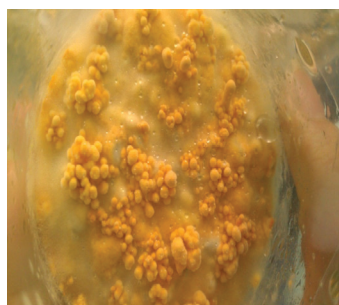
Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp

Ở nghiên cứu này, sau 50 ngày nuôi cấy stroma được thu hoạch. Tuy nhiên, chỉ có môi trường M2, M8, M9 tạo stroma rõ ràng. Các môi trường M0, M1, M3, M4, M5, M6, M7 tuy có tạo mầm stroma nhưng không tạo được stroma lớn. Sau khi phát triển đến chiều cao

hơn 1 cm, mầm stroma ở các công thức thí nghiệm này bị bao bọc bởi sợi nấm dày đặc và ngừng phát triển.



Hình 1: tơ nấm *C. militaris* phát triển trên môi trường gạo



Hình 2: mầm stroma hình thành trên môi trường gạo

Sau khi kết thúc thí nghiệm, stroma được cân đo trọng lượng tươi, trọng lượng khô và đếm số lượng stroma. Kết quả thu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của một số môi trường đến sự tạo thành stroma *Nhộng trùng thảo (C. militaris)*

Môi trường	FW (g/bình)	DW (g/bình)	FB	F (%)
M0 (đối chứng)	-	-	-	-
M1 (KH ₂ PO ₄ + thiamin)	-	-	-	-
M2 (KH ₂ PO ₄ + biotin)	11,78 ^c	2,3735 ^b	9,5 ^b	5,08
M3 (KH ₂ PO ₄ + folic acid)	-	-	-	-
M4 (MgSO ₄ + thiamin)	-	-	-	-
M5 (MgSO ₄ + biotin)	-	-	-	-
M6 (MgSO ₄ + folic acid)	-	-	-	-
M7 (CaCl ₂ + thiamin)	-	-	-	-
M8 (CaCl ₂ + biotin)	12,70 ^b	2,1666 ^b	8,9 ^b	4,64
M9 (CaCl ₂ + folic acid)	19,54 ^a	3,8404 ^a	70,3 ^a	8,23

Các trung bình cùng ký tự không khác biệt có nghĩa thống kê ở mức xác suất $p < 0,05$

FW: trọng lượng tươi của stroma trên một bình nuôi cấy;

DW: trọng lượng khô của stroma trên một bình nuôi cấy;

FB: số stroma trên một bình nuôi cấy;

F: tỷ lệ giữa trọng lượng khô của stroma và cơ chất = $DW \times 100 / 46,66$

Theo kết quả ở bảng 1, môi trường M9 (gạo và nhộng tằm bổ sung CaCl₂ và folic acid) có trọng lượng tươi, trọng lượng khô và số lượng stroma cao hơn các môi trường còn lại. Ở nghiên cứu này, kết quả chỉ thu được ở 3/9 nghiệm thức nên chưa thể nêu lên tác động của khoáng và vitamin đến sự hình thành và phát triển stroma *Nhộng trùng thảo* trên môi trường gạo và nhộng tằm.

Trong nghiên cứu của Kang và cs (2014), 1 bình môi trường gồm 20 g gạo và 32 ml dung dịch dinh dưỡng (10 g/l glucose, 10 g/l peptone, 1 g/l MgSO₄·7H₂O, 1 g/l K₂HPO₄ và 1 mg/l NAA, 1.000 ml nước cất, pH

6,0) trọng lượng khô stroma thu được là 1,73 g sau 60 ngày nuôi cấy. Hàm lượng cordycepin trong stroma cao nhất là 9,17 mg/g sau 72 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ trọng lượng khô của stroma và trọng lượng của gạo (cơ chất tạo stroma) là $F = 8,65\%$ [6]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, $F = 8,23\%$. Như vậy kết quả thu được không chênh lệch đáng kể so với nghiên cứu của Kang và cs (2014).

Số lượng stroma của môi trường M9 ở các bình dao động khá lớn (30-150 stroma). Những bình có số lượng stroma ít thì kích thước stroma to và dài. Những bình có số lượng stroma nhiều (trên 100) thì chỉ có một số stroma to, đa số là stroma nhỏ và ngắn. Số lượng stroma trung bình của môi trường M9 cao gấp 7-8 lần so với môi trường M2 và M8 nhưng trọng lượng khô và trọng lượng tươi chỉ cao gấp 1,5 lần.



Môi trường M2



Môi trường M8



Môi trường M9



Môi trường đối chứng

Stroma bị tơ nấm bao phủ

Hình 3: stroma của *C. militaris* hình thành trên môi trường nuôi trồng

Tuy stroma thu được có số lượng stroma to ít nhưng có một số ưu điểm là sau khi được sấy khô, stroma màu cam đậm, cứng và đặc ruột. Một số sản phẩm

Nhộng trùng thảo trên thị trường Việt Nam có một số đặc tính cảm quan như: nhỏ và mềm; to, mềm và rỗng ruột, màu vàng nhạt. Như vậy, có thể xem đây là sản phẩm vượt trội hơn về mặt cảm quan.



Hình 4: stroma *C. militaris* khô thu được từ thí nghiệm

Một số hoạt chất sinh học trong stroma Nhộng trùng thảo

Stroma khô sau khi thu hoạch được phân tích tại Viện Công nghệ hóa học để khảo sát hàm lượng một số hoạt chất có trong stroma nhằm đánh giá sơ bộ chất lượng. Kết quả thu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: hàm lượng một số hoạt chất sinh học có trong stroma và môi trường nuôi trồng Nhộng trùng thảo (*C. militaris*)

Tên hoạt chất	Hàm lượng (mg/g)
Cordycepin	7,7551
Adenosine	2,0027
Polysaccharide	166,20
Ergosterol	1,7369

Kết quả thu được cho thấy hàm lượng các hoạt chất cordycepin, adenosine, polysaccharide, ergosterol có trong stroma *C. militaris* CM3 trên môi trường M9 tương đối cao. Trong nghiên cứu của Lo và cs (2013), hàm lượng adenosine trong stroma *C. militaris* là $2,45 \pm 0,03$ mg/g [7]. Theo nghiên cứu của Hur (2008), hàm lượng adenosine trong stroma là 1,8 mg/g và trong hệ sợi nấm là 0,6 mg/g; hàm lượng cordycepin trong stroma là 9,7 mg/g và trong hệ sợi nấm là 3,6 mg/g [8]. Theo nghiên cứu của Kang và cs (2014), hàm lượng cordycepin là 9,17 mg/g, adenosine là 1,21 mg/g [6]. Còn theo Zhoua và cs (2009), hàm lượng ergosterol trong stroma nhân tạo của *Cordyceps* rất cao (10,68 mg/g) [9]. Tuy nhiên, một số sản phẩm Nhộng trùng thảo trên thị trường Việt Nam có hàm lượng cordycepin là 2,9 mg/g; hàm lượng adenosine là 0,43 và 1,1 mg/g. Như vậy, stroma thu được từ nghiên cứu này có hàm

lượng hoạt chất chưa cao bằng một số nghiên cứu trên thế giới nhưng không thua kém một số sản phẩm Nhộng trùng thảo Việt Nam.

Kết quả thu được ở nghiên cứu này là đã tạo được stroma trên môi trường nhân tạo năng suất tương đối cao nhưng hàm lượng hoạt chất chưa cao. Vì vậy cần có nghiên cứu tiếp về phương pháp làm tăng hàm lượng hoạt chất có trong stroma nhằm làm tăng giá trị kinh tế của sản phẩm.

Kết luận

- Môi trường thích hợp cho nuôi trồng Nhộng trùng thảo có thành phần gồm gạo lức 60 g, nhộng tằm 10 g, CaCl_2 0,1 g/l, folic acid 5 $\mu\text{g/l}$, nước 90 ml. Stroma thu được có trọng lượng tươi là 19,54 g/bình, trọng lượng khô là 3,8404 g/bình và số lượng stroma là 70,3 stroma/bình.

- Hàm lượng một số hoạt chất có stroma Nhộng trùng thảo là cordycepin 7,7551 mg/g, adenosine 2,0027 mg/g, polysaccharide 166,20 mg/g, ergosterol 1,7369 mg/g.

Tài liệu tham khảo

- [1] J. Holliday, M. Cleaver, S.P. Wasser (2005), "Cordyceps", *Encyclopedia of dietary supplements*, pp.1-13.
- [2] M.G. Shashidhara, P. Giridhar, S.K. Udaya, B. Manohar (2013), "Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement - A review", *Journal of Functional foods*, **5**(3), pp.1013-1030.
- [3] R. Yu, L. Song, Y. Zhao, W. Bin, L. Wang, H. Zhang, Y. Wu, W. Ye, and X. Yao (2004), "Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*", *Fitoterapia*, **75**, pp.465-472.
- [4] Z.Z. Zhao, J.P.S. Yuen, J.L. Wu, et al (2006), "A systematic study on confused species of Chinese Materia Medica in the Hong Kong market", *Ann Acad Med Singap*, **35**, pp.764-769.
- [5] Q.Y. Lin, Y.J. Zhong, T.H. Li et al (2006), "Recent research advances in *Cordyceps* biology", *Acta Edulis Fungi*, **13**(2), pp.93-98.
- [6] J.C. Kang, T.C. Wen, G.R. Li, C. Kang and K.D. Hyde (2014), "Optimization of solid-state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris*", *Chiang Mai J. Sci.*, **41**(4), pp.858-872.
- [7] H.C. Lo, H. Chienyan, Y.L. Fang and T.H. Hsu (2013), "A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in DongChong XiaXao and Relates Bioactive ingredients", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **3**(1), pp.16-32.
- [8] H. Hur (2008), "Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris*", *Mycobiology*, **36**(4), pp.233-235.
- [9] X. Zhoua, Z. Gongga, Y. Sua, J. Linb and K. Tang (2009), "Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **61**(3), pp.279-291.

Sử dụng chỉ thị mã vạch để phân loại ốc hương

Thái Thanh Bình^{1*}, Nguyễn Văn Hà², Lưu Văn Huyền³

¹Trường Cao đẳng thủy sản

²Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III

³Trường Đại học Tài nguyên và môi trường

Ngày nhận bài 8/9/2016, ngày chuyển phản biện 12/9/2016, ngày nhận phản biện 14/10/2016, ngày chấp nhận đăng 21/10/2016

Ốc hương là loài nhuyễn thể có giá trị kinh tế cao. Hiện nay, ốc hương được nuôi phổ biến trong ao và lồng tại các tỉnh như: Phú Yên, Khánh Hòa, Bình Thuận, Kiên Giang. Sản lượng ốc hương cả nước hàng năm đạt trên 7.000 tấn. Nghề nuôi ốc hương phát triển được hơn 15 năm nhưng phân loại ốc hương còn chưa rõ ràng. Nghiên cứu trình bày kết quả phân loại ốc hương được thu từ 7 tỉnh ở Việt Nam bằng mã vạch ADN vùng gen COI (Cytochrome c oxidase subunit I). Trình tự ADN của ốc hương Việt Nam được so sánh với trình tự ADN dữ liệu các loài ốc hương trên ngân hàng gen. Kết quả nghiên cứu cho thấy, số lượng Haplotype phát hiện được là 6, hệ số đa dạng haplotype là $0,442 \pm 0,124$, hệ số đa dạng nucleotide là 0,0008, ốc hương Việt Nam giống với mẫu ốc hương *Babylonia areolata* ở ngân hàng gen. Kết quả phân tích di truyền phủ hệ cũng xác định ốc hương Việt Nam là loài *Babylonia areolata*.

Từ khóa: ADN mã vạch, *Babylonia areolata*, COI, ốc hương.

Chỉ số phân loại 4.6

Application of DNA barcoding markers to classify Spotted babylon

Summary

Spotted babylon is a high value molluscos species. Nowadays spotted babylons are cultivating popularly in ponds and cages in Phu Yen, Khanh Hoa, Binh Thuan, and Kien Giang provinces. The annual production of spotted babylons is about 7000 tons. Although spotted babylons have been cultured over 15 years, the taxonomy of this species is still unclear. This study presents the taxonomy results of babylon snails collected from seven provinces in Vietnam using DNA barcoding of COI gene region. The DNA sequencing of Vietnamese spotted babylons was compared with those of Genbank data. The results of the study showed that 6 haplotypes was found. The haplotype diversity was 0.442 ± 0.124 ; the nucleotide diversity was 0.0008; and Vietnamese spotted babylonia was similar to the *Babylonia areolata* samples from the Genbank. Phylogenetic analysis also identified that Vietnamese spotted babylon is *Babylonia areolata*.

Keywords: *Babylonia areolata*, COI, DNA barcoding, Spotted babylon.

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Ở Việt Nam, ốc hương phân bố rải rác dọc ven biển từ Bắc vào Nam, trong đó các khu hệ phân bố chính là Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, đặc biệt có nhiều ở 2 tỉnh Bình Thuận và Bà Rịa - Vũng Tàu. Khu vực ốc hương phân bố cách xa bờ 2-3 km, có nền đáy ghồ ghề tương đối dốc. Ốc hương là loài thủy sản nuôi và là mặt hàng xuất khẩu có giá trị cao (giá xuất khẩu khoảng 10-12 USD/kg), với nhiều thị trường tiềm năng như Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản, Hồng Kông [1].

Sản xuất giống và nuôi ốc hương thương phẩm đã được Nguyễn Thị Xuân Thu và cs thử nghiệm thành công vào năm 1998. Đến nay, nghề nuôi ốc hương đã phát triển rộng ra nhiều vùng trong tỉnh Khánh Hòa và các tỉnh Phú Yên, Thừa Thiên - Huế, Quảng Nam, Ninh Thuận, Bình Thuận. Hiện nay, cả nước có khoảng 600 trại sản xuất giống ốc hương, hơn 700 ha nuôi ốc hương thương phẩm cho sản lượng hàng năm trên 7.000 tấn, doanh thu ước tính trên 700 tỷ đồng [2].

Mặc dù ốc hương đã được nuôi phổ biến và trở thành mặt hàng xuất khẩu có tiềm năng của Việt Nam hơn 15 năm qua nhưng phân loại ốc hương Việt Nam dựa vào hình thái chưa đủ thuyết phục. Đoạn gen nằm trên ADN ty thể, COI được xem như là mã vạch ADN

*Tác giả liên hệ: Email: ttbinh@cdis.edu.vn

trong phân loại động vật rất hữu hiệu [3]. Mã vạch COI đã được sử dụng nhiều trong định danh nhuyễn thể (đánh giá các loài nhuyễn thể biển ở Canada [4], ốc ở châu Phi [5]).

Nghiên cứu này trình bày kết quả xác định hệ thống phân loại ốc hương Việt Nam, góp phần định hướng bảo tồn, quản lý giống thủy sản và đánh giá chất lượng sản phẩm đặc sản ốc hương Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Ốc hương được thu ở tự nhiên và nuôi ở các trại giống.

Phương pháp thu và bảo quản mẫu

Phương pháp thu mẫu: mẫu ốc hương được thu từ các tỉnh Quảng Ninh, Thanh Hóa, Quảng Trị, Khánh Hòa, Bình Thuận và Bà Rịa - Vũng Tàu bằng hình thức thu mua của ngư dân khai thác. Ngoài ra, các mẫu ốc hương nuôi tại các trại giống ở Ninh Thuận và Khánh Hòa cũng được thu để đối chiếu và làm rõ loài ốc hương được nuôi phổ biến hiện nay. Nhận diện ốc hương bằng phương pháp mô tả các đặc điểm hình thái của Nguyễn Chính [6]. Số lượng mẫu thu và phân tích được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: địa điểm thu mẫu và số mẫu ốc hương được giải trình tự ADN

STT	Địa điểm thu mẫu	Ký hiệu mẫu	Số mẫu được giải trình tự ADN (mẫu)	Ghi chú
1	Bán Sen, Văn Đồn, Quảng Ninh	BST	3	Tự nhiên
2	Quảng Lợi, Quảng Xương, Thanh Hóa	THT	3	Tự nhiên
3	Đo Hải, Gio Linh, Quảng Trị	QTT	3	Tự nhiên
4	Ninh Thọ, Ninh Hòa, Khánh Hòa	KHT	3	Tự nhiên
5	Vĩnh Hòa, Nha Trang, Khánh Hòa	KHN	3	Nuôi
6	Nhon Hải, Ninh Hải, Ninh Thuận	NTN	3	Nuôi
7	Phan Ri Cửa, Tuy Phong, Bình Thuận	BTT	3	Tự nhiên
8	Long Sơn, Bà Rịa - Vũng Tàu	VTT	3	Tự nhiên
	Tổng cộng		24	

Phương pháp bảo quản mẫu: mẫu là một phần chân bò của ốc hương (5-10 g/mẫu). Mẫu được bảo quản trong ống eppendorf (2 ml) có chứa cồn nồng độ 90%.

Phương pháp tách chiết và giải trình tự ADN

ADN tổng số được tách chiết từ cơ thịt của ốc hương bằng bộ kit Dneasy Blood & Tissue Kit - QIAGEN theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đoạn gen COI của ADN ty thể được khuếch đại bằng sử dụng cặp mồi COI:LCO1490 và HCO2198 [7]. Mỗi phản ứng PCR

được thực hiện với thể tích 25 µl (nước tinh khiết 4,2 µl, Coral co 5, Top taq Maxter mix 12,5 µl, primers 2 µl, ADN cá bống 1,3 µl). Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR nhân bản vùng gen COI: 95°C trong 4 phút, tiếp theo 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, nhiệt độ gắn mồi 54°C và 72°C trong 1 phút), kéo dài đoạn 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được làm sạch bằng QIAGEN QIAquick PCR kit. Phương pháp làm sạch sản phẩm PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose/TAE 1,5%. Tiếp theo, trình tự ADN được giải trên máy ABI 3130XL, mỗi mẫu được giải trình tự bằng 2 mồi xuôi và ngược. Quá trình thực hiện tách chiết ADN, PCR, làm sạch sản phẩm PCR được thực hiện tại Phòng Công nghệ sinh học thủy sản, Trường Cao đẳng thủy sản (Bắc Ninh). Phản ứng giải trình tự và đọc trình tự ADN được thực hiện tại Trường Đại học Monash (Malaysia).

Phân tích số liệu

Các trình tự ADN ty thể của ốc hương vùng gen COI được dóng và so sánh với nhau bằng phần mềm đọc trình tự BioEdit [8]. Tổng số haplotype, số lượng vị trí đa hình polymorphic sites, đa dạng haplotype và đa dạng nucleotide được tính bằng phần mềm DNAsp5 [9]. Cây phả hệ xây dựng dựa trên 3 thuật toán Neighbor joining (NJ), Minimum Evolution (ME) và Maximum likelihood (ML), các phương pháp được phân tích bằng các phần mềm MEGA 6 [10]. Giá trị bootstrap được tính toán để xác định tính chính xác của thuật toán ME, ML và NJ với độ lặp lại là 1.000 lần.

Các trình tự ADN của ốc hương được đối chiếu với trình tự ADN của 6 loài ốc hương đã công bố trên ngân hàng gen, gồm: *B. areolata* (JN053011.1), *B. lutosa* (KF897830.1), *B. formosae* (HQ424447.1), *B. japonica* (AF373888), *B. lani* (HQ424448.1), *B. spirata* (JN088258.1) thông qua công cụ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định mức độ giống nhau về loài.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Trình tự ADN vùng gen COI của ốc hương Việt Nam

Một phần của gen COI đã được phân tích, tỷ lệ các loại nucleotide như sau: adenine (A) chiếm 23,55%, cytosine (C) chiếm 18,13%, guanine (G) chiếm 19,96% và thymine (T) chiếm 38,37%. Trong chiều dài của đoạn gen gồm 662 bp (basepair) có 5 vị trí thay đổi trình tự nucleotide đã tìm thấy. Xu hướng thay đổi

trình tự nucleotide trong cùng nhóm (purine, A và G, hay pyrimidine, T và C) cao hơn so với thay đổi giữa các nhóm (bảng 2).

Bảng 2: tỷ lệ thay đổi trình tự nucleotide của đoạn gen COI của ốc hương Việt Nam

	A	T	C	G
A	-	0,0049	0,0023	31,8904
T	0,0030	-	9,7737	0,0025
C	0,0030	20,6876	-	0,0025
G	37,6229	0,0049	0,0023	-

Tỷ lệ trên được ước lượng dựa vào phương pháp Maximum Composite Likelihood, thực hiện bằng chương trình MEGA5.2. Số in đậm thể hiện tỷ lệ thay đổi trong cùng nhóm và in nghiêng là tỷ lệ thay đổi giữa các nhóm bazơ

Kết quả phân tích số liệu các trình tự ADN của ốc hương cho thấy, trên tổng số 662 base thì có 6 vị trí đa hình và 6 haplotype được phát hiện. Hệ số đa dạng haplotype là $0,442 \pm 0,124$ và hệ số đa dạng nucleotide là 0,0008.

So sánh trình tự ADN ốc hương Việt Nam với dữ liệu trên ngân hàng gen

Kết quả so sánh trình tự ADN của ốc hương Việt Nam với các trình tự ADN của các loài ốc hương đã được công bố ở ngân hàng gen cho thấy, ốc hương Việt Nam có mức độ tương đồng (ident) cao với loài *B. areolata* từ 99 đến 100%, loài *B. lani* 95-96% nhưng thấp với các loài *B. formosae*, *B. japonica*, *B. spirata*. Mức độ tương đồng 82-91% (bảng 3).

Bảng 3: so sánh mức độ tương đồng trình tự ADN của ốc hương Việt Nam với trình tự ADN của các loài ốc hương đã công bố trên Genbank

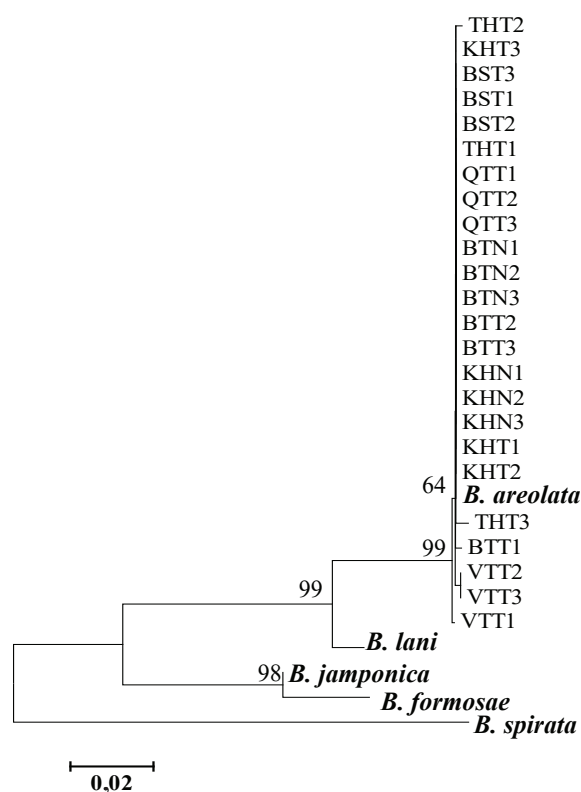
	<i>B. areolata</i>	<i>B. formosae</i>	<i>B. japonica</i>	<i>B. lani</i>	<i>B. spirata</i>
BST	99	89	90	96	84
THT	100	87	90	95	83
QTT	100	88	91	95	82
KHT	100	87	89	95	83
KHN	99	87	90	96	83
NTN	99	88	90	96	83
BTT	100	87	91	95	84
VTT	100	87	91	95	83

Theo Stackebrandt và Ebers [11], khi sử dụng công cụ BLAST ở ngân hàng gen để so sánh trình tự ADN của một loài cần nghiên cứu với số liệu trên ngân hàng gen có chỉ số giống nhau lớn hơn hoặc bằng 97% thì được cho là cùng một loài và ngược lại nếu chỉ số giống nhau nhỏ hơn 97% là khác loài. Do đó có thể

khẳng định ốc hương Việt Nam là loài *B. areolata*. Kết quả của nghiên cứu này cũng giống với kết quả nghiên cứu phân loại ốc hương Việt Nam của Nguyễn Chính [6], tác giả đã sử dụng các đặc điểm hình thái của ốc hương để phân loại như: hình xoay của tháp ốc, hình dạng các phiến màu ở vỏ ốc.

Khoảng cách và mối quan hệ di truyền giữa các loài ốc hương

Cây phả hệ của các loài ốc hương được xây dựng dựa trên trình tự ADN của ốc hương Việt Nam và dữ liệu ở ngân hàng gen bằng 3 thuật toán (NJ, ME và ML) cho kết quả giống nhau (hình 1).



Hình 1: cây phả hệ từ phương pháp Maximum Likelihood với độ lặp lại 1.000 lần dựa trên gen COI của ốc hương Việt Nam

Từ cây phả hệ cho thấy, ốc hương Việt Nam nằm trong 1 nhóm lớn bao gồm mẫu ốc hương *B. areolata*. Ốc hương Việt Nam có quan hệ gần với loài *B. lani* và xa với các loài *B. formosae*, *B. japonica* và *B. spirata*.

Các mẫu ốc hương tự nhiên và nuôi ở Việt Nam gần như không có sự khác biệt với mẫu ốc hương ở ngân hàng gen *B. areolata* ($F_{st} = 0-0,001$). Ốc hương Việt Nam gần với loài *B. lani* ($F_{st} = 0,037$) và khác với 3 loài *B. formosae*, *B. japonica* và *B. spirata* ($F_{st} = 0,114-0,217$) (bảng 4).

Bảng 4: khoảng cách di truyền giữa các loài ốc hương

	<i>B. areolata</i>	<i>B. lani</i>	<i>B. jamponia</i>	<i>B. formosae</i>
<i>B. areolata</i>				
<i>B. lani</i>	0,037			
<i>B. jamponia</i>	0,114	0,103		
<i>B. formosae</i>	0,140	0,128	0,017	
<i>B. spriata</i>	0,217	0,183	0,187	0,179

Kết quả bảng 4 cho thấy, mã vạch COI rất hữu hiệu trong đánh giá đa dạng di truyền giữa các loài. Trong nghiên cứu này, các loài ốc hương có khoảng cách di truyền 0,037-0,217. Chen và cs [12] cũng đã công bố khoảng cách di truyền giữa các loài ngao phân bố ở vùng triều của Trung Quốc có khoảng cách di truyền 0,043-0,148 khi giải trình tự vùng gen COI.

Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy mã vạch COI rất hữu hiệu trong việc nhận biết ốc hương Việt Nam. Ốc hương Việt Nam có tên khoa học là *Babylonia areolata*.

Các nghiên cứu tiếp theo cần sử dụng thêm mã vạch từ các gen trong nhân để bổ trợ thêm phân loại của ốc hương.

Tài liệu tham khảo

[1] Nguyễn Văn Hà (2004), “Tình hình phát triển nghề nuôi ốc hương (*Babylonia areolata* Link 1807) ở các tỉnh miền Trung”, *Tuyển tập báo cáo khoa học Hội thảo động vật thân mềm toàn quốc lần thứ*

3, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

[2] Nguyễn Văn Hà (2014), “Tình hình phát triển nghề nuôi ốc hương ở Việt Nam”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **4**, pp.16-21.

[3] P.D. Hebert, A. Cywinski, S.L. Ball, J.P. Dewaard (2003), “Biological identifications through DNA barcodes”, *Biological Sciences*, **270**, pp.313-321.

[4] K.S.K. Layton, L.A. Martel, N.D.P. Hebert (2014), “Patterns of DNA Barcode Variation in Canadian Marine Molluscs”, *PLoS ONE*, **9**(4), e95003. doi:10.1371/journal.pone.0095003.

[5] V. Herman, Der Bank, G. Richard (2015), “Richard Greenfield1A pioneer survey and DNA barcoding of some commonly found gastropod molluscs on Robben Island”, *ZooKeys*, **481**, pp.15-23.

[6] Nguyễn Chính (1996), *Một số loài nhuyễn thể có giá trị kinh tế ở biển Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

[7] O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek (1994), “DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates”, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, pp.294-299.

[8] T.A. Hall (1999), “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT”, *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, pp.95-98.

[9] P. Librado, J. Rozas (2009), “DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data”, *Bioinformatics*, **25**(11), pp.1451-1452.

[10] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kuma (2013), “MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0”, *Molecular Biology and Evolution*, **30**, pp.2725-2729.

[11] E. Stackebrandt, J. Ebers (2006), “Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards”, *Microbiology Today*, **33**, pp.152-155.

[12] Chen Ai-hui, Li Zhao-xia, Feng Gong-neng (2009), “Phylogenetic Relationships of the Genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) Based on Mitochondrial COI Gene Sequences”, *Zoological Research*, **30**(3), pp.233-239.

Đóng góp của tăng TFP vào tăng trưởng của một số ngành công nghiệp chế biến chế tạo: ước lượng từ số liệu điều tra doanh nghiệp

Nguyễn Khắc Minh¹, Nguyễn Thị Lê Hoa^{2*}

¹Trường Đại học Kinh tế Quốc dân

²Viện Năng suất Việt Nam

Ngày nhận bài 3/11/2016, ngày chuyển phản biện 7/11/2016, ngày nhận phản biện 21/12/2016, ngày chấp nhận đăng 26/12/2016

Mục tiêu của nghiên cứu này là ước lượng đóng góp của năng suất yếu tố tổng hợp (TFP) đối với tăng trưởng của một số ngành thuộc lĩnh vực công nghiệp chế biến, chế tạo. Nghiên cứu ứng dụng hàm sản xuất động dạng tân cổ điển tính đóng góp của TFP đến tăng trưởng đầu ra của các ngành. Để khắc phục tính nội sinh của các yếu tố đầu vào khi ước lượng hàm sản xuất, các tác giả sử dụng kỹ thuật bán tham số do Olley-Pakes (1996) đề xuất và sau đó được Levinshon-Petrin (2003) cải biên. Kết quả ước lượng các mô hình đã xây dựng được từ số liệu điều tra một số ngành công nghiệp do Viện Năng suất Việt Nam thực hiện. Kết quả ước lượng cho thấy, trong giai đoạn 2010-2014 đóng góp của TFP vào tăng trưởng đầu ra của toàn mẫu 7 ngành là 1,82%, ngành chế biến thực phẩm là 1,34%, ngành dệt là 1,74%, ngành sản xuất trang phục là 2,1%, ngành sản xuất da và sản phẩm liên quan là 2,9%, ngành sản xuất hóa chất là 2,3% và ngành sản xuất sản phẩm từ cao su - plastic là 0,98%.

Từ khóa: năng suất yếu tố tổng hợp (TFP), phương pháp bán tham số, tiến bộ công nghệ.

Chỉ số phân loại 5.2

Tổng quan các nghiên cứu liên quan

Năm 1957, Solow [1] đã công bố bài báo “Thay đổi kỹ thuật và hàm sản xuất gộp”, trong đó ông đã dùng phương pháp hạch toán để giải thích tăng trưởng đầu ra. Kết quả phân rã của ông cho thấy, tăng trưởng đầu ra bằng với trung bình có trọng số của tăng vốn, tăng lao động và thành phần không giải thích được (được gọi là tăng năng suất yếu tố tổng hợp - TFP). Solow đã sử dụng phương pháp hạch toán tăng trưởng với các giá trị 0,65 đối với α , 0,35 đối với β và những thay đổi quan sát được của Y (đầu ra), L (lao động) và K (vốn) trong hàm sản xuất $Y = A \cdot K^\alpha L^\beta$ để suy ra tốc độ thay đổi kỹ thuật đối với đầu ra phi nông nghiệp ở Mỹ giai đoạn 1909-1949. Ông đã ước lượng xu thế tăng năng suất 1,5%/năm thời kỳ này, xấp xỉ 1%/năm trong thời kỳ 1909-1929 và xấp xỉ 2%/năm trong thời kỳ 1929-1949. Trong mô hình Solow, tăng trưởng dài hạn chỉ xảy ra khi có tiến bộ công nghệ. Nếu không có tiến bộ công nghệ thì tích lũy vốn sẽ gặp phải vấn đề hiệu quả giảm dần. Tuy nhiên, tiến bộ công nghệ sẽ liên tục bù đắp cho sự suy giảm hiệu quả của tích lũy vốn. Năng suất lao động tăng lên trực tiếp do sự cải thiện của công nghệ và gián tiếp do việc bổ sung thêm vốn nhờ vào tiến bộ công nghệ [2].

Một số nhà kinh tế đã áp dụng cách tiếp cận của Solow để tìm hiểu nguồn gốc của tăng trưởng đầu ra. Aukrust đã ước lượng đóng góp của TFP vào tăng trưởng của Na Uy giai đoạn 1900-1955 (trừ 5 năm từ 1940 đến 1945) [3]. Ông đã ước lượng các hệ số co giãn theo lao động và vốn tương ứng là 0,76 và 0,20, và tốc độ thay đổi kỹ thuật (TFP) là 1,8% mỗi năm. Như vậy, với đầu vào lao động và tư bản không tăng chút nào, đầu ra sẽ tăng với tốc độ 1,8%/năm.

Intriligator đã ước lượng hàm sản xuất đối với tổng đầu ra của công nghiệp chế biến chế tạo ở Mỹ giai đoạn 1929-1958 [4]. Ông đã sử dụng chuỗi thời gian khác nhau đối với đầu vào lao động gắn với những điều chỉnh trong hiệu quả của lực lượng lao động, bao gồm những điều chỉnh đối với những thay đổi trong số giờ lao động, học vấn và cơ cấu tuổi - giới tính của lực lượng lao động. Ông đã ước lượng được thay đổi kỹ thuật trong các ngành này là 1,67%/năm.

Một nghiên cứu có liên quan khác là của Brown [5]. Tác giả đã ước lượng mô hình sai phân trên những thời kỳ khác nhau, khi coi đầu ra phi nông nghiệp tư nhân ở Mỹ tính theo giá so sánh năm 1929 là hàm số của số giờ lao động và tài sản ròng theo giá so sánh 1929

*Tác giả liên hệ: Email: dmphuong@vnpi.vn

The contribution of TFP growth to the growth of several processing and manufacturing sectors: the findings from an enterprise survey

Summary

This study aims to examine the contribution of TFP to the growth of several processing and manufacturing sectors. The study applies the dynamic production function derived from a neoclassic model to measure the contribution of TFP to the output growth in some certain sectors. In addition, the study overcomes the endogeneity of inputs while estimating the production function and estimating the contribution of TFP to the output growth by applying the semi parameter technique proposed by Olley-Pakes (1996), later developed by Levinshon and Petrin methodology (2003). Using data from the survey implemented by Vietnam National Productivity Institute, the results from this study show that the contribution of TFP to the output growth in several processing and manufacturing sectors for all samples is 1.82%. Furthermore, the study has found that TFP's contribution ratios to the output growth for manufacture of food products, textiles, wearing apparel, and leather and related products are 1.34%, 1.74%, 2.1%, and 2.9%, respectively. Similarly, the contribution of TFP is estimated at 2.3% for manufacture of chemicals and chemical products and 0.98% for manufacture of rubber and plastic products.

***Keywords:* semi-parameter methodology, technical progress, total factor productivity (TFP).**

***Classification number* 5.2**

được điều chỉnh theo mức sử dụng tài sản ước lượng dựa vào độ co giãn của vốn và lao động từ hàm sản xuất Douglas. Boskin và Lau [6] sử dụng hàm sản xuất log siêu việt để ước lượng bao nhiêu tăng trưởng đầu ra ở Mỹ, Nhật Bản, Đức, Pháp và Anh có thể quy cho do tích lũy vốn và thay đổi kỹ thuật (TFP). Các tác giả thấy rằng, trên 70% thay đổi đầu ra ở Mỹ có thể do tích lũy vốn và thay đổi kỹ thuật, trong khi đó ở các nước còn lại là trên 95%. Họ cũng nhận thấy, thay đổi kỹ thuật làm tăng thêm tích lũy vốn, tăng tích lũy vốn có

được từ tiết kiệm tư bản, chứ không phải tiết kiệm lao động, và do đó tự nó không dẫn đến thất nghiệp. Theo đó, sản xuất của toàn bộ nền kinh tế thể hiện có hệ số hoàn vốn giảm mạnh theo quy mô và hệ số co giãn giữa lao động và tư bản nằm hẳn giữa 0 và 1.

Ở Việt Nam cũng có một số tác giả sử dụng tiếp cận hạch toán tăng trưởng như Tăng Văn Khiên [7] và Trần Thọ Đạt [8]. Nguyễn Khắc Minh và cộng sự đã sử dụng hàm sản xuất với số liệu về GDP, vốn và lao động để ước lượng hàm sản xuất và phân rã tăng trưởng đầu ra của Việt Nam trong thời kỳ 1985-2006 [9, 10]. Tác giả đã chỉ ra rằng, có đến 1,9% tăng trưởng đầu ra của Việt Nam trong thời kỳ này là do đóng góp của TFP. Tuy nhiên, việc ước lượng hàm sản xuất sẽ gặp phải trở ngại là tính nội sinh của các yếu tố đầu vào. Như vậy vấn đề đặt ra là phải xây dựng mô hình và kỹ thuật ước lượng như thế nào để có thể cho phép khắc phục được độ chệch do tính nội sinh của các yếu tố đầu vào.

Cơ sở phương pháp luận

Mô hình hóa TFP

Theo truyền thống, tiến bộ công nghệ được tính trong các mô hình tăng trưởng tân cổ điển với ngầm định về hàm sản xuất chung cho mọi quốc gia và nó không quan tâm tới sự khác biệt về nguồn vốn nhân lực, cũng như các yếu tố thể chế. Sau đó, các nghiên cứu về hàm sản xuất đã bắt đầu ước lượng và đưa thêm vào sự đóng góp của công nghệ, vốn, nhân lực, và các nhân tố sản xuất khác bằng cách sử dụng những dạng hàm sản xuất nhất định. Trong phần này, chúng tôi sẽ mô tả một cách sơ lược về cách tiếp cận hàm sản xuất để ước lượng tăng TFP, nguồn gốc của tăng trưởng kinh tế. Phân tích hạch toán tăng trưởng được dựa trên hàm sản xuất, thể hiện mối quan hệ giữa sản lượng và nhân tố đầu vào. Dạng tổng quát của hàm sản xuất như sau:

$$Y(t) = f(L(t), K(t), M(t), t); \quad \left(\frac{\partial f}{\partial t} > 0 \right) \quad (1)$$

Trong đó: $Y(t)$ là sản lượng tại thời điểm t ; $L(t)$ là lao động tại thời điểm t ; $K(t)$ là vốn tại thời điểm t ; $M(t)$ là đầu vào trung gian tại thời điểm t ; biến số thời gian t cũng được đưa vào để thể hiện việc hàm sản xuất thay đổi theo thời gian. Dựa vào hàm sản xuất này, sản lượng Y tăng lên phải xuất phát từ sự tăng lên của đầu vào hay sự thay đổi kỹ thuật sản xuất. Ở điểm này, có hai cách tiếp cận cơ bản đối với việc tính mức đóng góp của đầu vào tới tăng trưởng sản lượng, đó là

cách tiếp cận hàm sản xuất và tiếp cận hạch toán tăng trưởng. Tuy nhiên trong phần này chúng tôi chỉ trình bày cách tiếp cận hàm sản xuất.

Cách tiếp cận hàm sản xuất đòi hỏi phải có một dạng hàm sản xuất cụ thể. Từ dữ liệu chuỗi thời gian về đầu ra và đầu vào, các tham số của hàm sản xuất được ước lượng và được sử dụng để tính toán mức đóng góp của mỗi nhân tố. Từ phương trình (1), lấy đạo hàm của y theo thời gian, sau đó tính mức thay đổi trong sản lượng theo thời gian, ta được:

$$\frac{dY}{dt} = \frac{\partial f(.)}{\partial K} \frac{dK}{dt} + \frac{\partial f(.)}{\partial L} \frac{dL}{dt} + \frac{\partial f(.)}{\partial M} \frac{dM}{dt} + \frac{\partial f(.)}{\partial t} \quad (2)$$

$$\text{Hay } \dot{Y} = \frac{\partial f(.)}{\partial K} \dot{K} + \frac{\partial f(.)}{\partial L} \dot{L} + \frac{\partial f(.)}{\partial M} \dot{M} + \dot{f}(\cdot) \quad (3)$$

Trong đó, dấu chấm (.) ở trên mỗi biến số biểu thị sự thay đổi theo thời gian (đạo hàm theo thời gian). Hai thành phần đầu tiên trong vế phải của phương trình (2) thể hiện sự thay đổi của sản lượng do sự thay đổi đầu vào là vốn và lao động, tức là di chuyển dọc theo hàm sản xuất. Thành phần cuối cùng trong vế phải của phương trình biểu thị sự thay đổi của sản lượng do sự thay đổi TFP hay do thay đổi tiến bộ công nghệ, thể hiện sự dịch chuyển của hàm sản xuất. Loại thay đổi kỹ thuật này được gọi là tiến bộ công nghệ không được biểu hiện vì nó không gắn với số lượng nhân tố đầu vào, nó liên quan đến việc sử dụng đầu vào và thường gọi là năng suất yếu tố tổng hợp (TFP). Sự thay đổi này vẫn diễn ra dù đầu vào có thay đổi hay không.

Chúng ta chia phương trình (3) cho Y để có được phương trình (4):

$$\frac{\dot{Y}}{Y} = \frac{\partial f(.)}{\partial K} \frac{\dot{K}}{Y} + \frac{\partial f(.)}{\partial L} \frac{\dot{L}}{Y} + \frac{\partial f(.)}{\partial M} \frac{\dot{M}}{Y} + \frac{\dot{f}}{Y} \quad (4)$$

Thay Y bằng $f(.)$ bên vế phải, chúng ta sẽ có:

$$\frac{\dot{Y}}{Y} = \frac{\partial f(.)}{\partial K} \frac{K}{f(.)} \frac{\dot{K}}{K} + \frac{\partial f(.)}{\partial L} \frac{L}{f(.)} \frac{\dot{L}}{L} + \frac{\partial f(.)}{\partial M} \frac{M}{f(.)} \frac{\dot{M}}{M} + \frac{\dot{f}(\cdot)}{f} \quad (5)$$

$$\text{Trong đó: } \dot{Y} = \frac{dY}{dt}, \dot{K} = \frac{dK}{dt}, \dot{L} = \frac{dL}{dt}, \dot{M} = \frac{dM}{dt}$$

Từ phương trình (5) và định nghĩa về độ co giãn của sản lượng theo nhân tố, chúng ta có:

$$\frac{\partial f(.)}{\partial K} \frac{K}{f(.)} \text{ là độ co giãn của sản lượng theo vốn, ký}$$

hiệu là (β_K) .

$$\frac{\partial f(.)}{\partial L} \frac{L}{f(.)} \text{ là độ co giãn của sản lượng theo lao}$$

động, ký hiệu là (β_L) .

$$\frac{\partial f(.)}{\partial M} \frac{M}{f(.)} \text{ là độ co giãn của sản lượng theo đầu vào}$$

trung gian, ký hiệu là (β_M) .

Sử dụng các công thức này, phương trình (5) có thể được viết lại như sau:

$$\frac{\dot{Y}}{Y} = \beta_K \frac{\dot{K}}{K} + \beta_L \frac{\dot{L}}{L} + \beta_M \frac{\dot{M}}{M} + \frac{\dot{f}(\cdot)}{f(\cdot)} \quad (6)$$

Phương trình (6) cho biết phần trăm thay đổi của sản lượng $\left(\frac{\dot{Y}}{Y}\right)$ có thể phân rã thành hai bộ phận chính

là tổng phần trăm thay đổi của đầu vào, được gán trọng số theo độ co giãn tương ứng $\left(\beta_K \frac{\dot{K}}{K} + \beta_L \frac{\dot{L}}{L} + \beta_M \frac{\dot{M}}{M}\right)$

và sự thay đổi của hàm sản xuất theo thời gian $\frac{\dot{f}(\cdot)}{f(\cdot)}$.

Số hạng cuối cùng của (6) có thể được viết lại là sự thay đổi giữa mức tăng trưởng sản lượng và mức đóng góp của các nhân tố như ở phương trình (7) dưới đây.

$$\frac{\dot{f}(\cdot)}{f(\cdot)} = \frac{\dot{y}}{y} - \beta_K \frac{\dot{K}}{K} - \beta_L \frac{\dot{L}}{L} - \beta_M \frac{\dot{M}}{M} \quad (7)$$

Phương trình (7) biểu thị phần tăng lên của đầu ra không phải do tăng lên của đầu vào, được gọi là “phần dư” hoặc năng suất yếu tố tổng hợp (TFP). Nó cũng có thể được giải thích là “sự tiến bộ trong tri thức” hay “thay đổi kỹ thuật” hay “tiến bộ công nghệ”.

Mô hình hóa ước lượng TFP

Trong thực nghiệm, chúng ta ước lượng hàm sản xuất dạng Cobb-Douglas có dạng sau:

$$y = (Ae^{mt}) K^{\alpha} L^{\beta} M^{\gamma} \quad (8)$$

Lấy logarit hai vế của phương trình trên ta được:

$$\ln y = a_0 + \alpha \ln K + \beta \ln L + \gamma \ln M + mt; \text{ trong đó } a_0 = \ln A \quad (9)$$

Giả sử đã ước lượng phương trình (9), (tfp) $\hat{m}$ có thể thu được từ phương trình sau:

$$\hat{m} = \frac{1}{Y} \frac{dY}{dt} - \alpha \left(\frac{1}{K} \frac{dK}{dt} \right) - \beta \left(\frac{1}{L} \frac{dL}{dt} \right) - \gamma \left(\frac{1}{M} \frac{dM}{dt} \right) \quad (10)$$

Trong đó $\hat{\alpha}, \hat{\beta}, \hat{\gamma}$ là các tham số ước lượng được của phương trình (9) dựa trên số liệu mẫu.

Tiến bộ công nghệ là phần trăm thay đổi của đầu ra trừ đi phần trăm thay đổi của tất cả các đầu vào. Phần trăm thay đổi của mỗi đầu vào được lấy trọng số theo độ co giãn của đầu ra với từng đầu vào tương ứng.

Mô hình kinh tế lượng

Phương pháp bán tham số ước lượng TFP: chúng ta sử dụng thủ tục 2 bước. Bước thứ nhất là ước lượng hàm sản xuất chuẩn. Bước thứ hai là sử dụng hàm sản xuất chuẩn để dự báo TFP. Tuy nhiên, khi ước lượng hàm sản xuất thường gặp phải vấn đề về tính nội sinh của các yếu tố đầu vào. Đặc biệt, đối với số liệu doanh nghiệp thì vấn đề gặp phải là các doanh nghiệp phản ứng với các cú sốc năng suất riêng biệt mà không được các nhà kinh tế lượng quan sát. Các ước lượng bình phương bé nhất của các hàm sản xuất đó mang lại các ước lượng chệch.

Olley và Pakes [11] đã giải quyết vấn đề ước lượng chệch do sự tương quan này sinh trong ước lượng hàm sản xuất. Phương pháp này được minh họa bằng việc xem xét hàm sản xuất Cobb-Douglas ở mức logarit như mô tả ở dưới (tại thời điểm t đối với nhà máy i (không biểu diễn chỉ số i)):

$$y_t = \beta_0 + \beta_1 l_t + \beta_k k_t + \omega_t + \eta_t \quad (11)$$

Ở đây y_t là log của đầu ra (giá trị gia tăng) của nhà máy i tại thời điểm t , l_t là log của đầu vào lao động, k_t là log của đầu vào vốn, ω_t là năng suất và η_t là sai số hoặc các cú sốc năng suất không dự đoán được. Cả ω và η không quan sát được. Sự khác nhau là ω là biến trạng thái tác động tới quyết định thêm hoặc giảm bớt đầu vào của nhà máy, còn η thì không. Nếu sử dụng phương pháp ước lượng bình phương bé nhất (OLS) thì nảy sinh vấn đề biến nội sinh vì sự tương quan của các yếu tố đầu vào cả trong bản thân nhà máy và tác động của bên ngoài. Vấn đề nội sinh xuất phát từ sự lựa chọn tăng giảm đầu vào một phần được quyết định bởi ω_t .

Để giải quyết vấn đề tự tương quan, Olley và Pakes [11] sử dụng đầu tư làm hàm số của hai biến trong mô hình: k_t và ω_t như sau:

$$i_t = i_t(\omega_t, k_t)$$

Đối với các giá trị dương của đầu tư, $i_t(\omega_t, k_t)$ được đảo ngược để mang lại ω_t như một hàm của đầu tư và vốn $\omega_t = (\omega_t, k_t)$. Thế biểu thức này vào phương trình (11) mang lại đầu ra theo các biến quan sát:

$$y_t = \beta_1 l_t + \varphi_t(i_t, k_t) + \eta_t \quad (12)$$

Trong đó, $\varphi_t(i_t, k_t) = \beta_0 + \beta_k k_t + \omega_t(i_t, k_t)$. Hồi quy tuyến tính của l_t và phi tham số của φ_t được sử dụng để ước lượng β_1 . Tuy nhiên, đầu tư được sử dụng làm biến điều khiển làm nảy sinh vấn đề trong ước lượng, vì nếu doanh nghiệp trong thời gian đó không đầu tư thì không đảm bảo điều kiện vững cho các quan sát.

Để giải quyết vấn đề trên, Levinshon-Petrin [12] đã thêm một biến tự do ι là đầu vào trung gian (nguyên vật liệu hoặc năng lượng). Mô hình được thể hiện như sau:

$$y_t = \beta_0 + \beta_1 l_t + \beta_k k_t + \beta_\iota \iota_t + \omega_t + \eta_t$$

Hàm số về cầu đầu vào trung gian như sau:

$$\iota_t = \iota_t(\omega_t, k_t)$$

Với $\varphi_t(\cdot)$ là hàm đầu vào trung gian và vốn: $\varphi_t(\iota_t, k_t) = \beta_0 + \beta_k k_t + \beta_\iota \iota_t + \omega_t(\iota_t, k_t)$.

Giả thiết ω_t xử lý theo quá trình Markove thứ nhất, vốn không lập tức thay đổi tương ứng với ξ_t , sự đổi mới về năng suất qua giai đoạn như sau: $\xi_t = \omega_t - E[\omega_t | \omega_{t-1}]$.

Dưới các giả thiết này, các ước lượng vững của β_k thu được từ ước lượng phương trình sau đây:

$$y_t^* = y_t - l_t \beta_1 - \beta_\iota \iota_t = \beta_0 + \beta_k k_t + E[\omega_t | \omega_{t-1}] + \eta_t^* \quad (13)$$

Trong đó y_t^* là đầu ra trừ đi đóng góp của lao động và $\eta_t^* = \xi_t + \eta_t$. Vì một sản phẩm đi kèm của giai đoạn thứ nhất là một ước lượng của ω_t , có thể thu được một ước lượng vững của $E[\omega_t | \omega_{t-1}]$. Ta thu được một độ đo TFP của doanh nghiệp i năm t là tfp_{it} như là chênh lệch giữa giá trị gia tăng và các đầu vào vốn và lao động, nhân với các hệ số ước lượng được.

$$\forall j: tfp_{it} = y_{it} - \hat{\beta}_1 l_{it} - \hat{\beta}_k k_{it} \quad (14)$$

Số liệu và kết quả ước lượng

Số liệu

Bộ số liệu được dùng ở đây là bộ số liệu điều tra doanh nghiệp của Viện Năng suất Việt Nam. Bộ số liệu này điều tra khoảng 2.000 doanh nghiệp của 7 ngành với các câu hỏi về doanh nghiệp và liên quan đến năng suất lao động. Nhiều chỉ tiêu quan trọng có được từ năm 2010 đến 2014. 7 ngành được điều tra gồm: i) Sản xuất và chế biến thực phẩm; ii) Dệt; iii) Sản xuất trang phục; iv) Sản xuất da và các sản phẩm liên quan; v) Sản xuất cao su và plastic; vi) Sản xuất các sản phẩm từ hóa chất và vii) Sản xuất thiết bị điện.

Các chỉ tiêu cơ bản được cấu trúc cho ước lượng mô hình gồm: i) Giá trị gia tăng (VA) gồm chi phí lao động, khấu hao, thuế, lợi nhuận và lãi vay; ii) Lao động (L) gồm toàn bộ lao động làm việc trong doanh nghiệp, cả lao động thường xuyên và lao động thời vụ, trong đó lao động thời vụ được quy đổi thành lao động làm việc toàn thời gian; iii) Vốn (K) được tính bằng cách lấy tổng tài sản trừ khấu hao; iv) Đầu vào trung gian (M) được lấy bằng chi phí bằng tiền mua đầu vào; v) Điện (E) được lấy bằng chi phí về điện mà doanh nghiệp chi trả và biên đầu tư (Dt)... Các biến VA, K, M, E, Dt được tính theo năm và giảm phát bằng chỉ số giảm phát công nghiệp hàng năm. Các biến này được sử dụng trong mô hình bán tham số để ước lượng hàm sản xuất chuẩn và sau đó dự báo TFP.

Kết quả ước lượng

Ước lượng hàm sản xuất và dự báo TFP bằng phương pháp bán tham số:

Trong mục này, nhóm nghiên cứu sử dụng kỹ thuật bán tham số để ước lượng hàm sản xuất (11) và dự báo TFP bằng mô hình dạng (14). Kết quả cho ở bảng 1.

Bảng 1: kết quả ước lượng hàm sản xuất và dự báo TFP bằng phương pháp bán tham số

Ngành được ước lượng	Hệ số ước lượng được của lao động (LnL)	Hệ số ước lượng được của vốn (LnK)	Số quan sát được sử dụng trong ước lượng hàm sản xuất từ 2010 đến 2014 (Obs)	Biến điều khiển được sử dụng để ước lượng	Dự báo TFP
Toàn mẫu	0,5970*** (0,0161)	0,2072*** (0,0422)	6765	M	Tfpm
	0,5269*** (0,0164)	0,2523*** (0,0400)		E	Tfpe
	0,5757*** (0,0141)	0,2522*** (0,0304)		Dt	Tfpdt
Chế biến thực phẩm	0,6563*** (0,0315)	0,1006*** (0,0783)	1425	M	Tfpm
	0,5777*** (0,0345)	0,1221*** (0,0944)		E	Tfpe
	0,6187*** (0,0367)	0,1667*** (0,0583)		Dt	Tfpdt
Dệt	0,6286*** (0,0399)	0,2537*** (0,0608)	1165	M	Tfpm
	0,5987*** (0,0281)	0,3304*** (0,0857)		E	Tfpe
	0,6235*** (0,0262)	0,2643*** (0,1009)		Dt	Tfpdt

Sản xuất trang phục	0,5905*** (0,0352)	0,1807*** (0,0475)	1755	M	Tfpm
	0,5211*** (0,0307)	0,2263*** (0,0636)		E	Tfpe
	0,5720*** (0,0393)	0,2312*** (0,0458)		Dt	Tfpdt
Sản xuất da và các sản phẩm liên quan	0,5358*** (0,0556)	0,2030 (0,1351)	710	M	Tfpm
	0,4812*** (0,0617)	0,3795*** (0,1221)		E	Tfpe
	0,5516*** (0,0659)	0,3664*** (0,1097)		Dt	Tfpdt
Hóa chất và các sản phẩm từ hóa chất	0,5184*** (0,0607)	0,3014*** (0,0954)	1035	M	Tfpm
	0,4350*** (0,0582)	0,3123*** (0,1669)		E	Tfpe
	0,5143*** (0,0676)	0,2956*** (0,0753)		Dt	Tfpdt
Sản xuất sản phẩm từ cao su, plastic	0,5487*** (0,0634)	0,2071*** (0,1341)	673	M	Tfpm
	0,4484*** (0,0599)	0,3280*** (0,1442)		E	Tfpe
	0,5457*** (0,0656)	0,4338*** (0,1254)		Dt	Tfpdt

Nguồn: tác giả ước lượng từ số liệu điều tra của Viện Năng suất Việt Nam
Số trong ngoặc là sai số tiêu chuẩn

*/**/** chỉ mức ý nghĩa 10%, 5% và 1% tương ứng

Ghi chú: ký hiệu M, E và Dt là ký hiệu các biến điều khiển khi sử dụng để ước lượng các hàm sản xuất chuẩn bằng kỹ thuật bán tham số

Mặc dù có 7 nhóm ngành được xem xét, nhưng chúng tôi ước lượng cho 6 nhóm ngành (trừ ngành sản xuất thiết bị điện nhưng bù lại chúng tôi ước lượng cho toàn bộ của 7 ngành gộp lại). Kết quả ước lượng cho thấy, số liệu của toàn mẫu, các hệ số ước lượng được đều có ý nghĩa thống kê cao. Độ co giãn của đầu ra theo lao động là 0,67; 0,52; 0,58 tương ứng với các hàm sản xuất ước lượng được khi sử dụng các biến điều khiển là đầu vào trung gian (M), điện (E) và đầu tư (Dt). Độ co giãn của đầu ra theo vốn là 0,2; 0,25 và 0,25 tương ứng với các hàm sản xuất ước lượng được khi sử dụng các biến điều khiển là M, E và Dt. Nghĩa là 1% tăng lên của lao động sẽ tạo ra gần 0,6% tăng lên của đầu ra, trong khi 1% tăng lên của vốn chỉ tạo ra khoảng 0,25% tăng lên của đầu ra. Như vậy, nhìn chung các ngành này vẫn là các ngành mà đóng góp của lao động vào tăng trưởng cao hơn vốn.

Kết quả ước lượng đối với ngành chế biến thực phẩm cho ta nhận xét thú vị. Trong cả 3 phương trình ước lượng được cho thấy, hệ số ước lượng được của lao động dao động từ 0,58 đến 0,66, và hệ số ước lượng được của vốn dao động từ 0,10 đến 0,17. Đây là ngành rất thâm dụng lao động.

Ước lượng đóng góp của TFP vào tăng trưởng đầu ra của các ngành:

Ước lượng hàm sản xuất ở bảng 1 là bước đầu tiên để dự báo TFP. Trong phần này chúng tôi ước lượng

mô hình (9) và dự báo đóng góp TFP vào tăng trưởng mô hình (10) bằng kỹ thuật bán tham số. Kết quả như sau:

Bảng 2: kết quả ước lượng đóng góp của TFP vào tăng trưởng đầu ra của các ngành

Ngành	Hệ số ước lượng của lao động (LnL)	Hệ số ước lượng của vốn (LnK)	TFP ước lượng theo phương trình (10)	Quan sát	Biến điều khiển
Toàn mẫu	0,596*** (0,0155)	0,2059*** (0,0401)	0,0182*** (0,0053)	6765	M
Chế biến thực phẩm	0,5774*** (0,0315)	0,1195*** (0,0122)	0,0134*** (0,0012)	1425	E
Dệt	0,6277*** (0,0319)	0,2516*** (0,0683)	0,0174*** (0,0127)	1165	M
Sản xuất trang phục	0,5886*** (0,0337)	0,1812*** (0,0526)	0,0213*** (0,0100)	1755	M
Sản xuất da và các sản phẩm liên quan	0,5348*** (0,0649)	0,2025*** (0,1437)	0,029*** (0,0151)	710	M
Hóa chất và các sản phẩm từ hóa chất	0,5131*** (0,0511)	0,2947*** (0,0531)	0,02358*** (0,0111)	1035	Dt
Sản xuất sản phẩm từ cao su, plastic	0,5481*** (0,0513)	0,2073*** (0,1313)	0,0098 (0,0158)	675	M

Nguồn: tác giả ước lượng từ số liệu điều tra của Viện Năng suất Việt Nam
Số trong ngoặc là sai số tiêu chuẩn
*/**/***/*** chỉ mức ý nghĩa 10%, 5% và 1% tương ứng

Kết quả ước lượng cho thấy: i) Các hệ số ước lượng được của vốn và lao động đều dương và có ý nghĩa thống kê cao; ii) Hệ số ước lượng được của các biến điều chỉnh và có ý nghĩa thống kê cao ở tất cả các ngành, trừ ngành sản xuất sản phẩm từ cao su và plastic. Giá trị ước lượng được của hệ số biến t có thể giải thích là đóng góp của TFP vào tăng trưởng đầu ra. Như vậy, đóng góp của TFP vào tăng trưởng đầu ra của các ngành sản xuất chế biến thực phẩm, ngành dệt, ngành sản xuất trang phục, ngành sản xuất da và sản phẩm liên quan, ngành sản xuất hóa chất và ngành sản xuất sản phẩm từ cao su, plastic tương ứng là 1,82%, 1,34%, 1,74%, 2,13%, 2,9%, 2,35% và 0,98%. Dựa vào số liệu điều tra doanh nghiệp, tốc độ tăng giá trị gia tăng bình quân của các ngành tương ứng là: chung của 7 ngành nghiên cứu: 7,2%; ngành sản xuất chế biến thực phẩm: 6,7%; ngành dệt: 7,2%; ngành may: 7,6%; ngành sản xuất da và sản phẩm liên quan: 10,2%; ngành hóa chất: 7,6% và ngành nhựa - plastic: 6,9%. Với số liệu ước lượng được về đóng góp của TFP vào tăng trưởng đầu ra nêu trên, có thể ước được tỷ lệ phần trăm đóng góp của TFP vào tăng trưởng của các ngành như sau: chung của 7 ngành: 25%, ngành chế biến thực phẩm 20%, ngành dệt 24%, ngành may 28%, ngành sản xuất da và sản phẩm liên quan 28%, ngành hóa chất 31% và ngành cao su - plastic 14%.

Kết quả ước lượng đóng góp của TFP của cả 7 ngành cho Việt Nam thời kỳ 2010-2014 giống như kết

quả Aukrust đã ước lượng đóng góp của TFP vào tăng trưởng của Na Uy giai đoạn 1900-1955. Kết quả này thấp hơn so với kết quả 1,92% của Nguyễn Khắc Minh và cộng sự ước lượng cho nền kinh tế Việt Nam trong thời kỳ 1985-2006. Phân tích một cách chi tiết thì ta có thể thấy đóng góp của TFP vào mỗi ngành có khác nhau có thể do là do sự khác nhau về tiến bộ công nghệ và thay đổi trong hiệu quả của từng ngành. Tuy nhiên nghiên cứu này không phát triển theo hướng đó mà tập trung vào xem TFP đóng góp như thế nào đến tăng trưởng.

Kết luận

Để thực hiện mục tiêu nghiên cứu, chúng tôi đã xây dựng mô hình hàm sản xuất dạng tân cổ điển để rút ra TFP và đã mô hình hóa cho phép tính được TFP. Kết quả ước lượng cho thấy, đóng góp của TFP vào tăng trưởng đầu ra là dương cho toàn mẫu và tất cả các ngành. Kết luận này có ý nghĩa quan trọng trong khuyến nghị chính sách vì cho thấy vai trò quan trọng trong tăng trưởng đầu ra của tiến bộ công nghệ thông qua TFP.

Tài liệu tham khảo

- [1] R.M. Solow (1957), "Technical change and the aggregate production function", *Review of Economics and Statistics*, **39**, pp.312-320.
- [2] R.M. Solow (1960), "Investment and technical progress" In K.J. Arow, Skarlin, and Suppes, F. Eds, *Mathematical Methods in the Social Science*, 1959. Stanford, Calif: Stanford University Press.
- [3] O. Aukrust (1959), "Investment and economic growth", *Production Measurement Review*, **16**, pp.35-53.
- [4] M.D. Intriligator, R.G. Bodkin and C. Hsiao, *Econometric Models, techniques and applications*, Prentice- Hall International, Inc.
- [5] Brown, Murray (1966), *On the Theory and Measurement of Technological Change*, London, Cambridge University Press.
- [6] M. Boskin and L.J. Lau (1991), "Capital and Productivity: A New View", *Paper presented at the IUI semina "Capital: Its value. Its rate of return, and its productivity"*, Stockholm, March.
- [7] Tăng Văn Khiên (2005), *Tốc độ tăng Năng suất các nhân tố tổng hợp - phương pháp tính và ứng dụng*, Nhà xuất bản Thống kê.
- [8] T.D. Tran, Q.T. Nguyen and Q.K. Chu (2005), *Sources of Vietnam's Economic Growth 1986-2004*, Hanoi, National Economics University.
- [9] K.M. Nguyen and T.L. Giang (2007), *Technical efficiency and productivity growth in Vietnam: Parametric and Nonparametric Approaches*, Hanoi, Publishing House of Social Labor.
- [10] K.M. Nguyen and T.L. Giang (2008), "Factor productivity and efficiency of the Vietnamese economy in transition", *Asian-Pacific Development Journal*, **15** (1).
- [11] S. Olley and A. Pakes (1996), "The dynamics of productivity in the telecommunications equipment industry", *Econometrica*, **64**(6), pp.1263-1297.
- [12] J. Levinshon and A. Petrin (2003), "Estimating production function using inputs to controls for unobservable", *Review of Economic Studies*, **70**(2), pp.317-341.

Sử dụng mô hình thẻ điểm cân bằng (BSC) trong đánh giá hiệu quả kinh doanh của các doanh nghiệp khai thác than

Nguyễn Thị Hồng Loan*

Trường Đại học Mở - Địa chất

Ngày nhận bài 21/12/2016, ngày chuyển phản biện 23/12/2016, ngày nhận phản biện 10/1/2017, ngày chấp nhận đăng 13/1/2017

Phân tích hiệu quả kinh doanh là một trong những hoạt động tất yếu và thường xuyên của doanh nghiệp nhằm cung cấp thông tin về hiệu quả sử dụng và các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả sử dụng các nguồn lực của doanh nghiệp để có các giải pháp nâng cao hiệu quả sử dụng nguồn lực đó. Mô hình thẻ điểm cân bằng là một công cụ được sử dụng trong đánh giá hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp từ các khía cạnh cơ bản của hoạt động kinh doanh của doanh nghiệp, có thể cung cấp những thông tin mang tính hệ thống làm cơ sở cho các giải pháp toàn diện nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng nguồn lực của doanh nghiệp nói chung và doanh nghiệp khai thác than nói riêng.

Từ khóa: doanh nghiệp khai thác than, đánh giá hiệu quả kinh doanh, thẻ điểm cân bằng.

Chỉ số phân loại 5.2

Using the balanced scorecard (BSC) for assessing business performance in coal mining enterprises

Summary

Traditional business performance assessments based on profit, return on assets (ROA), return on equity (ROE)... used in coal mining enterprises do not ensure the overall assessment in relation with the effective operation of the processes in production and business, the link between performance objectives and resources. This article presents a tool for assessing business performance using the BSC which is expected to help the coal mining enterprises have an overall view on their performance in relation with causes and effects so that they can build long-term goals and take advantages of the market to achieve their goals.

Keywords: balanced scorecard, business performance assessments, coal mining enterprises.

Classification number 5.2

Đặt vấn đề

Phương pháp phân tích hiệu quả kinh doanh truyền thống thông qua các chỉ tiêu tài chính như lợi nhuận, tỷ suất lợi nhuận trên vốn kinh doanh (ROA), tỷ suất lợi nhuận trên vốn chủ sở hữu (ROE)... đang được các doanh nghiệp khai thác than áp dụng chưa cho phép doanh nghiệp đánh giá một cách tổng quát về hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp trong mối liên hệ với hiệu quả hoạt động của các công đoạn trong quá trình sản xuất kinh doanh, hiệu quả hoạt động của các bộ phận trong doanh nghiệp và với chiến lược kinh doanh của doanh nghiệp, chưa liên kết được mục tiêu hiệu quả kinh doanh với các nguồn lực cần có để đạt được mục tiêu hiệu quả kinh doanh đó. Bài báo giới thiệu phương pháp phân tích hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp khai thác than trên cơ sở công cụ thẻ điểm cân bằng, giúp các doanh nghiệp khai thác than đánh giá tổng hợp hiệu quả kinh doanh từ các khía cạnh của hoạt động kinh doanh và trong mối liên hệ nhân quả giữa các chỉ tiêu hiệu quả biểu thị nguyên nhân và kết quả, làm cơ sở đưa ra các giải pháp đảm bảo thực hiện mục tiêu hiệu quả kinh doanh dài hạn, gắn với mục tiêu chiến lược và tận dụng được những cơ hội từ thị trường, phát huy được những điểm mạnh, khắc phục được những

*Email: loanhumg@gmail.com

điểm yếu để đạt hiệu quả kinh doanh bền vững.

Phương pháp đánh giá hiệu quả kinh doanh được các doanh nghiệp khai thác than áp dụng trong giai đoạn vừa qua

Hoạt động kinh doanh trong điều kiện các yếu tố đầu vào bị giới hạn, đặc biệt là nguồn tài nguyên ngày càng cạn kiệt và không có khả năng tái tạo, với cơ chế tiêu thụ đặc thù của ngành khai thác than là giá bán được ấn định theo điều kiện địa chất và một số tiêu chí khác, mục tiêu của các doanh nghiệp khai thác than luôn được xác định là tạo ra được tối đa mức kết quả đầu ra và mức chi phí là thấp nhất có thể, hay nói cách khác, doanh nghiệp đạt hiệu quả kinh doanh.

Hiện nay, việc đánh giá hiệu quả kinh doanh của các doanh nghiệp khai thác than chủ yếu được thực hiện thông qua hệ thống số liệu quá khứ trên cơ sở so sánh giữa kết quả đầu ra theo hiện vật (sản lượng) và giá trị (doanh thu) của quá trình kinh doanh trong một khoảng thời gian với các chi phí về hiện vật (số lượng lao động bình quân, giá trị tài sản ngắn hạn bình quân, giá trị tài sản dài hạn bình quân) và chi phí cho việc sử dụng các yếu tố đầu vào để tạo ra số lượng đầu ra đó [1, 2]. Tùy theo mối quan hệ so sánh mà các chỉ tiêu biểu thị hiệu quả kinh doanh của các doanh nghiệp sẽ được xác định tương ứng, bao gồm:

- Nhóm chỉ tiêu phản ánh khả năng sinh lợi: lợi nhuận, sức sinh lời của vốn kinh doanh (ROI), sức sinh lời của vốn chủ sở hữu (ROE), sức sinh lời của vốn kinh doanh (ROA), lãi cơ bản trên cổ phiếu (EPS)...

- Nhóm chỉ tiêu biểu thị hiệu suất: hiệu suất sử dụng vốn ngắn hạn, hiệu suất sử dụng vốn dài hạn, hiệu suất sử dụng vốn kinh doanh, số vòng quay của vốn ngắn hạn, thời gian một vòng quay vốn ngắn hạn...

- Nhóm chỉ tiêu về suất hao phí: suất hao phí của vốn ngắn hạn, suất hao phí của vốn dài hạn, suất hao phí của vốn kinh doanh...

Tuy nhiên, việc sử dụng hệ thống chỉ tiêu trên khi đánh giá hiệu quả kinh doanh của các doanh nghiệp khai thác than sẽ có một số hạn chế sau:

- Hệ thống chỉ tiêu đánh giá hiệu quả kinh doanh chỉ phản ánh kết quả cuối cùng của hoạt động kinh doanh của doanh nghiệp mà chưa đánh giá hiệu quả

kinh doanh của các công đoạn, bộ phận của doanh nghiệp, điều này dẫn tới khó phát hiện được khâu yếu trong quá trình kinh doanh, làm căn cứ đề xuất các giải pháp nâng cao hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp, khó xây dựng được các chỉ tiêu nhiệm vụ cho các bộ phận để thực hiện nâng cao hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp.

- Hệ thống chỉ tiêu đánh giá hiệu quả kinh doanh chưa phản ánh được mục tiêu phát triển của doanh nghiệp, đặc biệt là các mục tiêu chiến lược.

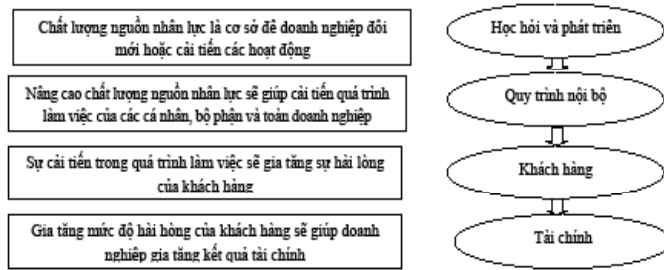
- Hệ thống chỉ tiêu đánh giá hiệu quả kinh doanh chưa gắn kết được hiệu quả hoạt động của các bộ phận trong doanh nghiệp với hiệu quả hoạt động của doanh nghiệp, do đó khó đề xuất được hệ thống giải pháp phát huy sức mạnh tổng hợp của các bộ phận trong doanh nghiệp để nâng cao hiệu quả kinh doanh.

- Hệ thống chỉ tiêu chỉ gồm những chỉ tiêu tài chính là chưa thực sự đầy đủ. Với các doanh nghiệp khai thác than, các chỉ tiêu phản ánh hiệu quả của quá trình vận hành hoạt động sản xuất, hoạt động quản lý và tổ chức sản xuất cần được xác định và đánh giá bởi vì đây là hai hoạt động cơ bản góp phần nâng cao hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp. Vì vậy cần bổ sung các chỉ tiêu phi tài chính để đánh giá hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp khai thác than.

Hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp khai thác than với công cụ thể điểm cân bằng

Mô hình thể điểm cân bằng

Với quan điểm hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp không chỉ được đánh giá đơn thuần từ khía cạnh tài chính mà cần được đánh giá một cách toàn diện trên cơ sở kết hợp các chỉ tiêu tài chính và các chỉ tiêu phi tài chính như những giá trị mà doanh nghiệp mang lại cho khách hàng, cho xã hội, những kết quả tốt mà doanh nghiệp đạt được khi hoàn thiện quy trình kinh doanh nội bộ và những cải thiện về chất lượng lao động và sự gia tăng hiệu quả quản lý của tổ chức. Năm 1992 hai giáo sư của Đại học Havard là Robert S. Kaplan và David P. Norton đã đưa ra mô hình thể điểm cân bằng với 4 khía cạnh: tài chính; khách hàng; quy trình nội bộ và học hỏi, phát triển [3]. Mô hình thể điểm cân bằng được mô tả như trong hình 1.



Hình 1: mối quan hệ giữa các khía cạnh trong mô hình thể điểm cân bằng

- Khía cạnh tài chính: mục tiêu của khía cạnh tài chính là nâng cao giá trị của doanh nghiệp trên cơ sở tăng lợi nhuận, tỷ suất lợi nhuận...

- Khía cạnh khách hàng: mục tiêu của khía cạnh khách hàng là những giá trị mà doanh nghiệp có thể đem đến cho khách hàng để đạt được các mục tiêu tài chính đã được xác định. Như vậy, mục tiêu tài chính đã xác định sẽ được đảm bảo thực hiện nếu doanh nghiệp đem đến những giá trị cho khách hàng.

- Khía cạnh quy trình nội bộ: mục tiêu của khía cạnh quy trình nội bộ là sự thay đổi, đổi mới quá trình cung ứng đầu vào, quá trình sản xuất sản phẩm, quá trình tiêu thụ sản phẩm... nhằm đem đến cho khách hàng những giá trị cao nhất. Sự đổi mới các quy trình nội bộ sẽ đảm bảo doanh nghiệp có thể giảm chi phí sản xuất, tối ưu hóa cơ cấu vốn kinh doanh, thay đổi kết cấu sản phẩm theo hướng hợp lý nhất nhằm gia tăng các giá trị có thể cung cấp cho khách hàng để đạt mục tiêu tài chính.

- Khía cạnh học hỏi và phát triển: nguồn nhân lực, nguồn lực thông tin là những nguồn lực quan trọng giúp doanh nghiệp khai thác than thực hiện đổi mới, cải tiến quy trình nội bộ của mình. Chất lượng nguồn nhân lực sẽ là yếu tố then chốt quyết định sự thành công của các hoạt động đổi mới, cải tiến trong quy trình nội bộ.

Trong mô hình thể điểm cân bằng, các chỉ tiêu tài chính và phi tài chính có mối quan hệ chặt chẽ, hỗ trợ cho nhau, tác động qua lại với nhau. Để đạt được hiệu quả tài chính tốt, các chỉ tiêu đánh giá khía cạnh khách hàng, quy trình nội bộ, học hỏi và phát triển cũng phải được đánh giá tốt. Hay nói cách khác, các chỉ tiêu tài chính là kết quả và các chỉ tiêu phi tài chính là nguyên

nhân. Mối quan hệ giữa các khía cạnh trong mô hình thể điểm cân bằng đã được thể hiện trong hình 1.

Chỉ tiêu đánh giá hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp khai thác than

Đặc điểm về hoạt động kinh doanh của các doanh nghiệp khai thác than:

Chỉ tiêu đánh giá hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp khai thác than được xác định trong mối liên hệ với những đặc trưng trong hoạt động kinh doanh của doanh nghiệp này, bởi vì mỗi ngành, lĩnh vực kinh doanh sẽ có những đặc trưng riêng cần phải đánh giá hiệu quả, vì vậy, hệ thống chỉ tiêu cũng được xác định tương ứng. Đặc điểm hoạt động kinh doanh của doanh nghiệp khai thác than ảnh hưởng đến hệ thống chỉ tiêu đánh giá bao gồm:

- Kết quả sản xuất và các chi phí của doanh nghiệp khai thác than phụ thuộc vào điều kiện địa chất khu vực khai thác với các điều kiện đất đá, điều kiện vỉa than và độ sâu khai thác. Chính vì vậy, việc thay đổi kết cấu sản phẩm, chất lượng và sản lượng khai thác của các doanh nghiệp không hoàn toàn phụ thuộc vào ý muốn chủ quan của doanh nghiệp. Tuy nhiên, các doanh nghiệp khai thác than có thể thực hiện các biện pháp công nghệ để giảm tỷ lệ tổn thất than, nâng cao tương đối chất lượng của than nguyên khai và thay đổi kết cấu sản phẩm theo hướng có lợi nhất cho doanh nghiệp, phù hợp với nhu cầu thị trường thông qua các biện pháp mang tính kỹ thuật. Vì vậy các chỉ tiêu đánh giá hiệu quả hoạt động là tỷ lệ tăng về sản lượng tiêu thụ hoặc xu hướng và mức độ tăng giá bán sản phẩm bình quân, tỷ lệ tổn thất than...

- Hoạt động tiêu thụ sản phẩm của các doanh nghiệp khai thác than được điều tiết bởi cơ quan quản lý trực tiếp, giá bán và sản lượng tiêu thụ của doanh nghiệp được xác định trên cơ sở điều kiện địa chất và giá thành khai thác nhằm đảm bảo ổn định trong hoạt động kinh doanh của các doanh nghiệp khai thác than có điều kiện sản xuất không tương đồng với nhau [4]. Từ đặc trưng này cho thấy, hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp khai thác than tập trung ở khâu sản xuất với việc tổ chức sản xuất, tổ chức lao động khoa học và hiệu quả. Vì vậy, chỉ tiêu đánh giá hiệu quả kinh doanh

cần phải có những chỉ tiêu đánh giá tính sáng tạo trong tổ chức sản xuất và tổ chức lao động như các sáng kiến cải tiến hoạt động sản xuất của các khâu trong quá trình khai thác, từ thiết kế khai thác tới tổ chức chuẩn bị khai thác, thực hiện hoạt động khai thác và các chi phí tiết kiệm được.

- Khi phân tích giá thành sản phẩm của doanh nghiệp khai thác than, chi phí cho vật tư là chủ yếu, vì vậy hiệu quả của hệ thống cung ứng vật tư cũng cần được quan tâm đánh giá thông qua tỷ lệ vật tư dự trữ, khả năng cung ứng vật tư đúng về chất lượng và đủ về số lượng.

Nhóm chỉ tiêu đánh giá hiệu quả từ khía cạnh tài chính:

Khía cạnh tài chính phản ánh kết quả hoạt động cuối cùng của doanh nghiệp. Kết quả này thể hiện bằng các chỉ tiêu hiệu quả tài chính như: doanh thu, lợi nhuận trước thuế, hiệu quả sử dụng tài sản (ROA), hiệu quả sử dụng vốn chủ sở hữu (ROE). Các chỉ tiêu này được tính toán căn cứ vào các số liệu do hệ thống kế toán cung cấp trên các báo cáo tài chính của doanh nghiệp. Các chỉ tiêu hiệu quả tài chính được đề xuất trong bảng 1.

Nhóm chỉ tiêu đánh giá hiệu quả từ khía cạnh khách hàng:

Khách hàng chủ yếu của các doanh nghiệp khai thác than là các doanh nghiệp công nghiệp. Do đặc thù về cơ chế quản lý của Tập đoàn Công nghiệp than - khoáng sản Việt Nam [4] và Tổng công ty Đông Bắc [5], tham gia vào hoạt động tiêu thụ của doanh nghiệp khai thác than có các doanh nghiệp sàng tuyển và cảng, phù hợp với cơ chế tiêu thụ của Tập đoàn/Tổng công ty và Chính phủ. Với đặc thù như vậy, số lượng và cơ cấu chất lượng sản phẩm không hoàn toàn do các doanh nghiệp khai thác than quyết định mà bị chi phối bởi điều kiện địa chất vỉa, cơ chế tiêu thụ của Tập đoàn/Tổng công ty. Các chỉ tiêu đánh giá hiệu quả của khía cạnh khách hàng được đề xuất trong bảng 1.

Nhóm chỉ tiêu đánh giá hiệu quả từ khía cạnh quy trình nội bộ:

Quy trình nội bộ là khía cạnh quan trọng trong hoạt động của doanh nghiệp khai thác than và đảm bảo cho

doanh nghiệp phát triển bền vững. Thông qua hoạt động cải tiến và đổi mới các hoạt động của quy trình nội bộ, các doanh nghiệp khai thác than có thể giảm chi phí sản xuất, thay đổi kết cấu sản phẩm để tăng giá bán bình quân, giảm lượng vốn kinh doanh do tối ưu hóa quá trình cung ứng vật tư và bán hàng hóa, tăng hệ số thu hồi than và giảm tỷ lệ tổn thất khoáng sản... Các chỉ tiêu đánh giá quy trình nội bộ của doanh nghiệp khai thác than được đề xuất trong bảng 1.

Nhóm chỉ tiêu đánh giá hiệu quả từ khía cạnh học hỏi và phát triển:

Nguồn nhân lực là chủ thể của mọi hoạt động trong doanh nghiệp. Khi người lao động được trang bị đầy đủ và hợp lý các kiến thức, kỹ năng cần thiết, các nhận thức và tinh thần gắn bó, có trách nhiệm với doanh nghiệp thì hiệu quả kinh doanh của doanh nghiệp sẽ ngày càng được nâng cao. Dựa trên những kiến thức và kỹ năng mà đội ngũ nhân viên có được thông qua các chương trình đào tạo và huấn luyện, doanh nghiệp tăng chất lượng sản phẩm, tăng tỷ lệ thu hồi sản phẩm, tiết kiệm chi phí sản xuất. Nhờ được huấn luyện tốt, tinh thần và thái độ của nhân viên trong quá trình sản xuất, doanh nghiệp đảm bảo được an toàn lao động, nhân viên gắn bó với doanh nghiệp, nâng cao tinh thần bảo vệ môi trường, tăng cường sáng kiến trong quá trình làm việc... Để đạt được các kiến thức, kỹ năng và tay nghề cần thiết, người lao động cần được đào tạo, huấn luyện để trang bị, cập nhật các kiến thức, kỹ năng, phương pháp kỹ thuật mới. Các chỉ tiêu đánh giá hiệu quả của khía cạnh học hỏi và phát triển được đề xuất trong bảng 1.

Nhìn vào bảng 1 cho thấy, năm 2015 Công ty TNHH MTV than 86 có hiệu quả kinh doanh thấp hơn so với năm 2014. Các khía cạnh làm giảm hiệu quả kinh doanh là khía cạnh tài chính và quy trình nội bộ. Nguyên nhân cơ bản làm giảm lợi nhuận của Công ty là các khoản chi phí gián tiếp như chi phí hành chính. Trong năm 2015, tỷ lệ chi phí này tăng lên tương đối nhiều so với năm 2014. Công ty đã chú trọng đến chất lượng nguồn nhân lực nhưng năng suất lao động có xu hướng giảm. Như vậy, Công ty cần quan tâm đến hoạt động tổ chức lao động và đào tạo nâng cao chất lượng nghiệp vụ cho lao động, đặc biệt là lao động ở các bộ phận quan trọng như vật tư, tiêu thụ...

Bảng 1: chỉ tiêu đo lường hiệu quả kinh doanh được đề xuất đối với doanh nghiệp khai thác than (ví dụ với Công ty TNHH MTV than 86)

TT	Tên chỉ tiêu	Phương pháp xác định	Viễn cảnh thể điểm cân bằng	Năm 2014	Năm 2015
1	Lợi nhuận trước thuế, triệu đồng	Bảng cân đối kế toán	Tài chính	12.006,32	6.929,64
2	Tỷ suất lợi nhuận trên vốn, %	Lợi nhuận trước thuế/Vốn kinh doanh bình quân	Tài chính	1,23	0,71
3	Tỷ suất lợi nhuận trên doanh thu, %	Lợi nhuận trước thuế/doanh thu	Tài chính	1,71	0,93
4	Thu nhập bình quân, triệu đồng/người/tháng	Tổng quỹ lương/số lao động bình quân	Tài chính	10,03	9,84
5	Chi phí sản xuất, triệu đồng	Báo cáo chi phí theo công đoạn	Tài chính	727.871,48	690.895,49
6	Tỷ lệ chi phí hành chính/tổng chi phí, %	Tổng chi phí hành chính/tổng chi phí kinh doanh	Tài chính	3,70	5,71
7	Tỷ lệ nợ phải thu/tổng doanh thu, %	Mức nợ phải thu bình quân/doanh thu	Khách hàng	0,03	0,02
8	Tỷ lệ hàng tồn kho so với doanh thu	Giá trị hàng tồn kho bình quân/tổng doanh thu	Khách hàng	1,92	0,03
9	Giá bán bình quân, triệu đồng/tấn	Tổng doanh thu/tổng sản lượng tiêu thụ	Khách hàng	1,31	1,35
10	Sản lượng tiêu thụ, tấn	Báo cáo tiêu thụ sản phẩm	Khách hàng	530.034,07	573.827,96
11	Số vụ sự cố, vụ	Số lượng vụ sự cố đã xảy ra	Quy trình nội bộ	56	58
12	Tỷ lệ hoàn thành yêu cầu dịch vụ, %	Số ngày cung cấp dịch vụ thực tế/số ngày dự kiến	Quy trình nội bộ	88	85
13	Số lượng sáng kiến về kỹ thuật, tổ chức sản xuất, lao động, sáng kiến	Số lượng sáng kiến được hội đồng sáng kiến công nhận	Quy trình nội bộ	2	1
14	Tỷ lệ tăng năng suất lao động, %	Tổng sản lượng/số công nhân sản xuất trực tiếp	Quy trình nội bộ	-7,5	-13,6
15	Tỷ lệ thu hồi than, %	Báo cáo tỷ lệ tổn thất tài nguyên	Quy trình nội bộ	78	79
16	Tỷ lệ công nhân vi phạm quy định về an toàn, %	Số người vi phạm/số lao động bình quân	Đào tạo và phát triển	2,94	2,87
17	Tỷ lệ nhân viên được đào tạo về tổ chức cung ứng vật tư, %	Số người được đào tạo/số lao động bình quân	Đào tạo và phát triển	0	0
18	Tỷ lệ nhân viên được đào tạo chuyên môn, %	Số người được đào tạo/số lao động bình quân	Đào tạo và phát triển	2,82	6,27
19	Bậc thợ bình quân	Tổng số bậc thợ của toàn bộ công nhân/số công nhân	Đào tạo và phát triển	3,50	3,50
20	Tỷ lệ nhân viên quản lý thành thạo công nghệ thông tin	Số nhân viên quản lý thành thạo công nghệ thông tin/tổng nhân viên quản lý	Đào tạo và phát triển	0,50	0,52
21	Số ngày nghỉ không lý do của người lao động	Tổng số ngày công nghỉ không lý do	Đào tạo và phát triển	0,36	0,39

Ưu điểm của việc sử dụng thể điểm cân bằng

- Đạt mục tiêu hiệu quả kinh doanh trên cơ sở đạt mục tiêu chiến lược kinh doanh của doanh nghiệp. Bên cạnh đó, doanh nghiệp có thể đo lường và kiểm soát được khả năng thực hiện mục tiêu hiệu quả kinh doanh của các bộ phận và toàn doanh nghiệp.

- Kết nối được mục tiêu chiến lược và mục tiêu ngắn hạn với các giải pháp, kết nối được mục tiêu của doanh

nh nghiệp với mục tiêu của bộ phận và các cá nhân - giúp doanh nghiệp định lượng được các mục tiêu và có thể kiểm soát các mục tiêu hiệu quả của doanh nghiệp. Các mục tiêu đều được cụ thể hóa bằng các chỉ tiêu với các con số cụ thể.

Mặt khác, mục tiêu chung của toàn doanh nghiệp được phân bổ cho các công đoạn của quá trình kinh doanh, các bộ phận của doanh nghiệp sẽ dễ thực hiện hơn, thúc đẩy khả năng thực hiện mục tiêu chung của

doanh nghiệp.

- Giúp doanh nghiệp tận dụng được các điểm mạnh và các cơ hội từ thị trường để thực hiện các mục tiêu.

- Các giải pháp nâng cao hiệu quả kinh doanh sẽ được xây dựng trên cơ sở tiếp cận toàn diện các khía cạnh hoạt động của doanh nghiệp, từ tài chính tới khách hàng, quy trình nội bộ, học hỏi và phát triển, tạo ra thế cân bằng cho doanh nghiệp đạt sự phát triển toàn diện và bền vững.

Kết luận

Mô hình thẻ điểm cân bằng giúp cho các nhà quản lý có được bức tranh cân bằng về hiệu quả hoạt động hiện tại cũng như các nhân tố là động lực tăng trưởng cho tương lai. Từ “cân bằng” (balanced) trong BSC nghĩa là để phát triển bền vững, khi tìm kiếm các giải pháp nâng cao hiệu quả kinh doanh, doanh nghiệp không nên chỉ hướng tới các giải pháp tài chính, mà còn cần hướng tới các giải pháp phi tài chính khác như các giải pháp liên quan đến khách hàng, quy trình nội bộ, học hỏi và phát triển. Với mục tiêu đảm bảo cân bằng các nguồn lực, kết nối mục tiêu chiến lược với các giá trị cung cấp cho khách hàng và hiệu quả kinh doanh thì thẻ điểm cân bằng được coi là giải pháp hữu hiệu cho các doanh nghiệp khai thác than ở Việt Nam hiện nay. Tuy nhiên, để sử dụng công cụ thẻ điểm cân bằng trong đánh giá hiệu quả kinh doanh, đề xuất các biện pháp nâng cao hiệu quả kinh doanh, đặc biệt là

đưa ra các giải pháp quản trị doanh nghiệp, các doanh nghiệp khai thác than cần đảm bảo các điều kiện sau:

- Tăng cường hiểu biết và cam kết sử dụng công cụ thẻ điểm cân bằng và hệ thống chỉ tiêu biểu thị hiệu quả kinh doanh của lãnh đạo doanh nghiệp.

- Xây dựng chiến lược và bản đồ chiến lược cho doanh nghiệp trong từng thời kỳ.

- Hoàn thiện hệ thống chức danh công việc cho các cá nhân, bộ phận trong doanh nghiệp.

- Xây dựng được hệ thống chỉ tiêu đánh giá hiệu quả kinh doanh chung cho toàn doanh nghiệp và từng bộ phận trong doanh nghiệp (KPIs).

- Xây dựng hệ thống theo dõi kết quả thực hiện.

- Xây dựng hệ thống lương thưởng theo kết quả đạt được các chỉ tiêu đề ra.

Tài liệu tham khảo

[1] Lê Quang Bình, Phan Quang Niệm, Nguyễn Thị Lôi (2007), *Giáo trình phân tích hoạt động kinh doanh*, Nhà xuất bản Thống kê, Hà Nội.

[2] Nguyễn Tấn Bình (2011), *Phân tích hoạt động doanh nghiệp*, Nhà xuất bản Tổng hợp thành phố Hồ Chí Minh.

[3] Robert S. Kaplan, David P. Norton (2015), *Thẻ điểm cân bằng*, Nhà xuất bản Trẻ Hà Nội.

[4] <http://www.vinacomin.vn/>

[5] <http://www.tongcongydongbac.com.vn>

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 59 - Number 2 - February 2017

Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh trên cây cao su.

Trần Hồng Anh, Võ Đình Quang, Nguyễn Thị Liên, Lương Thị Thu Hằng

Nghiên cứu tác nhân gây bệnh thối quả chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) sau thu hoạch ở Đồng bằng sông Cửu Long.

Thạch Thị Ngọc Yến, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Văn Phong

Bước đầu đánh giá năng suất và giá trị dược liệu một số giống khổ qua rừng tại Bình Phước.

Phan Đăng Thái Phương, Trần Thị Đoàn Trang, Vũ Văn Ba

Đánh giá tính đa hình các kiểu gen cGH và cGHR trên giống gà Móng Tiên Phong.

Nguyễn Trọng Tuyền, Phùng Đức Tiến, Ngô Thị Kim Cúc, Lưu Quang Minh

Nghiên cứu ảnh hưởng của cách phối hợp bột lá keo giậu vào khẩu phần ăn đến năng suất và chất lượng trứng của gà đẻ bố mẹ giống Lương Phượng.

Từ Quang Hiền, Trần Thị Hoan, Từ Quang Trung

Nghiên cứu cải tiến quy trình thu nhận chitin từ phế liệu tôm bằng kết hợp xử lý nhiệt và tẩy màu.

Nguyễn Công Minh, Nguyễn Văn Hòa, Phạm Thị Đan Phượng, Trang Sĩ Trung

Chọn tạo giống lúa chống chịu nóng bằng phương pháp hồi giao cải tiến nhờ chỉ thị phân tử.

Nguyễn Thị Lang, Phạm Thị Thu Hà, Phạm Công Trứ, Cho Young Chan, Trần Bảo Toàn, Bùi Chí Bửu

Đánh giá đa dạng di truyền các loài quế Thanh Hóa bằng chỉ thị RAPD.

Khuất Hữu Trung, Kiều Thị Dung, Lưu Cảnh Trung, Nguyễn Huy Hoàng, Hồ Trung Lương

Nghiên cứu môi trường nuôi trồng tạo stroma *Nhộng trùng thảo* (*Cordyceps militaris*).

Nguyễn Thị Ngọc Suong, Trần Minh Mẫn, Nguyễn Đỗ Thanh Phương

Sử dụng chỉ thị mã vạch để phân loại ốc hương.

Thái Thanh Bình, Nguyễn Văn Hà, Lưu Văn Huyền

Đóng góp của tăng TFP vào tăng trưởng của một số ngành công nghiệp chế biến chế tạo: ước lượng từ số liệu điều tra doanh nghiệp.

Nguyễn Khắc Minh, Nguyễn Thị Lê Hoa

Sử dụng mô hình thẻ điểm cân bằng (BSC) trong đánh giá hiệu quả kinh doanh của các doanh nghiệp khai thác than.

Nguyễn Thị Hồng Loan

1 Isolation and selection of some fungi inhibiting *Corticium salmonicolor* which causes pink diseases on rubber trees.

Tran Hong Anh, Vo Dinh Quang, Nguyen Thi Lien, Luong Thi Thu Hang

8 Study on postharvest rot disease causing agents on rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) in the Mekong River Delta.

Thach Thi Ngoc Yen, Nguyen Van Thanh, Nguyen Van Phong

13 Initial evaluation on the productivity and medicinal values of some wild bitter gourd varieties in Binh Phuoc province.

Phan Dang Thai Phuong, Tran Thi Doan Trang, Vu Van Ba

18 The evaluation on the polymorphism of cGH and cGHR genes in the Mong Tien Phong chickens.

Nguyen Trong Tuyen, Phung Duc Tien, Ngo Thi Kim Cuc, Luu Quang Minh

23 A study on the effects of *L. leucocephala* leaf meal supplement ways into the diets of Luong Phuong parent chickens on their egg productivity and quality.

Tu Quang Hien, Tran Thi Hoan, Tu Quang Trung

27 Improvement of chitin quality from shrimp wastes by the combination of heat treatment and decolorization.

Nguyen Cong Minh, Nguyen Van Hoa, Pham Thi Dan Phuong, Trang Si Trung

34 Rice breeding for heat tolerance using marker-assisted backcrossing in Vietnam.

Nguyen Thi Lang, Pham Thi Thu Ha, Pham Cong Tru, Cho Young Chan, Tran Bao Toan, Bui Chi Bui

39 Genetic diversity of *Cinnamomum* samples in Thanh Hoa based on RAPD markers.

Khuat Huu Trung, Kieu Thi Dung, Luu Canh Trung, Nguyen Huy Hoang, Ho Trung Luong

45 A study into stroma cultivation medium of *Cordyceps militaris*.

Nguyen Thi Ngoc Suong, Tran Minh Man, Nguyen Do Thanh Phuong

49 Application of DNA barcoding markers to classify Spotted babylon.

Thai Thanh Binh, Nguyen Van Ha, Luu Van Huyen

53 The contribution of TFP growth to the growth of several processing and manufacturing sectors: the findings from an enterprise survey.

Nguyen Khac Minh, Nguyen Thi Le Hoa

59 Using the balanced scorecard (BSC) for assessing business performance in coal mining enterprises.

Nguyen Thi Hong Loan