



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 60 - Số 2 - Tháng 2 năm 2018

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

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

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

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

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Đinh Thị Luận

TÒA SOẠN

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

EDITORIAL OFFICE

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

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

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

PUBLICATION LICENCE

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

Đánh giá kết quả hóa xạ trị tiền phẫu trong ung thư trực tràng giai đoạn xâm lấn

Nguyễn Văn Hiếu^{1*}, Lê Văn Quảng¹, Bùi Công Toàn², Lê Quốc Tuấn³

¹Bộ môn Ung thư, Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Ung bướu Đà Nẵng

³Bệnh viện K

Ngày nhận bài 8/9/2017; ngày chuyển phản biện 14/9/2017; ngày nhận phản biện 18/10/2017; ngày chấp nhận đăng 2/11/2017

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá kết quả hóa xạ trị tiền phẫu trong điều trị (ĐT) ung thư trực tràng (UTTT) giai đoạn xâm lấn, đồng thời nhận xét một số tác dụng không mong muốn và độc tính của phương pháp ĐT này. Nghiên cứu được thực hiện trên 31 bệnh nhân (BN) UTTT thấp giai đoạn T3, T4. Kết quả cho thấy, tỷ lệ đáp ứng toàn bộ trên mô bệnh học là 90,3%, đáp ứng hoàn toàn là 6,5%, tỷ lệ phẫu thuật triệt căn 80,7% trong đó 12,9% phẫu thuật bảo tồn cơ thắt. Thời gian sống thêm không bệnh 3 năm là 78,1%. Các tác dụng phụ trên hệ huyết học đều độ 1, 2; các tác dụng phụ khác ít gặp. Qua nghiên cứu có thể kết luận, hóa xạ trị tiền phẫu có tỷ lệ đáp ứng cao, cải thiện đáng kể tỷ lệ phẫu thuật triệt căn và phẫu thuật bảo tồn cơ thắt hậu môn. Phương pháp hóa xạ trị đồng thời an toàn, ít độc tính, tác dụng phụ ở mức thấp.

Từ khóa: Hóa xạ trị tiền phẫu, ung thư trực tràng xâm lấn.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Tại Việt Nam, ung thư đại trực tràng đứng vị trí thứ 6 trong các bệnh ung thư với tỷ lệ mắc là 9,2/100.000 dân và tỷ lệ tử vong là 5,0/100.000 dân [1].

Hiện nay, tỷ lệ BN UTTT thấp đến bệnh viện ở giai đoạn muộn khi tổn thương đã xâm lấn tổ chức xung quanh còn cao nên tỷ lệ các BN được ĐT phẫu thuật triệt căn và phẫu thuật bảo tồn cơ tròn hậu môn còn thấp. Trong vài năm gần đây, một số cơ sở y tế ĐT nhóm BN này bằng hóa xạ trị tiền phẫu với Capecitabine cho kết quả khả quan. Tuy nhiên, cho tới nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu trong nước về vấn đề này, do vậy chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “Nghiên cứu hiệu quả của hóa xạ trị tiền phẫu trong ĐT UTTT giai đoạn xâm lấn” với 2 mục tiêu: 1) Đánh giá kết quả hóa xạ trị tiền phẫu trong ĐT UTTT giai đoạn xâm lấn; 2) Nhận xét một số tác dụng không mong muốn và độc tính của phương pháp ĐT này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng: Gồm 31 BN UTTT thấp được chẩn đoán bằng mô bệnh học là ung thư biểu mô tuyến, giai đoạn 3, 4 hoặc đã có di căn hạch.

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

Các bước tiến hành:

- BN được khám lâm sàng và tiến hành các xét nghiệm

cận lâm sàng trước mổ.

- Sau khi BN được xếp ở giai đoạn T3, T4, tiến hành ĐT.
+ Hóa trị: Xeloda: 825 mg/m² da x 2 lần/ngày vào các ngày xạ trị (5 buổi/tuần).

+ Xạ trị: tổng liều: 46 Gy, phân liều 200 cGy/ngày, 5 ngày/tuần.

- Đánh giá kết quả ĐT:

+ Đáp ứng chủ quan: Dựa vào các triệu chứng cơ năng của BN.

+ Đáp ứng khách quan: Dựa theo tiêu chuẩn RECIST (Response evaluation criteria in solid tumors) [2].

+ Độc tính của hoá xạ trị tiền phẫu.

Dựa vào tiêu chuẩn phân độ độc tính thuốc chống ung thư của Tổ chức Y tế thế giới (World health organization common toxicity criteria) [2].

- Nếu đánh giá có đáp ứng với ĐT hóa xạ đồng thời sẽ tiến hành ĐT phẫu thuật sau khi kết thúc hoá xạ trị 3 tuần.

- Đánh giá tỷ lệ phẫu thuật triệt căn, tỷ lệ phẫu thuật bảo tồn cơ tròn, phẫu thuật phá hủy cơ tròn sau ĐT hoá xạ trị và đánh giá giai đoạn u (pT) và hạch di căn sau mổ (pN) theo phân loại TNM (giai đoạn ung thư phổi cho những ung thư không phải tế bào nhỏ) của Hiệp hội Ung thư Mỹ AJCC 2010.

- Theo dõi sau ĐT, đánh giá kết quả sống thêm không bệnh.

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

Evaluating the efficacy of neoadjuvant chemoradiation in the treatment of locally invasive rectal cancer

Van Hieu Nguyen^{1*}, Van Quang Le¹, Cong Toan Bui²,
Quoc Tuan Le³

¹Department of Oncology, Hanoi Medical University

²Danang Cancer Hospital

³Vietnam National Cancer Hospital

Received 8 September 2017; accepted 2 November 2017

Abstract:

Objective: Evaluate the efficacy of neoadjuvant chemoradiation in the treatment of locally invasive rectal cancer patients. **Patients and methods:** 31 patients of lower third rectal cancer at the stages of T3, T4. **Results:** Histological overall response rate was 90.3%, and complete response rate was 6.5%. The radical surgery rate was 80.7%, of which 12.9% was sphincter-conserving surgeries. The 3-year disease free survival rate was 78.1%. All the hematological and non hematological toxicities were at the grade 1 or 2 and tolerable. **Conclusions:** Neoadjuvant chemoradiation for lower third rectal cancer patients could improve the response rate, radical surgery, and sphincter-conserving surgery. This method was safe; all side effects and toxicities were low.

Keywords: Locally invasive lower third rectal cancer, neoadjuvant chemoradiation.

Classification number: 3.2

Xử lý số liệu và phân tích sống thêm bằng phương pháp ước lượng xác suất, xuất hiện của các sự kiện theo Kaplan Meier với phần mềm SPSS 16.0. Dùng test χ^2 để kiểm định ý nghĩa thống kê khi so sánh các tỷ lệ.

Kết quả nghiên cứu

Đánh giá đáp ứng bằng triệu chứng cơ năng (bảng 1)

Bảng 1. Đáp ứng cơ năng sau ĐT.

Triệu chứng được cải thiện	Số BN	%
Hết đi ngoài ra máu	25/30	83,3
Đi ngoài phân thành khuôn	22/30	73,3
Số lần đại tiện giảm xuống dưới 3 lần/ngày	22/25	88,0

Đánh giá đáp ứng qua thăm khám trực tràng và nội soi trực tràng (bảng 2, 3)

Bảng 2. Thể tích khối u so với chu vi trực tràng.

Thể tích khối u so với chu vi trực tràng	Trước ĐT		Sau ĐT	
	n	%	n	%
Dưới 1/4 chu vi	0	0	2	6,4
Từ 1/4 đến dưới 1/2 chu vi	5	16,1	6	19,4
Từ 1/2 đến dưới 3/4 chu vi	6	19,4	12	38,7
Từ 3/4 đến dưới 4/4 chu vi	8	25,8	4	12,9
4/4 (toàn bộ chu vi)	12	38,7	7	22,6
Tổng	31	100	31	100
p < 0,05				

Bảng 3. Giai đoạn khối u qua thăm khám trực tràng trước và sau ĐT.

Giai đoạn khối u theo Y. Mason	Trước ĐT		Sau ĐT	
	n	%	n	%
Giai đoạn 1	0	0	2	6,5
Giai đoạn 2	0	0	7	22,6
Giai đoạn 3	21	67,7	19	61,3
Giai đoạn 4	10	32,3	3	9,6
Tổng	31	100	31	100

Đánh giá đáp ứng bằng cộng hưởng từ siêu âm 1.5 Tesla (bảng 4)

Bảng 4. Giai đoạn khối u (T), hạch (N) trên MRI siêu âm trước, sau ĐT.

	Giai đoạn	Trước ĐT		Sau ĐT	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Khối u	Giai đoạn T1	0	0	3	9,7
	Giai đoạn T2	6	19,4	13	41,9
	Giai đoạn T3	17	54,8	10	32,3
	Giai đoạn T4	8	25,8	5	16,1
	Tổng	31	100	31	100
p < 0,05					
Hạch vùng	N0	14	45,2	22	70,9
	N1b	10	32,3	6	19,4
	N2a	4	12,9	2	6,5
	N2b	3	9,6	1	3,2
	Tổng	31	100	31	100
p < 0,05					

Đánh giá đáp ứng theo RECIST (bảng 5)**Bảng 5. Đáp ứng sau ĐT theo RECIST (Response evaluation criteria in solid tumors).**

Đáp ứng	Số BN	%
Đáp ứng hoàn toàn	2	6,5
Đáp ứng một phần	24	77,4
Bệnh ổn định	3	9,6
Bệnh tiến triển	2	6,5
Tổng	31	100

Đánh giá đáp ứng dựa vào mức độ thoái triển u (bảng 6)**Bảng 6. Đánh giá mức độ thoái triển u.**

Mức độ thoái triển u	Số BN	%
Độ 0	3	10,0
Độ 1	10	33,3
Độ 2	8	26,7
Độ 3	7	23,3
Độ 4	2	6,7
Tổng	30*	100

*Trong 31 BN có 1 BN chỉ phẫu thuật làm hậu môn nhân tạo.

Các tác dụng không mong muốn trong và sau ĐT (bảng 7-9)**Bảng 7. Độc tính trên hệ huyết học.**

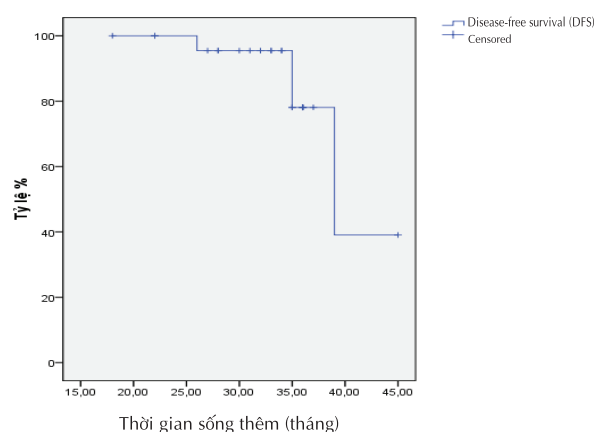
Các độc tính trên hệ tạo huyết	Phân độ độc tính	Số BN (n)	Tỷ lệ (%)
Hemoglobin	0	18	58,1
	1	9	29,0
	2	3	9,7
	3	1	3,2
	Tổng	31	100
Tiểu cầu	0	30	96,8
	1	1	3,2
	Tổng	31	100
Bạch cầu trung tính	0	29	93,6
	1	1	3,2
	2	1	3,2
	Tổng	31	100

Bảng 8. Độc tính trên gan, thận.

	Phân độ độc tính	Số BN (n)	Tỷ lệ (%)
Creatinin	0	30	96,8
	1	1	3,2
	Tổng	31	100
AST/ALT	0	29	93,6
	1	1	3,2
	2	1	3,2
	Tổng	31	100

Bảng 9. Các tác dụng không mong muốn khác trong quá trình ĐT.

Các tác dụng không mong muốn	Mức độ	n	%
Buồn nôn	0	24	77,4
	1	6	19,4
	2	1	3,2
	Tổng	31	100
Nôn	0	25	80,7
	1	5	16,1
	2	1	3,2
	Tổng	31	100
Rụng tóc	0	30	96,8
	1	1	3,2
	Tổng	31	100
Viêm miệng	0	30	96,8
	1	1	3,2
	Tổng	31	100
Tiêu chảy	0	29	93,5
	1	2	6,5
	Tổng	31	100
Viêm bàng quang mức độ nhẹ		9/31	29,0
Viêm âm đạo mức độ nhẹ		5/31	16,1
Viêm da vùng tăng sinh môn		12/31	38,7
Loét da vùng tăng sinh môn		4/31	12,9
Hội chứng bàn tay bàn chân		1/31	3,2
Đau tại vùng hậu môn trong xạ trị		8/31	25,8

Thời gian sống thêm không bệnh (biểu đồ 1)**Biểu đồ 1. Thời gian sống thêm không bệnh.**

Bàn luận

Đa số các BN có các triệu chứng được cải thiện nhiều sau ĐT, 83,3% tổng số BN có giảm đi ngoài ra máu, 88,0% có giảm số lần đại tiện trong ngày xuống dưới 3 lần/ngày, 73,3% đi ngoài phân thành khuôn. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Phạm Cẩm Phương, tỷ lệ cải thiện triệu chứng đi ngoài phân nhầy máu, giảm số lần đại tiện trong ngày lần lượt là 86,6 và 89,7% [3] và cao hơn tỷ lệ của tác giả Đoàn Hữu Nghị với 63,5% giảm số lần đi ngoài ra máu [4]. Sự khác biệt này là do chúng tôi và Phạm Cẩm Phương kết hợp hóa trị và xạ trị, còn tác giả Đoàn Hữu Nghị chỉ ĐT tia xạ đơn thuần. 100% BN đều nhận thấy có đáp ứng sau ĐT, trong đó có 87,1% BN đáp ứng $\geq 50\%$.

Qua thăm trực tràng trước và sau ĐT cho thấy thể tích khối u so với chu vi trực tràng giảm sau ĐT. Có 64,5% khối u lớn chiếm trên 3/4 chu vi trực tràng sau hoá xạ đồng thời giảm xuống còn 35,5% ($p < 0,05$). Võ Quốc Hưng cũng cho thấy 41,0% các BN xạ trị u có kích thước nhỏ đi $\geq 50\%$ [5]. Tỷ lệ u ở giai đoạn T3 giảm từ 67,7 xuống 61,3%. U ở giai đoạn T4 giảm từ 32,3 xuống 9,6%. Tỷ lệ giảm giai đoạn u T4 của chúng tôi đạt 70,0% (7/10 BN), cao hơn Võ Quốc Hưng là 51,8% [5], do tác giả này chỉ ĐT tia xạ đơn thuần.

Tỷ lệ BN được phẫu thuật triệt căn 80,7%, trong đó 12,9% được phẫu thuật bảo tồn cơ thắt hậu môn. Tỷ lệ phẫu thuật triệt căn của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu ĐT xạ đơn thuần của Võ Quốc Hưng (78,5%) [5]. Về tỷ lệ phẫu thuật bảo tồn cơ thắt, các tác giả khác có kết quả cao hơn như J.S. Kim và cs 72% [2], J.C. Kim và cs 74% [6]. Thực tế là nhiều BN ở Việt Nam đã từ chối phẫu thuật bảo tồn vì lo lắng tái phát.

30 BN có thể đánh giá được mô bệnh học của khối u sau hóa xạ trị (có 1 BN chỉ được phẫu thuật làm hậu môn nhân tạo), trong đó có 6,5% BN đáp ứng hoàn toàn trên mô bệnh học và 83,87% đáp ứng một phần. Kết quả này cũng tương đương với một số tác giả nước ngoài. Tỷ lệ đáp ứng hoàn toàn của A.F. De Bruin và cs là 13% [7].

Có 5 BN tổn thương di căn hạch đều có biến đổi thoái hóa tại hạch trên vi thể (100%). R. Soumarova và cs công bố 58% BN không có di căn hạch sau ĐT [8]. Về mức độ thoái triển u, chúng tôi có 2 BN (6,7%) đạt thoái hóa 100% sau hóa xạ trị; còn lại đa số BN có hoại tử u từ 1/4-1/2 (70,0%). Đây cũng là một trong những yếu tố biểu hiện mức độ đáp ứng của bệnh với hóa xạ trị.

Hầu hết các tác dụng không mong muốn trên hệ huyết học đều ở độ 1/2. Hemoglobin < 100 g/l sau ĐT xuất hiện ở tỷ lệ 12,9%. Hạ tiểu cầu chỉ độ I và chiếm 3,2%. Không có BN nào có biến chứng sốt do hạ bạch cầu. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả như J.S. Kim và cs (không có độc tính trên hệ huyết học ở độ 3, độ 4) [2].

Đa số BN có các tác dụng không mong muốn ở độ 1, 2; không ảnh hưởng nhiều đến quá trình ĐT cũng như sinh hoạt của BN, thường gặp là viêm bàng quang 29%, viêm đỏ 38,7%, đau da tăng sinh môn 25,8%, 12,9% loét da vùng xạ trị. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Phạm Cẩm

Phương, viêm đỏ da tăng sinh môn 39,1%, viêm bàng quang nhẹ 32,2% [3]. Tuy nhiên, các tỷ lệ này thấp hơn kết quả của Võ Quốc Hưng [5]. Có sự khác biệt này là do chúng tôi đã sử dụng hệ thống máy xạ trị LINAC theo không gian 3 chiều nên che chắn được nhiều tổ chức lành xung quanh hơn so với các tác giả trong nước. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ tác dụng không mong muốn do xạ trị cao hơn một số tác giả nước ngoài, như J.S. Kim và cs (viêm da do xạ trị 2%) [2]. Điều này có thể do hệ thống xạ trị gia tốc tại một số nước tốt hơn của Việt Nam.

Thời gian sống thêm không bệnh trung bình ước tính của các BN trong nghiên cứu là 40,1 tháng. Tỷ lệ sống thêm không bệnh tại thời điểm 3 năm là 78,1%. Tại thời điểm kết thúc nghiên cứu, tỷ lệ BN xuất hiện bệnh tái phát là 14% trong nhóm các BN được ĐT triệt căn. Kết quả này tương đồng với một số tác giả nước ngoài. Tỷ lệ này của Seung Hyuk Baik và cs là 100% ở nhóm đáp ứng hoàn toàn về mặt mô học, 80% ở nhóm giai đoạn I sau ĐT, 56% ở nhóm giai đoạn II sau ĐT. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,00001$ [9].

Kết luận

Hóa xạ trị tiền phẫu có tỷ lệ đáp ứng cao với 90,3%, cải thiện đáng kể tỷ lệ phẫu thuật triệt căn 80,7% trong đó 12,9% phẫu thuật bảo tồn cơ thắt hậu môn, cải thiện thời gian sống thêm không bệnh tại thời điểm 3 năm là 78,1%. Phương pháp hóa xạ đồng thời an toàn, ít độc tính, tác dụng phụ ở mức thấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, et al. (2010), "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008", *Int. J. Cancer*, **127**(12), pp.2893-2917.
- [2] J.S. Kim, M.J. Cho, et al. (2002), "Preoperative chemoradiation using oral capecitabine in locally advanced rectal cancer", *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **54**(2), pp.403-408.
- [3] Phạm Cẩm Phương (2012), *Nghiên cứu hiệu quả của hóa xạ trị tiền phẫu trong ĐT bệnh UTTR giai đoạn xâm lấn*, Luận án tiến sĩ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [4] Đoàn Hữu Nghị (1994), *Góp phần nghiên cứu xây dựng phác đồ ĐT UTTR, nhận xét 529 BN tại Bệnh viện K qua 2 giai đoạn 1975-1983 và 1984-1992*, Luận án phó tiến sĩ khoa học y - dược, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [5] Võ Quốc Hưng (2004), *Nhận xét một số đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học và đánh giá kết quả đáp ứng xạ trị trước mổ của UTTR tại Bệnh viện K*, Luận văn thạc sĩ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [6] J.C. Kim, T.W. Kim, J.H. Kim, et al. (2005), "Preoperative concurrent radiotherapy with capecitabine before total mesorectal excision in locally advanced rectal cancer", *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **63**(2), pp.346-353.
- [7] A.F. De Bruin, J.J. Nuytens, F.T. Ferenschild, et al. (2008), "Preoperative chemoradiation with capecitabine in locally advanced rectal cancer", *Neth. J. Med.*, **66**(2), pp.71-76.
- [8] R. Soumarova, M. Skrovina, J. Bartos, J. Gruna, A. Wendrinski, S. Czudek, R. Kycina, J. Parvez (2010), "Neoadjuvant chemoradiotherapy with capecitabine followed by laparoscopic resection in locally advanced tumors of middle and low rectum - toxicity and complications of the treatment", *Eur. J. Surg. Oncol.*, **36**(3), pp.251-256.
- [9] Seung Hyuk Baik, Nam Kyu Kim, Jin Sil Seong, et al. (2006), "Oncologic outcomes after neoadjuvant chemoradiation followed by curative resection with tumor-specific mesorectal excision for fixed locally advanced rectal cancer", *Ann. Surg. Oncol.*, **244**, pp.1024-1030.

Ứng dụng nội soi trong phẫu thuật bóc tách lấy cơ lưng rộng trong tạo hình ngực

Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Hồng Hà*

Bệnh viện Việt - Đức

Ngày nhận bài 9/8/2017; ngày chuyển phản biện 14/8/2017; ngày nhận phản biện 20/9/2017; ngày chấp nhận đăng 2/10/2017

Tóm tắt:

Phẫu thuật nội soi ngày càng được ứng dụng phổ biến trong phẫu thuật tạo hình. Bài báo thông báo kết quả hai trường hợp phẫu thuật tạo hình ngực bằng vật cơ lưng rộng có ứng dụng nội soi lấy cơ lần đầu tiên được áp dụng tại Khoa Phẫu thuật tạo hình, Bệnh viện Việt - Đức. Cơ lưng rộng được bóc tách dưới sự hỗ trợ của nội soi làm chất liệu độn trong các tạo hình ngực thiếu sản hoặc biến dạng ngực với sẹo mổ 10 cm đường nách sau, giảm chiều dài cũng như số lượng sẹo và có hiệu quả thẩm mỹ cao. Không trường hợp nào có tai biến xảy ra sau mổ. Bước đầu thành công trong thực hiện kỹ thuật bóc tách vật cơ lưng rộng qua nội soi hỗ trợ mở ra triển vọng phát triển kỹ thuật này trong tạo hình ngực.

Từ khóa: Cơ lưng rộng, phẫu thuật nội soi.

Chỉ số phân loại: 3.2

Application of endoscopic surgery in harvesting latissimus dorsi muscle flap in breast reconstruction

Thi Thu Hang Nguyen, Hong Ha Nguyen*

Vietnam - Germany Hospital

Received 9 August 2017; accepted 2 October 2017

Abstract:

Applications of endoscopy become more and more frequent in plastic reconstructive and aesthetic surgery. We report the two first clinical case of endoscopy assisted to harvest latissimus dorsi muscular flap. This flap is used to reconstruct breasts in Poland's syndrome and post-mastectomy patients. We only need one scar about 10 cm hidden in the axillary region with a good aesthetic result. We believe this success will open the door to new perspectives in breast reconstruction.

Keywords: Endoscopic surgery, latissimus dorsi.

Classification number: 3.2

Đặt vấn đề

Phẫu thuật nội soi trong những năm gần đây có nhiều bước phát triển mạnh mẽ nhờ sự phát triển của kỹ thuật video. Đối với chuyên ngành phẫu thuật tạo hình, phẫu thuật nội soi ngày càng được ứng dụng phổ biến, đặc biệt cho phẫu thuật vùng ngực và đầu mặt. Năm 1994, N.A. Fine và cộng sự thông báo những kinh nghiệm ban đầu trong bóc tách lấy vật cơ lưng rộng có nội soi hỗ trợ. Từ đó đến nay, trên thế giới đã có nhiều bài thông báo kết quả của ứng dụng nội soi trong bóc tách vật cơ lưng rộng [1, 2]. Tuy nhiên, ở Việt Nam, hiện chưa có báo cáo nào về kỹ thuật này. Trong bài báo này, chúng tôi thông báo kết quả hai trường hợp phẫu thuật tạo hình ngực bằng vật cơ lưng rộng có ứng dụng nội soi.

Đối tượng và bệnh nhân (BN) nghiên cứu

Tiêu chuẩn chọn BN: Bao gồm các BN cần cơ lưng rộng đơn thuần làm chất liệu độn hoặc che phủ. Không có chống chỉ định tuyệt đối.

Kỹ thuật thực hiện: Nhóm nghiên cứu thực hiện kỹ thuật dựa trên cơ sở của phẫu thuật nội soi cơ bản có cải tiến với các dụng cụ cải tiến. Kỹ thuật nội soi phẫu thuật bóc tách lấy cơ lưng rộng trong tạo hình ngực đã được tiến hành ở nhiều nước trên thế giới, tuy nhiên ở Việt Nam, kỹ thuật này còn khá mới và ít được ứng dụng.

- BN nằm nghiêng sang bên lành, gây mê nội khí quản.

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

- Gây tê tại chỗ Lidocain Adrenalin.

- Rạch da 10 cm theo đường nách sau. Qua da và tổ chức dưới da bóc tách tìm cơ lưng rộng. Cơ lưng rộng được bóc tách khỏi da dưới mắt thường, sau đó tiếp tục được bóc tách xuống dưới và vào trong với sự hỗ trợ của nội soi. Làm tương tự để bóc tách cơ lưng rộng ra khỏi thành ngực và cuống mạch bằng mắt thường. Những nhánh xuyên lớn được thắt bằng Vicryl 3.0.

Vị trí cho vật được đóng bằng các mũi khâu néo nhằm tránh động dịch sau mổ và rút ngắn thời gian lưu dẫn lưu.

Việc bóc tách được thực hiện bằng dao điện và các dụng cụ nội soi cải tiến bao gồm ống kính 10 mm nghiêng 30 độ, hệ thống hút cải tiến được gắn cùng dao điện, Ecarter dài dùng để bộc lộ và trợ giúp tạo khoang.

Kỹ thuật nội soi có thể chia thành 3 bước:

+ Bước 1: Bóc tách cơ lưng rộng ra khỏi da và tổ chức dưới da.

+ Bước 2: Bóc tách cơ ra khỏi thành ngực.

+ Bước 3: Cắt và giải phóng đầu xa của cơ cũng như bóc tách và giải phóng cuống vật.

Qua đường mổ nách sau bóc tách ra trước khoang ngực cùng với sự hỗ trợ của nội soi.

Kết quả trên hai trường hợp bệnh

BN thứ nhất (hình 1)

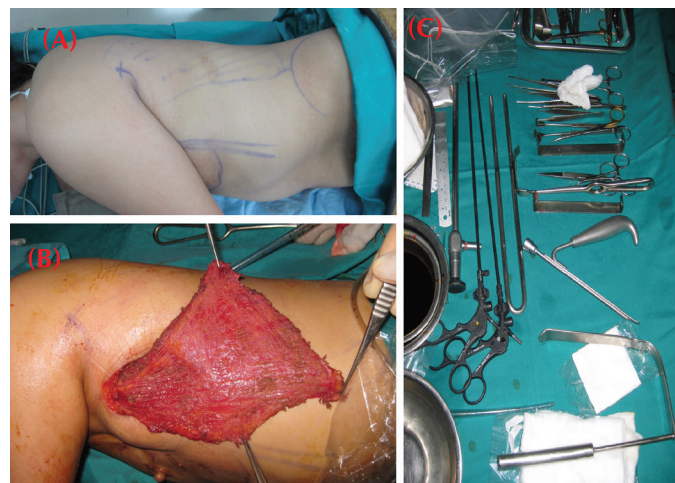
Nữ 19 tuổi, đến khám do thiếu sản ngực phải. Qua thăm khám, BN được chẩn đoán hội chứng Poland type 2 do thiếu sản toàn bộ vú phải, không có phức hợp quầng núm vú và thiếu sản cơ ngực trên MRI. Chúng tôi tiến hành bóc tách cơ lưng rộng có sự hỗ trợ của nội soi với đường mổ 10 cm đường nách sau. Qua vết mổ, chúng tôi đồng thời bóc tách ra trước khoang ngực, đặt một túi ngực 250 cc có cơ lưng rộng che phủ phía trước túi.

BN thứ hai (hình 2)

Nữ 45 tuổi, đến khám do biến dạng ngực trái sau cắt bỏ u vú và xạ trị từ 5 năm trước. Vú trái khuyết 1/2 trên, sẹo xạ trị xấu, tổ chức da xơ, dính vào thành ngực. BN được mổ bóc tách cơ lưng rộng và giải phóng sẹo xơ dính bằng kỹ thuật nội soi hỗ trợ, xoay vật cơ lưng rộng ra trước làm chất liệu độn và tránh sẹo dính tái phát.



Hình 1. Bệnh nhân nữ 19 tuổi, mắc hội chứng Poland type 2, thiếu sản toàn bộ vú phải, không có quầng núm vú và cơ ngực (A). Trong mổ đặt một túi ngực 250 cc có cơ lưng rộng che phủ phía trước túi (B). Sau 2 năm, sẹo mổ nách mờ, BN hài lòng và chưa có nhu cầu tạo hình quầng núm vú (C, D).



Hình 2. Bệnh nhân nữ 45 tuổi, biến dạng ngực trái sau cắt bỏ u vú và xạ trị. (A) Bệnh nhân trước mổ và thiết kế lấy vật; (B) Ảnh sau khi lấy cơ lưng rộng với mổ nhỏ; (C) Các dụng cụ trong phẫu thuật bao gồm cả dụng cụ cải tiến.

Thời gian trung bình bóc tách vật 120 phút. Không xảy ra các biến chứng sau mổ như chảy máu, nhiễm trùng hay phải mổ lại trong cả hai trường hợp BN. Không ghi nhận thấy các biến chứng xa tại thời điểm khám lại sau 1 năm, 2 năm và 3 năm. Thời gian nằm viện kéo dài 7 ngày, dẫn lưu được rút ngày thứ 6.

Bàn luận

Về ưu điểm của phương pháp

Sự khác nhau quan trọng nhất giữa bóc tách cơ lưng rộng với hỗ trợ của nội soi và mổ mở là kích thước sẹo mổ nơi cho vật và số lượng sẹo mổ. Đối với các phẫu thuật viên tạo hình, chuyên tái tạo ngực sau ung thư hay dị tật bẩm sinh, việc sử dụng cơ lưng rộng đơn thuần như chất liệu độn và che phủ là rất phổ biến do chất liệu hằng định, dễ bóc tách, thời gian ngắn. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp kinh điển là sẹo mổ dài, đặc biệt là khi chỉ cần lấy cơ lưng rộng đơn thuần. Chúng tôi sử dụng nội soi hỗ trợ nhằm giảm bớt sẹo cả về chiều dài và số lượng.

Đối với BN thứ nhất, với sự hỗ trợ của nội soi, chỉ cần một đường mổ duy nhất 10 cm đường nách sau, chúng tôi có thể tiếp cận bóc tách được cả cơ lưng rộng và bóc tách khoang phía trước để chuẩn bị nơi nhận vật và khoang đặt túi độn Silicon. Kỹ thuật này đã tránh cho BN thêm một đường mổ tại ngực, đạt được tính thẩm mỹ cao.

Đối với trường hợp thứ hai, BN có sẹo mổ cắt u vú ở vị trí 1/4 trên ngoài nhưng sẹo xấu, thiếu dưỡng. Với sự hỗ trợ của nội soi, qua đường nách sau, chúng tôi dễ dàng bóc tách vật cơ lưng rộng và phần da, tổ chức dưới da, không cắt qua sẹo thiếu dưỡng, giảm nguy cơ hoại tử, lâu liền của sẹo do kém nuôi dưỡng.

Sẹo mổ 10 cm trên đường nách sau rất kín đáo và đạt hiệu quả thẩm mỹ (hình 1). Nhiều tác giả sử dụng bơm hơi CO₂ để tạo khoang, duy trì khoang và giúp bóc tách dễ dàng hơn, sẹo mổ nhỏ hơn nhưng nhiều sẹo mổ [3-6]. Hơn nữa, để chuyển vật cơ lưng rộng sang nơi nhận vật và tránh chèn ép cuống vật, vẫn cần một đường rạch đủ rộng. Đồng thời, việc dùng khí CO₂ và bóng khiến cho phẫu thuật viên không thể kiểm soát được kích thước khoang bóc tách, có nguy cơ bị bóc tách quá rộng, ra ngoài phạm vi mong muốn, làm tăng nguy cơ chảy máu, tụ dịch sau mổ. Thời gian mổ có sự trợ giúp của khí CO₂ của các tác giả tương đương như của chúng tôi (bảng 1).

Bảng 1. Nghiên cứu ứng dụng lấy vật cơ lưng rộng qua nội soi của các tác giả.

Tác giả	Số ca bệnh	Sẹo mổ (cm)	Bơm khí CO ₂	Thời gian mổ (phút)
Gueven, et al. [5]	12	4 cm	Có	74,2 (50-125)
Nakajima, et al. [4]	168	5-7	Không	50
Pomel, et al. [7]	8	3	Có	112 (85-140)
Ramakrishnan, et al. [3]	2	4-5	Có	60-300
Guemes, et al. [8]	5	10	Không	
Wonjae Cha, et al. [9]	4	6-8	Không	

Kết quả của phương pháp này là an toàn, đáng tin cậy, 2 BN mổ đều diễn ra thuận lợi, không có BN nào phải mổ lại hay có biến chứng.

Về nhược điểm

Thời gian mổ của phương pháp còn dài (trung bình 120 phút) so với kỹ thuật bóc tách vật mổ mở do bước đầu được đưa vào áp dụng nhưng cũng tương đương với các tác giả nước ngoài (bảng 1). Thời gian mổ sẽ được rút ngắn khi kỹ thuật được thực hiện thành thạo hơn.

Kết luận

Phẫu thuật có sự hỗ trợ của nội soi áp dụng trong bóc tách vật cơ lưng rộng đã được thực hiện bước đầu thành công tại Khoa Phẫu thuật tạo hình, Bệnh viện Việt - Đức. Phương pháp này giúp giảm bớt số lượng cũng như độ dài của sẹo, đặc biệt hiệu quả trong những chỉ định yêu cầu bóc tách cả khoang ngực và khoang lưng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.A. Fine, D.P. Orgill, J.J. Pribaz (1994), "Early clinical experience in endoscopic-assisted muscle flap harvest", *Ann. Plast. Surg.*, **33**, pp.465-472.
- [2] C. Pomel, M.C. Missana, P. Lasser (2002), "Prélèvement endoscopique d'un lambeau musculaire pur de grand dorsal en reconstruction mammaire. Étude de faisabilité et revue de la littérature", *Ann. Chir.*, **127**, pp.337-342.
- [3] V. Ramakrishnan, S.J. Southern, R. Tzafetta (2000), "Reconstruction of the high-risk chest wall with endoscopically assisted latissimus dorsi Harvest and expander placement", *Ann. Plast. Surg.*, **44**, pp.250-258.
- [4] H. Nakajima, I. Fujiwara, N. Mizuta, K. Sakaguchi, M. Ohashi, A. Nishiyama, et al. (2010), "Clinical outcomes of video-assisted skin-sparing partial mastectomy for breast cancer and immediate reconstruction with latissimus dorsi muscle flap as breast-conserving therapy", *World J. Surg.*, **34**, pp.2197-2203.
- [5] E. Gueven, K. Basaran, M. Yazar, B.C. Ozden, S.V. Kuvat, H. Aydin (2010), "Electrothermal bipolar vessel sealer in endoscope-assisted latissimus dorsi flap harvesting", *J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech. A*, **20**, pp.735-742.
- [6] J. Kiiski, I. Kaartinen, S. Kotiluoto, H. Kuokhanen (2017), "Modified approach for endoscopic harvest of the latissimus dorsi free flap with CO₂ insufflation and standard laparoscopic equipment", *Microsurgery*, **37**(5), pp.383-387.
- [7] C. Pomel, M.C. Missana, D. Atallah, P. Lasser (2003), "Endoscopic muscular latissimus dorsi flap harvesting for immediate breast reconstruction after skin sparing mastectomy", *Eur. J. Surg. Oncol.*, **29**, pp.127-131.
- [8] A. Guemes, R. Sousa, R. Cachon, P. Valcarreres, M. Rufas, A. Gonzalo, I. Gil, R. Lozano (2008), "Minimally invasive breast surgery: breast reconstruction using pure muscular latissimus dorsi flap", *Cir. Esp.*, **83**, pp.85-88.
- [9] Wonjae Cha, Woo-Jin Jeong, Soon-Hyun Ahn (2013), "Latissimus Dorsi Muscle Free Flap Revisited: A Novel Endoscope-Assisted Approach", *The Laryngoscope*, **123**(3), pp.613-617.

Đánh giá tác dụng giảm đau của phương pháp từ trường kết hợp với điện châm điều trị bệnh thoái hóa cột sống thắt lưng

Nguyễn Đức Minh*

Bệnh viện Châm cứu Trung ương

Ngày nhận bài 20/11/2017; ngày chuyển phân biên 24/11/2017; ngày nhận phân biên 27/12/2017; ngày chấp nhận đăng 5/1/2018

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá tác dụng giảm đau của bệnh thoái hóa cột sống thắt lưng (THCSTL) khi sử dụng phương pháp từ trường kết hợp với điện châm để điều trị. Nghiên cứu được thực hiện trên 60 bệnh nhân bị THCSTL điều trị tại Bệnh viện Châm cứu Trung ương bằng phương pháp từ trường kết hợp với điện châm (đông tây y kết hợp) để điều trị. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 7 ngày điều trị hệ số giảm đau K đạt ($p < 0,05$); 86,67% hết đau, 13,33% đau nhẹ và không có trường hợp nào đau vừa; 90% hoạt động chức năng sinh hoạt tốt, 10% khá và không có trường hợp trung bình; 86,67% độ giãn CSTL tốt, 13,33% khá, không có trường hợp trung bình; 86,67% tầm vận động đạt tốt và 13,33% khá; 100% hết cơ cứng sống lưng. Như vậy có thể kết luận: Phương pháp từ trường kết hợp với điện châm (đông tây y kết hợp) điều trị bệnh THCSTL cho kết quả tốt, và hiệu quả hơn điều trị bằng phương pháp điện châm đơn thuần.

Từ khóa: Điện châm, giảm đau, thoái hóa cột sống thắt lưng, từ trường.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

THCSTL là tình trạng thoái hóa lớp sụn và các đĩa đệm ở cột sống bị tổn thương nghiêm trọng, gây ra những cơn đau nhức khó chịu ở vùng lưng, thắt lưng và thậm chí dẫn đến tê bì chân tay. Bệnh này rất phổ biến, theo thống kê của Hội Chấn thương chỉnh hình Việt Nam thì số người có chỉ định phẫu thuật cột sống chiếm 10% số bệnh nhân đau cột sống, 90% số bệnh nhân được điều trị nội khoa bằng thuốc tây y, phục hồi chức năng và y học cổ truyền (YHCT) [1]. Điều trị theo YHCT có rất nhiều phương pháp, trong đó điện châm là phương pháp thuận tiện, rẻ tiền, thực hiện được ở mọi cơ sở y tế có cán bộ YHCT. Đã có một số đề tài đánh giá tác dụng của điện châm điều trị THCSTL, tuy nhiên còn ít đề tài nghiên cứu về việc điều trị kết hợp với phương pháp từ trường của y học hiện đại. Nhằm có được kết quả điều trị tốt hơn, chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu: Đánh giá tác dụng giảm đau

của phương pháp từ trường kết hợp với điện châm điều trị bệnh THCSTL.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng

60 bệnh nhân từ 30 tuổi trở lên, không phân biệt giới tính, nghề nghiệp, được chẩn đoán đau do THCSTL theo tiêu chuẩn của y học hiện đại được điều trị nội trú tại Bệnh viện Châm cứu Trung ương. Bệnh nhân đồng ý tự nguyện tham gia vào nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: Thời gian đau thắt lưng trên 3 tháng; hình ảnh X quang không có THCSTL; bệnh nhân mắc các bệnh: Lao cột sống, viêm cột sống dính khớp, ung thư, chấn thương, nhiễm trùng, nhiễm độc, HIV-AIDS; các bệnh nhân đau thắt lưng không có chứng trạng của yếu thống thể thận hư; bệnh nhân không tự nguyện tham gia nghiên cứu, không tuân thủ điều trị.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu

được tiến hành theo mô hình thử nghiệm lâm sàng mở, có đối chứng (so sánh trước và sau điều trị, so sánh giữa hai nhóm).

Cỡ mẫu nghiên cứu: Gồm 60 bệnh nhân chọn ngẫu nhiên chia thành hai nhóm, đảm bảo các nhóm có sự tương đồng về tuổi và mức độ đau: Nhóm I (nhóm nghiên cứu) được điều trị bằng phương pháp điện châm kết hợp từ trường; nhóm II (nhóm đối chứng) được điều trị đơn thuần bằng phương pháp điện châm.

Phương tiện nghiên cứu: Kim châm cứu, bông vô trùng, cồn 70 độ, panh vô khuẩn, khay quả đậu; máy điện châm M7 do Bệnh viện Châm cứu Trung ương sản xuất; máy từ trường Mas-expert (CHLB Đức).

Phương pháp điện châm: Châm tả các huyệt: Giáp tích, L1-L5, Đại trường du, Hoàn khiêu, Trật biên, Ủy trung. Châm bổ huyệt: Thận du. Kích thích bằng máy điện châm: Mắc mỗi cặp dây cho hai huyệt cùng tên, cùng

*Email: drminhchamcuu@gmail.com

Assessing the pain relief effect of combining magnetic field and electroacupuncture in treating degenerative lumbar spine disease

Duc Minh Nguyen*

Central Acupuncture Hospital

Received 20 November 2017; accepted 5 January 2018

Abstract:

Objectives: to assess the analgesic effect of lumbar spine degeneration using magnetic method combined with electroacupuncture. **Subjects and methods:** the study was conducted on 60 patients with degenerative lumbar spine disease in the Central Acupuncture Hospital using the method of magnetic field combined with electroacupuncture. **Result:** the results showed that after 7 days of treatment, the pain relieving factor K achieved ($p < 0.05$); 86.67% of the patients was pain-free; 13.33% of that felt much less painful than before; functional activities were absolutely great in 90% of the patients, good in the remaining 10%; lumbar spine dilatation and range of motion were both great in 86.67%, good in 13.33% of the patient. 100% of the patients was free from side back muscles retraction. **Conclusion:** the method of combining magnetic field and electroacupuncture showed good results, and it was much more effective than using only the electroacupuncture method.

Keywords: Electroacupuncture method, lumbar spine degeneration, magnetic field, pain relief.

Classification number: 3.2

đường kính. Tần số với bộ huyết: 1-3 Hz (cường độ 1-5 microampe), tần số với tả huyết: 5-10 Hz (cường độ 10-20 microampe), cường độ tùy theo tình trạng bệnh và ngưỡng chịu của từng bệnh nhân. Thời gian kích thích cho mỗi lần điện châm là 30 phút. Liệu trình điều trị: 30 phút/lần/ngày x 7 ngày/đợt điều trị. Sau khi đủ thời gian, thao tác rút kim, để bệnh nhân nghỉ ngơi 5-10 phút.

Phương pháp từ trường: Chiếu từ trường vào vùng CSTL. Liệu trình điều trị: 25 phút/lần/ngày x 7 ngày/đợt điều trị, tần số 25 Hz, cường độ 80 Gauss.

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp Test t-student, số liệu được diễn biến dưới dạng $X \pm SD$, sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Chỉ tiêu theo dõi: Theo dõi ngưỡng đau (g/s); theo dõi mức độ đau VAS (bảng 1); độ giãn CSTL, tình trạng cơ cạnh sống thắt lưng. Sử dụng bộ câu hỏi đánh giá độ tàn tật do đau lưng Oswestry Disability (bảng 2).

Bảng 1. Cách tính điểm phân loại mức độ đau.

Kết quả	Mức độ đau	Điểm
Hình tượng thứ I	Không đau	4
Hình tượng thứ II	Đau nhẹ	3
Hình tượng thứ III	Đau vừa	2
Hình tượng thứ IV	Đau nhiều	1
Hình tượng thứ V	Đau không chịu nổi	0

Bảng 2. Cách tính điểm theo chỉ số Oswestry Disability.

Chỉ số Oswestry Disability	Mức độ	Điểm
0-20%	Tốt	4
20-40%	Khá	3
40-60%	Trung bình	2
60-80%	Kém	1
80-100%	Rất kém	0

Phương pháp đánh giá kết quả lâm sàng: Đánh giá sự thay đổi của ngưỡng đau (g/s) sau 7 ngày điều trị, so sánh sự cải thiện về mức độ đau sau 7 ngày điều trị (theo VAS), so sánh sự

cải thiện chất lượng cuộc sống sau 7 ngày điều trị theo Oswestry, so sánh sự cải thiện độ giãn CSTL sau 7 ngày điều trị, đánh giá tình trạng cơ cạnh sống thắt lưng sau 7 ngày điều trị.

Kết quả và bàn luận

Đánh giá sự thay đổi ngưỡng đau

Bảng 3 cho thấy, ngưỡng đau trung bình của nhóm I và nhóm II TĐT lần lượt là 331,1±11,9 g/s và 328,1±10,5 g/s

Bảng 3. Sự thay đổi của ngưỡng đau (g/s).

Nhóm	Thời điểm			
	TĐT (1) X±SD	SĐT (2) X±SD	Hệ số giảm đau K=Đs/Đt	P ₂₋₁
Nhóm I (a)	331,1±11,9	472,1±13,1	1,42±0,09	0,012
Nhóm II (b)	328,1±10,5	456,5±41,2	1,39±0,1	0,018
P _{a-b}	p>0,05	0,016	0,011	

TĐT: Trước điều trị, SĐT: Sau điều trị.

Bảng 4. Sự cải thiện về mức độ đau sau 7 ngày điều trị (theo VAS).

Mức độ	Nhóm										
	Nhóm I (n=30)					Nhóm II (n=30)					
	TĐT (Do)		SBT(D ₇) (a)		p	TĐT (Do)		SBT(D ₇) (b)		p	
	n	(%)	n	(%)		TĐT/SBT	n	(%)	n		(%)
Không đau	0	0	26	86,67	<0,05	0	0	19	63,33	<0,05	
Đau nhẹ	9	30,0	4	13,33		7	23,33	11	36,67		
Đau vừa	18	60,0	0	0		19	63,33	0	0		
Đau nặng	3	10,0	0	0		4	13,34	0	0		
P _{a-b}	0,036										

Bảng 5. Sự cải thiện chất lượng cuộc sống sau 7 ngày điều trị theo Oswestry.

Mức độ	Nhóm									
	Nhóm I (n=30)					Nhóm II (n=30)				
	TĐT (Do)		SĐT(D ₇) (a)		p	TĐT (Do)		SĐT(D ₇) (b)		p
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Tốt	0	0	27	90	<0,05	0	0	20	66,67	<0,05
Khá	19	63,33	3	10		18	60,0	10	33,34	
Trung bình	11	36,67	0	0		12	40,0	0	0	
Kém	0	0	0	0		0	0	0	0	
P _{a-b}	<0,05									

Bảng 6. Sự cải thiện độ giãn CSTL sau 7 ngày điều trị.

Mức độ	Nhóm									
	Nhóm I (n=30)					Nhóm II (n=30)				
	TĐT (Do)		SĐT(D ₇) (a)		p TĐT/SĐT	TĐT (Do)		SĐT(D ₇) (b)		p TĐT/SĐT
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Tốt	0	0	26	86,67	<0,05	0	0	19	63,33	<0,05
Khá	22	73,33	4	13,33		21	70,0	11	36,37	
Trung bình	8	26,67	0	0		9	30,0	0	0	
Kém	0	0	0	0		0	0	0	0	
P _{a-b}	<0,05									

không có sự khác biệt (p>0,05). Sau 7 ngày điều trị, ngưỡng đau tăng lên tới 472,1±13,1 g/s với hệ số giảm đau K là 1,42±0,09 ở nhóm I và 456,5±41,2 g/s với hệ số giảm đau K là 1,39±0,1 ở nhóm II (p<0,05). Sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ở cả hai nhóm với p<0,05, đồng thời có sự khác biệt giữa nhóm I và nhóm II (p<0,05). Điều này cho thấy, khi có tác động của từ trường, khả năng lưu thông khí huyết tốt hơn, từ đó công năng của các tạng phủ được cải thiện hơn, nâng cao thận khí, giúp cho sinh lực của con người được tốt hơn [2].

Đánh giá sự cải thiện về mức độ đau

Bảng 4 cho thấy, sau 7 ngày điều trị, ở cả hai nhóm không bệnh nhân nào còn ở mức độ đau nặng. Ở nhóm I có tới 86,67% bệnh nhân ở mức không đau, trong khi đó tỷ lệ này ở nhóm II là 63,33%. Sự khác biệt về mức độ đau sau 7 ngày điều trị giữa hai nhóm là có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Đánh giá sự cải thiện chất lượng cuộc sống

Bảng 5 cho thấy, sự khác biệt về cải thiện chất lượng cuộc sống sau 7 ngày điều trị của cả hai nhóm là có ý nghĩa (p<0,05).

Nhóm I: So sánh trước và SĐT cho thấy, sự cải thiện chất lượng cuộc sống (bảng Oswestry) ở mức độ tốt tăng từ 0,00 lên 90%, mức độ khá giảm từ 63,33 xuống còn 10%, mức độ trung bình giảm từ 36,67 xuống còn 0,00%.

Nhóm II: So sánh trước và SĐT cho thấy, sự cải thiện chất lượng cuộc sống (bảng Oswestry) ở mức độ tốt tăng từ 0,00 lên 66,67%, mức độ khá giảm từ 60 xuống 33,34%, mức độ trung bình giảm từ 40 xuống 0,00%.

Kết quả cho thấy, chất lượng cuộc sống được cải thiện ở nhóm I cao hơn nhóm II.

Đánh giá sự cải thiện độ giãn CSTL

Bảng 6 cho thấy, sự khác biệt về độ

giãn CSTL sau 7 ngày điều trị giữa hai nhóm là có ý nghĩa ($p<0,05$). Nhóm I: Độ giãn CSTL mức độ tốt tăng từ 0,00 lên 86,67%, mức độ khá giảm từ 73,33 xuống 13,33%, mức độ trung bình giảm từ 26,67 xuống 0%. Nhóm II: Độ giãn CSTL mức độ tốt tăng từ 0,00 lên đến 63,33%, mức độ khá giảm từ 70,00 xuống 36,67%, mức độ trung bình giảm từ 30,00 xuống 0,00%.

Đánh giá tình trạng cơ cạnh sống vùng thắt lưng

Bảng 7. Tình trạng cơ cạnh sống thắt lưng sau 7 ngày điều trị.

Tình trạng cơ cơ	Nhóm									
	Nhóm I (n=30)					Nhóm II (n=30)				
	TĐT (Do)		SDT(D ₊) (a)		p TĐT/SDT	TĐT (Do)		SDT(D ₊) (b)		p TĐT/SDT
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Có	14	46,67	0	0	<0,05	13	43,33	4	13,33	<0,05
Không	16	53,34	30	100		17	56,67	26	86,67	
P _{a-b}	<0,05									

Bảng 7 cho thấy, sau 7 ngày điều trị có sự cải thiện rõ rệt về tình trạng cơ cạnh sống vùng thắt lưng của cả hai nhóm nghiên cứu so với trước khi điều trị ($p<0,05$) và có sự khác biệt giữa hai nhóm.

Bàn luận

Bàn luận về kết quả nghiên cứu

Sự biến đổi về ngưỡng đau: TĐT ngưỡng đau của bệnh nhân nhóm I là $331,1 \pm 11,9$ g/s, sau 7 ngày điều trị tăng lên tới $472,1 \pm 13,1$ g/s, hệ số giảm đau K là $1,42 \pm 0,09$. Sự khác biệt về ngưỡng đau sau 7 ngày điều trị của bệnh nhân nhóm I là có ý nghĩa ($p<0,05$). TĐT ngưỡng đau của bệnh nhân nhóm II là $328,1 \pm 10,5$ g/s, sau 7 ngày điều trị tăng lên tới $456,5 \pm 41,2$ g/s, hệ số giảm đau K là $1,39 \pm 0,1$. Sự khác biệt về ngưỡng đau sau 7 ngày điều trị của bệnh nhân nhóm II là có ý nghĩa ($p<0,05$).

Ngưỡng đau SDT ở hai nhóm đã có sự khác nhau, nhóm I là $472,1 \pm 13,1$ g/s, cao hơn nhóm II là $456,5 \pm 41,2$ g/s. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

với $p<0,05$. Như vậy, dưới tác dụng của điện châm kết hợp với từ trường, ngưỡng đau đã được tăng lên hơn nhóm dùng điện châm đơn thuần.

Thu được kết quả về sự cải thiện ngưỡng đau như vậy có thể giải thích là do khả năng giảm đau của từ trường giúp lưu thông khí huyết tốt hơn, từ đó công năng của các tạng phủ được cải thiện hơn, khả năng chống chọi với các yếu tố bất lợi bên ngoài tác động vào cơ thể cũng được cải thiện.

Hơn nữa, việc sử dụng tác động của từ trường các huyết sẽ giúp cho khí huyết lưu thông vùng thắt lưng (vùng này được coi là phủ của thận), do đó nâng cao thận khí, giúp cho sinh lực của con người được tốt hơn.

Sự cải thiện mức độ đau (theo thước VAS): Qua kết quả trên cho thấy, mức độ không đau sau 7 ngày điều trị của bệnh nhân ở nhóm I là 86,67%, nhóm II là 63,33%. Sự khác biệt về mức độ đau sau 7 ngày điều trị của cả hai nhóm là có ý nghĩa ($p<0,05$). Sự khác biệt về mức độ đau sau 7 ngày điều trị của hai nhóm có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ (bảng 4). Điều đó cho thấy, phương pháp điện châm kết hợp với từ trường có tác dụng giảm đau nhiều hơn so với điện châm đơn thuần. Đau theo YHCT gọi là “thống”. Trong sách Tổ Ván, thiên “Âm dương ứng tượng đại luận” viết: “Thông tắc bất thông, thống tắc bất thông” có nghĩa là: Khí huyết lưu thông thì không đau, khi kinh lạc bị bế tắc, khí huyết không lưu thông thì gây đau. Từ trường kết hợp với châm cứu điều chỉnh cơ năng

hoạt động của hệ kinh lạc, làm thông kinh hoạt lạc, khí huyết lưu thông, do đó có tác dụng giảm đau. Theo y học hiện đại, kích thích của sóng từ trường làm tăng cường lưu thông máu và tăng cường miễn dịch, giảm phù nề. Vì vậy, kết hợp điện châm với từ trường giúp cải thiện tốt hơn khả năng giảm đau. Kết quả này phù hợp với đánh giá của tác giả Huỳnh Ngọc Hồng về tác dụng của từ trường [3].

Sự cải thiện về chất lượng cuộc sống: Sự cải thiện chất lượng cuộc sống của các bệnh nhân nhóm I ở mức độ tốt tăng từ 0,00 lên 90,00%, nhóm II tăng từ 0,00 lên 66,67%. Mức độ khá của các bệnh nhân nhóm I giảm từ 63,33 xuống 10%, nhóm II giảm từ 60,00 xuống 33,34%. Mức độ trung bình của các bệnh nhân nhóm I giảm từ 36,67 xuống 0%, nhóm II giảm từ 40 xuống 0%. Không có bệnh nhân mức độ kém ở cả 2 nhóm.

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, sự cải thiện chất lượng cuộc sống của các bệnh nhân nhóm I là tốt hơn nhóm II. Điều đó có nghĩa là phương pháp từ trường kết hợp với điện châm cho kết quả giảm đau tốt hơn so với phương pháp điện châm đơn thuần.

Sự cải thiện độ giãn CSTL: Độ giãn CSTL ở các bệnh nhân nhóm I mức độ tốt tăng từ 0,00 lên 86,67%, mức độ khá giảm từ 73,33 xuống 13,33%, mức độ trung bình giảm từ 26,67 xuống 0%. Sự khác biệt về độ giãn CSTL sau 7 ngày điều trị của nhóm I là có ý nghĩa ($p<0,05$). Kết quả này cũng phù hợp kết quả nghiên cứu của Nghiêm Hữu Thành [1].

Độ giãn CSTL ở các bệnh nhân nhóm II mức độ tốt tăng từ 0,00 lên 63,33%, mức độ khá giảm từ 70,0 xuống 36,67%, mức độ kém giảm từ 30 xuống 0,00%. Sự khác biệt về độ giãn CSTL sau 7 ngày điều trị ở nhóm II phù hợp kết quả nghiên cứu của Đoàn Hải Nam [4].

Sự khác biệt về độ giãn CSTL sau 7 ngày điều trị của hai nhóm có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ (bảng 6).

Khi bệnh nhân đau vùng thắt lưng sẽ gây phản ứng co cơ vùng thắt lưng, khi cơ co thì đau lại tăng, đó là một vòng xoắn bệnh lý. Tình trạng này sẽ gây hạn chế tầm vận động của các khớp vùng CSTL, đặc biệt ảnh hưởng tới độ giãn CSTL. Phương pháp từ trường kết hợp với điện châm có tác dụng giảm đau mạnh, giải quyết được tình trạng đau và co cơ, do đó cải thiện độ giãn CSTL tốt hơn so với điện châm.

Sự cải thiện mức độ co cơ vùng thắt lưng: Sự cải thiện về tình trạng co cơ cạnh sống vùng thắt lưng của nhóm I và nhóm II sau 7 ngày điều trị là có sự khác biệt ($p<0,05$) (bảng 7).

Khi huyết lưu thông thì không đau, khi kinh lạc bị bế tắc, khí huyết không lưu thông thì gây đau. Khi đau sẽ gây nên tình trạng co cơ, làm cản trở lưu thông khí huyết, dẫn đến đau ngày càng tăng. Châm cứu điều chỉnh cơ năng hoạt động của hệ kinh lạc, làm thông kinh hoạt lạc, khí huyết lưu thông, làm cho cơ nhọc được nuôi dưỡng đầy đủ, do đó giúp bệnh nhân thoát khỏi tình trạng co cứng cơ. Khi sử dụng từ trường tác động lên các huyết trên cơ thể sẽ tạo ra hiệu ứng kích thích sinh học thông qua việc bình thường hóa quá trình tổng hợp ATP ở ty thể, tăng cường hô hấp ở tế bào, cải thiện vi tuần hoàn, giãn cơ... giúp dinh dưỡng cục bộ vùng thắt lưng được cải thiện, từ đó giúp bệnh nhân thoát được cảm giác đau [3]. Từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy, trong điều trị đau do THCSTL, hiệu quả giải quyết tình trạng co cơ của phương pháp từ trường kết hợp với điện châm cao hơn hẳn phương pháp điện châm đơn thuần.

Bàn luận về chọn huyết và kỹ thuật châm

Chọn huyết: Chọn kinh huyết và kỹ thuật châm trong châm cứu là hết sức quan trọng. Chọn huyết phù hợp theo từng bệnh, châm kim đảm bảo đặc khí, kích thích điện phù hợp đóng vai trò chính trong sự thành công của điều trị. Chúng tôi chọn chủ yếu các đường

kinh liên quan đến vùng bị bệnh, đó là những kinh dương ở vùng lưng và huyết có tác dụng toàn thân. Đồng thời cũng dựa theo cơ chế tác dụng của điện châm theo y học hiện đại, nguyên tắc chọn huyết theo YHCT để chọn huyết tại chỗ, lân cận nơi đau hay theo đường kinh [5]. Các huyết này đã được ứng dụng trong điện châm điều trị các chứng đau vùng thắt lưng cho kết quả tốt [6, 7]...

Kỹ thuật châm: Kỹ thuật châm đòi hỏi thực hiện theo đúng quy trình, châm kim phải đạt đặc khí thì mới có tác dụng điều khí, thông kinh lạc, khí huyết lưu thông. Bệnh nhân cảm thấy tại chỗ kim châm tức nặng, không đau, không buốt, thầy thuốc cảm thấy kim mút chặt. Để đạt được hiệu quả giảm đau, chúng tôi sử dụng tần số kích thích 5-10 Hz đối với các huyết cần tả, nếu sử dụng ngưỡng kích thích cao hơn sẽ có nguy cơ gây nên tình trạng co cứng cơ vùng thắt lưng. Cường độ kích thích được điều chỉnh tăng dần cho phù hợp với sức chịu đựng của bệnh nhân, bệnh nhân thấy rung giật tại huyết châm mà không đau. Tránh tình trạng tăng cường độ cao đột ngột hoặc vượt quá sức chịu đựng của bệnh nhân, làm cho các cơ co rút, bệnh nhân sợ hãi, dễ xảy ra tai biến.

Kết luận

Kết quả nghiên cứu 60 bệnh nhân đau do THCSTL được điều trị bằng phương pháp điện châm kết hợp với từ trường, có thể rút ra một số nhận xét sau:

Tác dụng giảm đau của từ trường kết hợp điện châm trong điều trị đau do THCSTL

Hiệu quả điều trị giảm đau của từ trường kết hợp với từ điện châm, sau liệu trình 7 ngày điều trị:

- Ngưỡng đau tăng từ $331,1 \pm 11,9$ g/s (TĐT) đến $472,1 \pm 13,1$ g/s (sau liệu trình điều trị), hệ số giảm đau K đạt ($p<0,05$).

- Mức độ hết đau đạt 86,67%, đau nhẹ 13,33%, đau vừa 0,00% ($p<0,05$).

- Các hoạt động chức năng sinh hoạt đạt 90% tốt, 10% khá, 0,00% trung bình ($p<0,05$).

- Độ giãn CSTL đạt 86,67% tốt, 13,33% khá, 0,00% trung bình ($p<0,05$).

- Tình trạng hết co cơ cạnh sống lưng đạt 100% ($p<0,05$).

Từ trường kết hợp điện châm là phương pháp phối hợp điều trị an toàn

Trong quá trình điều trị không có bệnh nhân nào xảy ra tác dụng không mong muốn hay tai biến do điện châm kết hợp với từ trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nghiêm Hữu Thành (2007), "Những cơ sở khoa học của điện châm - bấm huyết - tẩm thuốc trong điều trị đau cột sống cổ và CSTL", *Kỷ yếu Hội thảo Điều trị đau cột sống cổ và CSTL, những tiến bộ khoa học hiện đại và châm cứu*, tr.6-17.
- [2] Nguyễn Khắc Ninh (2008), *Đánh giá tác động điều trị đau bằng điện châm*, Luận văn thạc sĩ y học, Trường Đại học Y Hà Nội, tr.3-58.
- [3] Huỳnh Ngọc Hồng (2001), "Ứng dụng laser - điện từ trường điều trị đau lưng do thoái hóa cột sống", *Tạp chí Thông tin y học cổ truyền*, **102**, pp.37-39.
- [4] Đoàn Hải Nam (2003), *Đánh giá tác dụng của điện châm huyết Ủy trung và Giáp tích thắt lưng (L1-L5) trong điều trị chứng yếu thống thể hàn thấp*, Luận văn thạc sĩ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [5] Trường Đại học Y Hà Nội (2005), *Châm cứu học*, NXB Y học, tr.180-190.
- [6] Kiên Chinh (2011), "Hiệu quả điều trị chứng đau lưng do thoái hóa cột sống của phương pháp mẫn châm", *Tạp chí Châm cứu Việt Nam*, **2**, tr.18-26.
- [7] Nguyễn Kiêm (1995), "Ứng dụng tia laser trong châm cứu (thực nghiệm trên thỏ)", *Kỷ yếu Hội thảo quốc gia LEMF'95*, tr.45.

Dịch tể bệnh Chagas và tình hình nghiên cứu bọ xít hút máu *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) ở Việt Nam

Hồ Viết Hiếu^{1,2*}, Lê Thành Đô^{2*}, Phan Quốc Toàn^{1,2}, Tạ Mai Phương^{1,2},
Phạm Anh Tuấn^{1,2}, Phạm Thị Khoa², Ngô Giang Liên³

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao, Trường Đại học Duy Tân

²Bộ môn Vi sinh - Ký sinh trùng, Khoa Y, Trường Đại học Duy Tân

³Bộ môn Sinh học tế bào, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 11/10/2017; ngày chuyển phản biện 13/10/2017; ngày nhận phản biện 9/11/2017; ngày chấp nhận đăng 2/1/2018

Tóm tắt:

Chagas là một loại bệnh nguy hiểm ở người gây ra bởi loài trùng roi đơn bào *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 ký sinh trong đường máu. Vector truyền bệnh Chagas là các loài bọ xít hút máu (BXHM) *Triatoma*, *Rhodnius* và *Panstrongylus* (Hemiptera: Reduviidae). Người bị nhiễm bệnh do mắc phải *T. cruzi* hoặc do những nguyên nhân khác như phơi nhiễm với phân của loài BXHM, do truyền máu, mẹ truyền sang con, và do cấy ghép cơ quan nội tạng. Bài báo này phân tích đặc điểm dịch tể học bệnh Chagas và giới thiệu về đặc điểm phân bố, phân loại của loài BXHM *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773), một trong những vector truyền bệnh Chagas có phân bố rộng và phổ biến trên thế giới và Việt Nam.

Từ khóa: Dịch tể học của bệnh Chagas, phân bố của bọ xít hút máu, *Triatoma rubrofasciata*, *Trypanosoma cruzi*.

Chỉ số phân loại: 3.3

Chagas epidemiology and research into *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) in Vietnam

Viet Hieu Ho^{1,2*}, Thanh Do Le^{2*}, Quoc Toan Phan^{1,2}, Mai Phuong Ta^{1,2},

Anh Tuan Pham^{1,2}, Thi Khoa Pham², Giang Lien Ngo³

¹Institute of Research and Development, Duy Tan University

²Department of Medical Microbiology and Parasitology, Medical Faculty, Duy Tan University

³Department of Cell Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 11 October 2017; accepted 2 January 2018

Abstract:

Chagas is a dangerous disease in human, caused by the protozoa parasitic euglenoids *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. The major vector of Chagas are kissing bugs of three genera *Triatoma*, *Rhodnius*, and *Panstrongylus* (Hemiptera: Reduviidae). The disease can be transmitted to human when the bugs deposit their feces on the host's skin surface, then have bites and transmit *T. cruzi*; or via blood transfusion; mother to infants; and transplants of internal organs. In this paper, we presented the epidemiology of Chagas and introduced the distribution and classification of the bug *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773), one of most popular vectors of Chagas in the world and in Vietnam.

Keywords: Distribution of kissing bugs, epidemiology of Chagas disease, *Triatoma rubrofasciata*, *Trypanosoma cruzi*.

Classification number: 3.3

Mở đầu

Bệnh Chagas là một bệnh nguy hiểm có nguồn gốc từ Nam Mỹ, được ví như đại dịch HIV mới ở châu Mỹ, hàng năm làm chết khoảng 12.000 người và có 6-7 triệu người nhiễm bệnh [1]. Bệnh gây ra bởi loài trùng roi đơn bào *Trypanosoma cruzi* ký sinh trong máu người và động vật. Ký sinh trùng (KST) được truyền từ cá thể này sang cá thể khác, từ loài này sang loài khác thông qua các vector truyền bệnh là các loài bọ xít thuộc phân họ BXHM Triatominae. Một trong các vector chính của *T. cruzi* là loài *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773). Ngoài ra, BXHM *T. rubrofasciata* cũng là vector truyền bệnh của hai loài trùng roi khác là *Trypanosoma conorhini* và *T. lewisi* [2]. Sự phát tán theo con đường du lịch và thương mại làm cho BXHM *T. rubrofasciata* trở thành loài phân bố toàn cầu. Trong thập niên vừa qua, sự xuất hiện của loài này liên tục được ghi nhận ở các nước Đông Nam Á, như Thái Lan, Philipin [3]. Ở Việt Nam, sự xuất hiện của BXHM *T. rubrofasciata* đã được ghi nhận ở

*Tác giả liên hệ: Email: hieuhoviet@gmail.com; lethdo@gmail.com

25 tỉnh/thành phố trong cả nước [4]. Bên cạnh đó, người ta cũng thống kê được nhiều ca tấn công của BXHM *T. rubrofasciata* ở người, gây tâm lý lo ngại trong nhân dân. Mặc dù vậy, thông tin khoa học về dịch tễ học bệnh Chagas và vai trò của BXHM ở nước ta vẫn còn chưa được thống nhất và rõ ràng. Vì vậy, trong bài viết này chúng tôi giới thiệu về đặc điểm dịch tễ học bệnh Chagas, đồng thời phân tích đặc điểm về sinh sản, phát triển, vai trò truyền bệnh của loài BXHM *T. rubrofasciata* và phân bố của chúng.

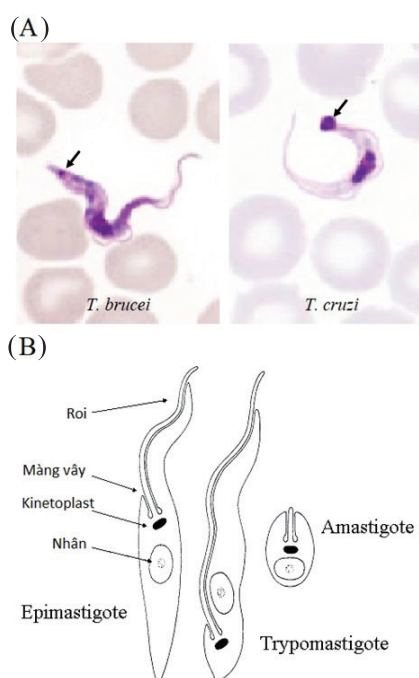
Bệnh Chagas

Lịch sử bệnh Chagas



Hình 1. Bác sĩ Carlos Chagas (1879-1939). Nguồn: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=151&sid=76>.

Bệnh Chagas được phát hiện bởi một bác sĩ người Brazil tên là Carlos Chagas (1879-1939) (hình 1). Ông làm việc tại Viện Nghiên cứu Oswaldo Cruz và có nhiều thành tích xuất sắc trong lĩnh vực phòng chống sốt rét. Năm 1907, ông tình cờ được biết đến một loại côn trùng hút máu động vật có xương sống và người, thuộc họ BXHM. Ông đã ngay lập tức xem xét loại côn trùng này theo hướng vector truyền bệnh giữa các loài động vật và con người [5, 6]. Năm 1909, trong các công bố của mình, bác sĩ Carlos Chagas đã mô tả một loài trùng roi ký sinh mới thuộc giống *Trypanosoma* và đặt tên loài này là “*cruzi*”, theo tên một người bạn đồng thời là người



Hình 2. (A) Sự khác biệt về vị trí của Kinetoplast ở hai loài KST gây bệnh ngủ ở châu Phi (*T. brucei*) và bệnh Chagas (*T. cruzi*). (B) Các thể khác nhau của *T. cruzi*.

đồng nghiệp dẫn dắt ông trong nghiên cứu, bác sĩ Oswaldo Cruz [5, 6]. Ông cũng là người đầu tiên xác định các vật chủ là động vật có vú, xác định vector truyền KST *Trypanosoma cruzi* cũng như mô tả các pha tiến triển của bệnh do loài này gây ra trên người. Vì vậy, bệnh do KST *Trypanosoma cruzi* gây ra trên người được đặt tên là bệnh Chagas theo tên của ông [6].

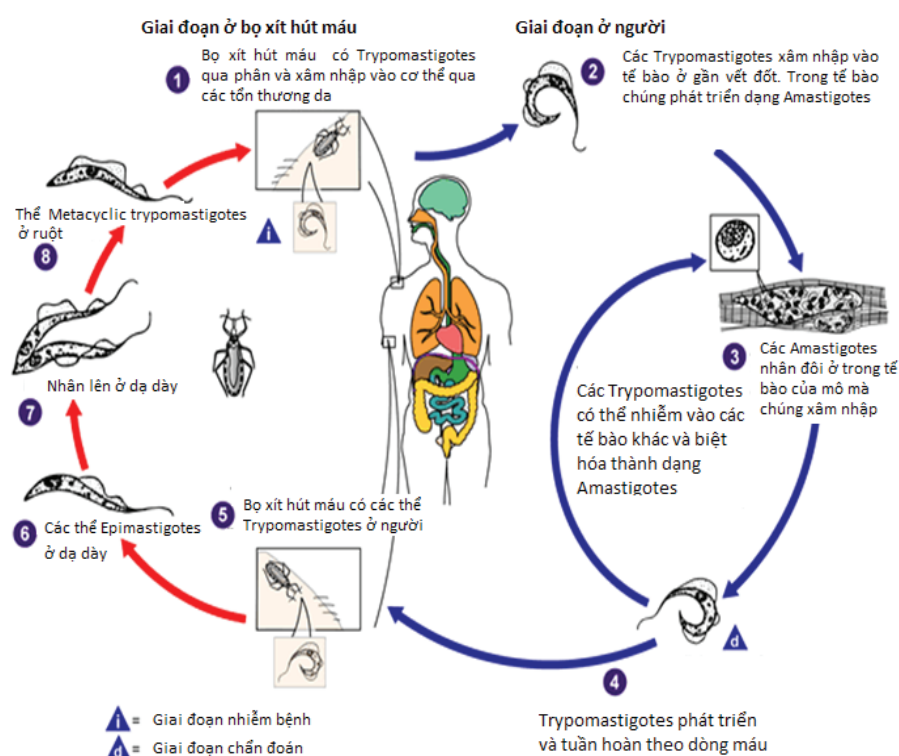
Chu kỳ phát triển của *Trypanosoma cruzi* và đặc điểm dịch tễ bệnh Chagas

Trypanosoma cruzi là một loài trùng roi thuộc họ Trypanosomatidae trong bộ Kinetoplastida. Các thể khác nhau của *T. cruzi* bao gồm amastigote, epimastigote và trypomastigote (hình 2). Ở giai đoạn trưởng thành (thể trypomastigote), *T. cruzi* có một roi, có một ty thể trong bào tương và một nhân tế bào. Loài này hay bị nhầm lẫn với KST *Trypanosoma brucei gambiense* hoặc *Trypanosoma brucei*

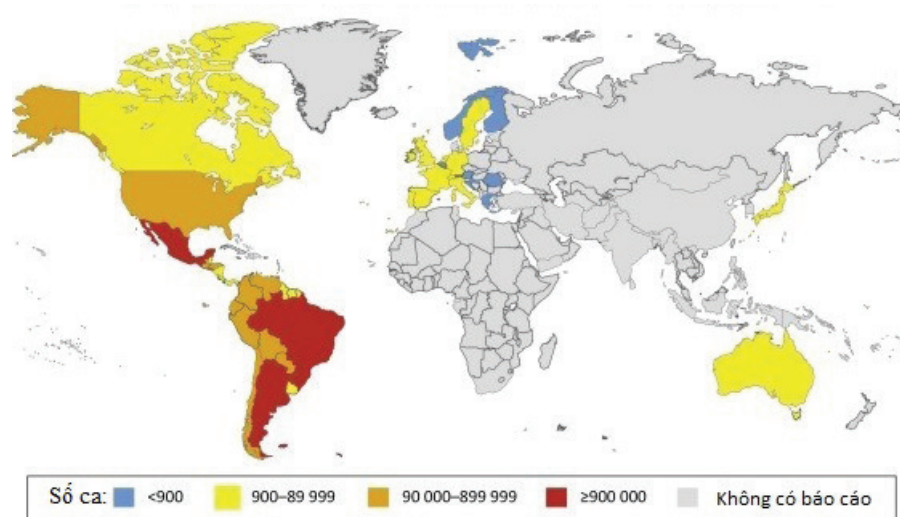
rhodesiense, hai loài gây bệnh ngủ châu Phi (hình 2A) [7]. Khác với các loài KST khác, *T. cruzi* không lây lan qua nước bọt mà có trong phân của BXHM thải ra trong quá trình đốt mồi, sau đó xâm nhập vào máu người qua vết xước đốt, vết thương hở hoặc các biểu mô nhầy (ví dụ mắt, miệng) [8]. Phương thức lan truyền này của *T. cruzi* được phát hiện bởi nhà KST người Pháp Brumpt Joseph (1877-1951). Ngoài ra, *T. cruzi* còn lây lan trên người qua những con đường khác nhau như truyền máu, mẹ truyền sang con và cấy ghép cơ quan nội tạng.

Chu kỳ phát triển của *Trypanosoma cruzi* thông qua 2 giai đoạn: Giai đoạn phát triển ở BXHM và giai đoạn phát triển trong các vật chủ động vật có vú hay người (hình 3) [9]. KST *T. cruzi* tìm thấy trong máu vật chủ là thể trypomastigote. Trong dạ dày của BXHM chúng biệt hóa thành thể epimastigote, bám vào thành dạ dày hay ruột và nhân lên bằng nguyên phân. Trong phần cuối của ống tiêu hóa ở BXHM, thể epimastigote biệt hóa thành metacyclic trypomastigote có hình dạng của trypomastigote và đi ra ngoài theo phân, tiếp tục gây nhiễm các cá thể vật chủ mới. Khi xâm nhập vào vật chủ mới, thể metacyclic trypomastigote ký sinh trong các tế bào tại vị trí lây nhiễm, chúng biệt hóa thành dạng amastigote và phân chia đến khi tế bào bị phá hủy. Sau khi giải phóng khỏi các tế bào, đa số KST amastigote xâm nhiễm các tế bào lân cận, một số biệt hóa thành thể trypomastigote. Thể trypomastigote di chuyển theo dòng máu, lặp lại chu kỳ gây nhiễm trên các vị trí mới, đồng thời truyền sang vật chủ trung gian là BXHM [9].

Theo ước tính, có khoảng 8 triệu người bị bệnh Chagas và hơn 25 triệu người có nguy cơ mắc bệnh trên toàn thế giới mỗi năm với hơn 12 nghìn ca tử vong [10]. Vùng phân bố tự nhiên của bệnh Chagas là châu Mỹ la tinh, hiện nay đang trở thành một vấn đề



Hình 3. Chu kỳ phát triển của *Trypanosoma cruzi*. Nguồn: www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/trypanosom/asisAmerican.htm.



Hình 4. Bản đồ phân bố bệnh Chagas trên thế giới theo số lượng ca bệnh.

y tế cộng đồng tại nhiều quốc gia nơi đây, trong đó Bolivia và Argentina là hai quốc gia bị ảnh hưởng nặng nề nhất với 2,5 triệu người nhiễm [11, 12]. Tỷ lệ dân số nhiễm bệnh cao ở các vùng nông thôn nghèo, với điều kiện sinh hoạt thấp, trong sinh hoạt của người dân tạo ra những nơi trú ẩn nhân tạo cho BXHM. Hơn nữa, các động vật

nuôi như lợn, chó, mèo... và các động vật hoang dã như các loài gặm nhấm, khi, sóc... nhiễm bệnh đóng vai trò như ổ chứa KST [13]. Ngoài ra, sự lan truyền qua đường truyền máu cũng là một nguyên nhân chính gây nên mức độ nghiêm trọng của bệnh Chagas ở các nước Mỹ la tinh.

KST *T. cruzi* đi cùng với sự di dân và du nhập các loài đặc hữu của Mỹ la tinh sang các vùng khác trở đã trở thành vấn đề đáng chú ý tại các quốc gia không lưu hành bệnh Chagas. Số ca bệnh Chagas ở các quốc gia có người nhập cư đến từ châu Mỹ la tinh tăng lên trong những năm gần đây [14]. Ước tính khoảng 400 nghìn ca nhiễm *T. cruzi* ở châu Mỹ la tinh, trong đó Hoa Kỳ có tỷ lệ cao nhất với trên 300 nghìn trường hợp [14]. Ngoài ra, nhiều ca nhiễm bệnh được xác định do bệnh nhân du lịch đến những vùng lưu hành bệnh và bị nhiễm [15]. Một trường hợp đặc biệt bệnh truyền từ mẹ sang con đã được ghi nhận tại Nhật Bản [16]. Tình hình thực tế đã yêu cầu sự cảnh giác cao nhằm phát hiện bệnh Chagas ở các nước không lưu hành bệnh, trong đó có Việt Nam.

Triệu chứng, chẩn đoán và điều trị

Triệu chứng: Có hai giai đoạn của bệnh là cấp tính và mạn tính. Phần lớn các trường hợp không có triệu chứng cấp tính. Đối với những người có các triệu chứng, chúng thường xuất hiện 1-2 tuần sau khi bị nhiễm bệnh bao gồm sốt, sưng các hạch bạch huyết, gan to, và một số trường hợp sưng tấy vết đốt. Viêm cơ tim cấp tính và viêm màng não cấp tính đôi khi quan sát được ở trẻ 1-5 tuổi và là nguyên nhân trong hầu hết các trường hợp tử vong của trẻ gây ra bởi *T. cruzi* [17]. Sau khi kết thúc giai đoạn cấp tính, trong giai đoạn mạn tính KST chủ yếu nằm trong cơ tim và hệ tiêu hóa của người bệnh. Trong thời gian 30 năm kể từ khi nhiễm bệnh, khoảng 30% bệnh nhân biểu hiện các chứng rối loạn tim và khoảng 10% bị biến chứng về tiêu hóa [18]. Sự phát triển bệnh viêm cơ tim do *T. cruzi* gây ra xơ cơ tim, có thể dẫn đến suy tim đột ngột, đe dọa đến tính mạng hầu hết các trường hợp nhiễm bệnh Chagas [17]. Đây là nguyên nhân tử vong chủ yếu, trực tiếp gây ra bởi bệnh Chagas. Ngoài ra, một số trường hợp có biểu hiện sốc phản vệ sau khi bị BXHM tấn

công dẫn đến tử vong [19].

Chẩn đoán: Hiện nay, bệnh Chagas chủ yếu được chẩn đoán thông qua xác định KST trên tiêu bản máu, mô sinh thiết từ bệnh nhân. Thể Trypomastigote của KST có thể được tìm thấy trong máu bệnh nhân ở giai đoạn cấp tính. Với bệnh nhân mạn tính, ngoài việc xác định KST trong máu, phương pháp phổ biến trong chẩn đoán là các test huyết thanh. Ngoài ra, KST có thể được nuôi cấy trong môi trường nhân tạo hoặc được lây nhiễm vào côn trùng, thường là BXHM, và xác định KST. Sinh thiết mô cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh nhân mạn tính, đây là một phương pháp phức tạp nên không được ưu tiên mà chủ yếu để xét nghiệm trên các bệnh nhân tử vong.

Điều trị: Hiện nay có hai loại thuốc dùng để điều trị bệnh Chagas là Benznidazole và Nifurtimox với phác đồ điều trị được tổng hợp trong bảng 1 [20]. Các loại thuốc này có tác dụng phá hủy sinh thể gây bệnh trong các tổ

thận. Phụ nữ có thai cũng được khuyến cáo không sử dụng thuốc.

Vector truyền bệnh Chagas

Phân bố và phân loại các nhóm BXHM

Đầu thế kỷ XX, BXHM được nhận diện là véc tơ truyền bệnh Chagas, nhưng phân loại của chúng đã được nghiên cứu một thế kỷ trước đó. Fabricius (1792) đã có công bố đầu tiên về phân loại, phân bố của bộ xít [21], trong đó có BXHM. Phân loại và lịch sử phát triển các loài thuộc nhóm này trên thế giới đã được Amyot và Serville nghiên cứu [22] và được bổ sung bởi Schuh và Slater [23]. Nghiên cứu của Amyot và Serville cũng đã đề cập đến hình thái học, tính đa hình, tập tính và môi trường của BXHM [22]. Tuy nhiên, chỉ sau khi vai trò truyền bệnh Chagas của chúng được công bố rộng rãi, BXHM mới được nghiên cứu đầy đủ. Những công trình của Lent và Wygodzinsky đã mô tả chi tiết các đặc điểm hình thái của phân họ BXHM

tăng lên, đến nay, hơn 150 loài BXHM đã được biết thuộc 18 giống, 5 chi [25]. Các phương pháp sinh học phân tử và di truyền tế bào đã được sử dụng, phân loại một cách rõ ràng và chính xác các nhóm loài thuộc phân họ Triatominae, đóng vai trò quan trọng trong sự thành công của quá trình giám sát và kiểm soát véc tơ [26].

Trong hơn 150 loài BXHM đã biết, chỉ có số ít loài thuộc 3 giống *Triatoma*, *Panstrongylus* và *Rhodnius* là sống nhờ vào nguồn máu động vật [27] và cũng là những véc tơ chính trong truyền bệnh Chagas [24, 28, 29]. Trong đó 7 loài BXHM quan trọng và thường gặp nhất bao gồm: *Triatoma protracta* ở Bắc Mỹ, *Rhodnius prolixus* và *T. dimidiata* ở Mexico, Trung Mỹ và một phần phía bắc của Nam Mỹ, *T. infestans* và *T. sordida* ở nửa phía tây của Nam Mỹ, *T. brasiliensis* và *Panstrongylus megistus* ở nửa phía đông của Nam Mỹ [30-32].

Đặc điểm sinh học, sinh thái học của BXHM

Các loài BXHM trong tự nhiên thường trú ẩn trong các bụi cây, trong bụi khô của các loài họ cọ, dừa hay trong những đồng cành khô. Chúng làm tổ gần ổ của động vật, gần các lán trại của con người, nơi chúng có thể có được nguồn máu. Những nơi trú ẩn của BXHM xung quanh con người bao gồm chuồng, ổ của gia súc, gia cầm, trong kho chứa, trong các khe nứt và lỗ trên tường vách và mái nhà. Đặc biệt, những ngôi nhà tranh có vách bằng đất đá ở Bolivia (hình 5A) được cho là đã tạo những ổ sinh thái ổn định của BXHM và là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến sự nghiêm trọng của bệnh Chagas ở quốc gia này. Với những ngôi nhà được xây dựng theo lối hiện đại, có các bề mặt phẳng nhẵn và lối đi đóng kín không phải là nơi trú ẩn thường thấy của BXHM. Nếu phát hiện BXHM trong nhà, thường do chúng bay từ bên ngoài vào, tuy nhiên, cũng có trường hợp chúng làm tổ trong nhà cạnh nơi dành cho vật nuôi, gần ổ

Bảng 1. Phác đồ điều trị bệnh Chagas.

Thuốc	Nhóm tuổi	Liều lượng và thời gian
Benznidazole	< 12 tuổi	5-7,5 mg/kg/ngày, chia làm 2 lần; trong 60 ngày
	Trên 12 tuổi	5-7 mg/kg/ngày, chia làm 2 lần; trong 60 ngày
Nifurtimox	≤ 10 tuổi	15-20 mg/kg/ngày, chia làm 3-4 lần; trong 90 ngày
	11-16 tuổi	12,5-15 mg/kg/ngày, chia làm 3-4 lần; trong 90 ngày
	Trên 17 tuổi	8-10 mg/kg/ngày, chia làm 3-4 lần; trong 90 ngày

chức và trong máu [20].

Cả hai loại thuốc có những tác dụng không mong muốn. Benznidazol có thể gây viêm da dị ứng, viêm dây thần kinh ngoại biên, chán ăn, giảm cân và mất ngủ. Nifurtimox có thể gây chán ăn, giảm cân, viêm đa dây thần kinh, đau đầu, chóng mặt, buồn nôn [20]. Các tác dụng phụ có xu hướng thường xuyên và nghiêm trọng hơn ở người lớn tuổi. Chống chỉ định đối với bệnh nhân có tiền sử viêm, suy gan hay

Triatominae cũng như xây dựng các khóa phân loại đến loài [24]. Các tác giả đã mô tả đặc điểm hình thái của 67 loài thuộc giống *Triatoma* và 11 loài thuộc giống *Rhodnius* bằng hình ảnh, đồng thời mô tả sự phân bố của chúng trên thế giới. Đến năm 2003, các nhà khoa học đã xác định được 121 loài thuộc 15 giống của phân họ Triatominae, trong đó có 77 loài và phân loài thuộc giống *Triatoma*. Số lượng loài của phân họ này tiếp tục



Hình 5. Ổ sinh thái đặc trưng của BXHM. (A) Những ngôi nhà tranh ở Bolivia; **(B)** Những đồng củi của người dân ở khu vực miền Trung Việt Nam.

chuột, dưới gầm giường hay trong góc phòng ngủ. BXHM sống bắt buộc trên nguồn máu của động vật. Chúng ẩn nấp vào ban ngày và tấn công vào ban đêm. Các vị trí đốt máu là những vùng da hở, không được che chắn. Các biểu hiện ngoài da khác nhau của vết đốt có thể bị nhầm lẫn với vết nhện cắn, với biểu hiện của bệnh zona (herpes zoster) [33].

Sự phân bố và vai trò truyền bệnh của *Triatoma rubrofasciata*

T. rubrofasciata hiện là loài phân bố toàn cầu, phổ biến nhất trong nhóm các loài BXHM, đã được ghi nhận ở hơn 40 quốc gia trên 4 châu lục (ngoại trừ châu Úc). Loài này có mối liên quan mật thiết với vật chủ là chuột, được xác định là véc tơ chính lan truyền KST *Trypanosoma lewisi* và *Trypanosoma conorhini* ở chuột [2].

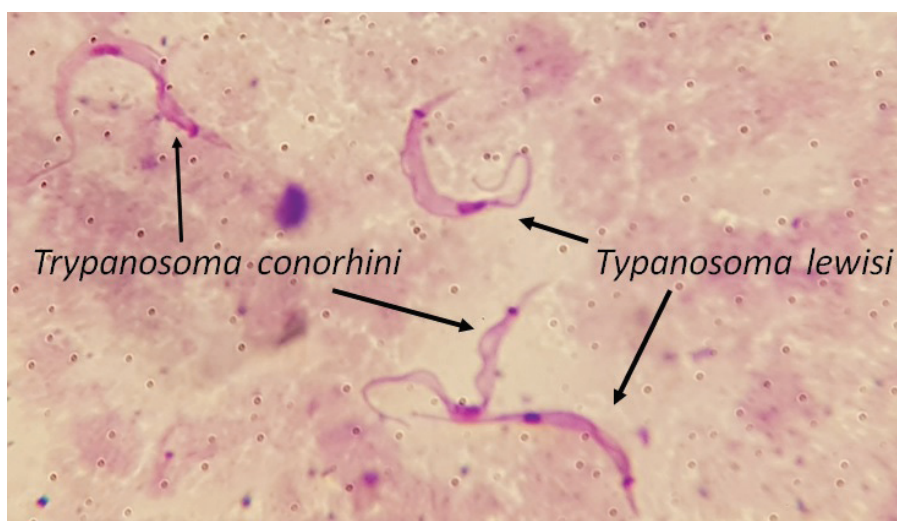
Hơn thế nữa, chúng được phát hiện bị nhiễm *T. cruzi* trong tự nhiên [34]. Vì thế, sự gia tăng của quần thể loài bọ xít *T. rubrofasciata* rất có thể làm tăng ổ chứa *T. cruzi* và tăng nguy cơ lan truyền KST này sang người.

Nghiên cứu BXHM ở Việt Nam

Ở Việt Nam trước đây chưa có những công trình nghiên cứu chuyên sâu về các loài BXHM, tuy nhiên, một số tác giả trong và ngoài nước đã ghi nhận sự có mặt của nhóm này ở Việt Nam [24]. Từ những năm 2000, các nhà khoa học đã tiến hành nhiều nghiên cứu, xây dựng khóa định loại các loài thuộc giống *Triatoma* đã biết ở Việt Nam [35-37]. Đồng thời đã đánh giá tổng quát sự đa dạng và mô tả hình thái của bọ xít bắt mồi Reduviidae ở các tỉnh miền Bắc và Bắc Trung Bộ [38, 39].

Ở khu vực miền Trung Việt Nam, đặc biệt là TP. Đà Nẵng, Quy Nhơn, sự xuất hiện của BXHM đã gây hoang mang cho người dân những năm 2010. Triệu Nguyên Trung đã điều tra và phát hiện một số ổ bọ xít tại khu vực này [40]. Những năm gần đây, số ca bị BXHM *Triatoma rubrofasciata* tấn công tăng nhanh, đã thu hút sự chú ý của các nhà khoa học. Trong nghiên cứu của Chau Nguyen Van và cộng sự (2013), mẫu vật *Triatoma rubrofasciata* đã được thu thập và khẳng định sự hiện diện của loài này ở 21 tỉnh/thành phố trên cả nước [41]. Mới đây, Trương Xuân Lam đã công bố về sự phân bố của BXHM ở 25 tỉnh/thành phố và ghi nhận được 03 loài: *Triatoma rubrofasciata*, *Triatoma bouvieri* và *Triatoma migrans* [4]. Một số đặc điểm sinh học và sinh thái học của chúng đã được mô tả, đồng thời khẳng định chúng có mang hai loại KST *T. conorhini* và *T. lewisi* [2]. Tương tự như các phát hiện trên thế giới, các nghiên cứu của chúng tôi và các nhà nghiên cứu khác của Việt Nam cũng cho thấy BXHM ở Việt Nam thường trú ẩn ở những chuồng nuôi động vật, kho chứa củi và các vật dụng khác (hình 5B). Các nghiên cứu còn cho thấy khả năng nhện đói cao của *T. rubrofasciata*, cho phép chúng chờ đợi và tìm kiếm vật chủ, có những cá thể có thể nhện đói đến 120 ngày. Đặc biệt, sự biến đổi hình thái, chuyển tuổi thiếu trùng chỉ yêu cầu một lần đốt máu [42, 43]. Hơn thế nữa, thử nghiệm với các thuốc diệt côn trùng đã cho thấy *T. rubrofasciata* ở Việt Nam đã kháng với hóa chất alpha-cypermethrin (ở nồng độ 30 mg/m²), deltamethrin (ở nồng độ 0,05%) và malathion (ở nồng độ 5%) [44]. Với vai trò véc tơ tiềm tàng của bệnh Chagas, có các đặc điểm vượt trội trong sinh tồn, việc kiểm soát số lượng và phân bố của BXHM *T. rubrofasciata* là vấn đề cần được quan tâm.

Về tỷ lệ nhiễm KST của BXHM *Trypatoma rubrofasciata*, điều tra ở các tỉnh/thành phố khu vực miền



Hình 6. KST Trypanosoma được phát hiện trong BXHM *T. rubrofasciata* ở miền Trung Việt Nam.

Trung từ Nghệ An, Huế, Đà Nẵng, Quảng Ngãi, Quảng Nam, Quy Nhơn và Khánh Hòa, chúng tôi đã thu thập được các giai đoạn phát triển của BXHM *T. rubrofasciata*. Sau đó các mẫu BXHM được định loại hình thái và mô soi tìm KST. Các tiêu bản máu từ ruột của BXHM được nhuộm giemsa, sau đó được quan sát và ghi hình trên kính hiển vi Olympus CKX41 kết nối camera Infinity ở độ phóng đại 1000X.

Qua nghiên cứu phân tích 100 mẫu BXHM trưởng thành thu thập được từ thực địa cho thấy có 37% cá thể bị nhiễm riêng *T. conorhini*, 18% nhiễm riêng *T. lewisi* và 9% bị nhiễm cả hai loại KST (hình 6). Như vậy, tỷ lệ bị nhiễm Trypanosoma của BXHM là rất cao (chiếm 64%).

Các biện pháp kiểm soát BXHM và bệnh Chagas

Kinh nghiệm phòng chống các bệnh Chagas cho thấy việc kiểm soát véc tơ mang lại hiệu quả tối ưu trong kiểm soát dịch bệnh và tiết kiệm chi phí xã hội [45]. Nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng kết hợp trong phòng, chống và kiểm soát BXHM. Các phương pháp bao gồm sử dụng hóa chất diệt côn trùng, dọn dẹp và loại bỏ những nơi trú ẩn của BXHM

và thay đổi thói quen sinh hoạt. Song song với việc loại bỏ véc tơ, việc sàng lọc máu, tầm soát bệnh trong các ca ghép tạng và khuyến khích người dân kiểm tra xác định KST đã mang lại hiệu quả cao trong kiểm soát bệnh Chagas.

Các kinh nghiệm và bài học trên thế giới

Phòng chống BXHM: Trên thế giới, việc phòng chống và kiểm soát BXHM đã được bắt đầu ngay khi phát hiện ra hóa chất diệt côn trùng DDT. Tuy nhiên, các loài bọ xít *Triatominae* nhanh chóng kháng lại hóa chất này. Hai hợp chất khác, Lindane và Dieldrin, có hiệu quả hơn đã được sử dụng [46], nhưng chúng gây mùi khó chịu. Sự ra đời các hóa chất diệt côn trùng Pyrethroid tổng hợp (deltamethrin và Cyfluthrin) là dấu mốc quan trọng trong việc kiểm soát, tiêu diệt *Triatominae* trong nhà do nhóm hóa chất này không có mùi khó chịu, không làm mất thẩm mỹ ngôi nhà và có chi phí thấp. Ngay cả khi không có tổ của BXHM trong nhà, chúng có thể thâm nhập vào nhà từ các tổ bên ngoài, do đó phun hóa chất ngoài nhà giữ cho bọ xít tránh xa. Các chất diệt côn trùng luôn gây hại cho con người ở mức độ khác nhau, vì vậy

sự lựa chọn hóa chất cần phù hợp theo tình hình cụ thể.

Một phương pháp khác đơn giản và hiệu quả được Rozedaal (1997) tổng kết đó là vệ sinh môi trường, loại bỏ các yếu tố thuận lợi cho việc làm tổ của BXHM [47]. Các công việc bao gồm thường xuyên dọn dẹp và kiểm tra kho, chuồng nuôi động vật, để trừ củi xa ngôi nhà và hủy bỏ tổ của các động vật hoang dã gần ngôi nhà. Sửa chữa tất cả các lỗ, khe, kẽ do hư hại của ngôi nhà. Bịt kín các khoảng hở ở những lỗ khoan dọc theo các đường dẫn nước, dẫn điện và đường thải.

Cùng với các phương pháp trên, việc thay đổi thói quen sinh sống cũng là yếu tố quan trọng trong phòng chống BXHM. Sử dụng đèn hiên nhà có ánh sáng ít thu hút đối với côn trùng, trang bị cửa lưới trống côn trùng ở những vị trí lấy gió và luôn đóng chặt cửa chính khi ra vào. Dùng màn chống muỗi, drap trải nệm cũng để tránh bị BXHM tấn công khi ngủ.

Kiểm soát bệnh Chagas: Những năm gần đây, mức độ nghiêm trọng của bệnh Chagas được cải thiện đáng kể tại nhiều quốc gia. Đây là kết quả của sự kết hợp nhiều phương pháp, sự nghiêm túc trong phòng bệnh và sự kết hợp chặt chẽ giữa các quốc gia. Tất cả quốc gia lưu hành bệnh có luật pháp quy định và điều luật cho sàng lọc máu để phát hiện *T. cruzi*, các chương trình sàng lọc toàn cầu đã được xác lập có hiệu quả [48]. Tất cả các mẫu máu và người hiến máu đã được sàng lọc. Các chương trình kiểm soát phòng chống véc tơ quy mô lớn, thường xuyên và dài hạn đã được tiến hành, góp phần làm giảm tỷ lệ nhiễm mới. Sự hợp tác quốc tế về phòng chống véc tơ tại các quốc gia khu vực Nam Mỹ được điều hành bởi mạng lưới và chương trình hoạt động. Hai nước Uruguay và Chile đã được cấp chứng nhận không còn lan truyền *T. cruzi* năm 1997 và 1999, Brazil vào năm 2006. Argentina đang tiến dần đến đạt chứng nhận này và một tiến trình quan trọng để đạt

mục tiêu này tại Paraguay và Bolivia. Các kết quả trên chỉ có thể được duy trì khi được tiến hành thường xuyên, nâng cao sự cảnh giác của người dân, không để bệnh bùng phát trở lại. Đồng thời, cần thiết lập và liên kết các báo cáo từ các nhóm, tổ chức nghiên cứu và cơ quan y tế quốc gia một cách rõ ràng [8]. Ngoài ra, nghiên cứu sâu hơn về cơ chế sinh bệnh Chagas, phát triển các kỹ thuật chẩn đoán mới, phân tích về mặt di truyền và phát triển vaccine là những vấn đề cần thiết để phòng chống bệnh Chagas tốt hơn.

Một số rào cản với bệnh Chagas:
Sự thành công trong phòng chống bệnh Chagas đã được ghi nhận, không có ca mắc mới tại một số quốc gia [49], tuy nhiên vẫn còn những khó khăn, sự phức tạp phát sinh trong quá trình phòng chống bệnh. Theo báo cáo của WHO, những khó khăn về kinh tế đã làm gia tăng số dân di cư từ Mỹ la tinh đến Bắc Mỹ, châu Âu và các nước phát triển ở châu Á. Vì vậy, nguy cơ nhiễm *T. cruzi* qua truyền máu, ghép tạng là vấn đề sức khỏe tiềm tàng tại các nước không có bệnh lưu hành [50, 51]. Hơn thế nữa, việc kiểm soát BXHM ở các nước không có bệnh lưu hành chưa được quan tâm, làm tăng nguy cơ lây lan bệnh ở nhóm quốc gia này.

Các biện pháp kiểm soát và phòng chống BXHM ở Việt Nam

Cho đến nay, chưa phát hiện mẫu BXHM nhiễm KST *Trypanosoma cruzi* ở Việt Nam. Vì thế, các biện pháp phòng chống chưa được chú trọng, chưa có chương trình cụ thể trong kiểm soát các véc tơ, đặc biệt là *T. rubrofasciata*. Tuy nhiên, với sự phát triển của du lịch, Việt Nam đón lượng lớn du khách quốc tế, trong đó có những du khách đến từ vùng phân bố bệnh Chagas. Trong hội thảo về dịch tễ BXHM năm 2013, các nhà khoa học đã thống nhất rằng việc giám sát BXHM là cần thiết, tạo thế chủ động trong phòng trừ bệnh, tránh những nguy cơ lớn về lan truyền vector mới. Ngoài ra, cần có nhiều dữ liệu hơn để

hiểu các tuyến đường di cư của các loài BXHM, vật chủ, tập tính, năng lực phân tán chủ động, thụ động và các cơ chế của các đợt tấn công tới con người. Đồng thời, cần thiết lập một chương trình dài hạn nhằm theo dõi các loại KST có trong các mẫu BXHM được thu thập trong nhà.

Kết luận

Bệnh Chagas hiện nay trở thành một mối quan tâm sức khỏe cộng đồng không những ở khu vực Mỹ la tinh mà trên toàn thế giới. Đã có nhiều tiến bộ trong giám sát, điều trị và các chiến lược xóa bỏ các loài truyền bệnh, nhưng mục tiêu loại trừ bệnh Chagas còn nhiều thách thức. Cần có sự tiếp tục và mở rộng phối hợp giữa các quốc gia trong các vấn đề về kiểm soát, chẩn đoán, điều trị để đạt được mục tiêu chung. Loài *Triatoma rubrofasciata* phân bố rộng khắp nước ta, là một loại véc tơ truyền bệnh Chagas có phân bố toàn cầu. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã xác định tỷ lệ nhiễm KST *Trypanosoma* ở ngoài tự nhiên cao nên cần có những biện pháp giám sát, hướng dẫn để không chế quần thể và phòng tránh BXHM tấn công.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2017), *Chagas disease (American trypanosomiasis): Key facts*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- [2] D. Emmanuel, C.A. Campos (1943), "Species *Trypanosoma conorrhini* and *Trypanosoma lewisi* transmitido from *Triatoma rubrofasciata*", *Memosrias in Institute Oswaldo*, pp.2-23.
- [3] J.P. Dujardin, T.X. Lam, P.T. Khoa, C.J. Schofield (2013), "The rising of a continental burden: The Chagas-Triatoma model", *Eskiv workshop*.
- [4] Trương Xuân Lam (2017), *Bộ xét hút máu tại Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và công nghệ, 95 trang.
- [5] R. Lewinsohn (1981), "Carlos Chagas and the discovery of Chagas' disease (American trypanosomiasis)", *J. R. Soc. Med.*, **74**, pp.451-455.
- [6] D. Steverding (2014), "The history of Chagas disease", *Parasit Vectors*, **7**, 317pp.
- [7] P. Hamilton (2010), "Classification and

phylogeny of *Trypanosoma cruzi*", in: Telleria J, Tibayrenc M, eds., *American Trypanosomiasis. Chagas Disease. One Hundred Years of Research*, Amsterdam: Elsevier, pp.321-338.

[8] R. Vetter (2001), "Kissing bugs (*Triatoma*) and the skin", *Dermatol.*, online, **7**, p.6.

[9] CDC (2015), *Parasites-American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease): Biology*, <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

[10] WHO (2017), *Chagas disease (American trypanosomiasis): What is Chagas disease?*, <http://www.who.int/chagas/disease/en/>.

[11] WHO (2017), *Chagas disease in Bolivia*, http://www.who.int/tdr/research/vectors/community_based_interventions/ecohealth/chagas-bolivia/en/.

[12] Zabala Juan Pablo (2010), "Chagas disease in Argentina", *Scientific research, social problems and health policies*, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 360pp.

[13] CDC (2016), *Where are triatomine bugs typically found?*, https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/vectors/index.html.

[14] CDC (2017), *Parasites-American Trypanosomiasis (also known as Chagas disease)*, https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html.

[15] J.R. Coura, P.A. Vinas (2010), "Chagas disease: a new worldwide challenge", *Nature*, **465**, pp.56-7.

[16] K. Imai, T. Maeda, Y. Sayama, K. Mikita, Y. Fujikura., K. Misawa, M. Nagumo (2014), "Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan", *Emerg. Infect. Dis.*, **20**(1), pp.146-148.

[17] F.S. Machado, et al. (2012), "Chagas heart disease: report on recent developments", *Cardiol. Rev.*, **20**, pp.53-65.

[18] WHO (2017), *Chagas disease (American trypanosomiasis)*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

[19] Clinic Mayo (2017), *Chagas disease: symptoms*, <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chagas-disease/symptoms-causes/syc-20356212>.

[20] CDC (2017), *Antiparasitic treatment*, https://www.cdc.gov/parasites/chagas/health_professionals/tx.html.

[21] J.C. Fabricius (1792), *Entomologia systematica emendata et aucta: Secundum classes, ordines, genera, specis adjunctis synonymis, locis, observationibus, descriptionibus*, 508pp.

[22] C.J.B. Amyot, A. Serville (1843), *Histoire Naturelle des Insectes. Hémiptères*, Librairie Encyclopedique de Roret. Fain et

Thunot, Paris, 675pp.

[23] R.T. Schuh, J.A. Slater (1995), *True Bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history*, 336pp.

[24] H. Lent, P. Wygodzinsky (1979), "Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease", *Bull. American Mus. Nat. Hist.*, **3**, pp.125-520.

[25] C. Galvão (2014), *Vetores da doença de chagas no Brasil*, 289pp.

[26] C.J. Schofield, C. Galvão (2009), "Classification, evolution, and species groups within the Triatominae", *Acta Tropica*, **110**, pp.88-100.

[27] C.J. Schofield, J.C. Dias (1999), "The Southern cone initiative against Chagas disease", *Adv. Parasitol.*, **42**, pp.1-27.

[28] F. Laporte (1832), "Essai diune classification systematique de liordre des Hémiptères (Hémiptères, Hétéroptères, Latr.)", *Magazine de Zoologie*, **1832**, pp.1-88.

[29] C. Berg (1879), *Hemiptera Argentina enumeravit especiesque novas*, 316pp.

[30] J.R. Coura (2015), "The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-a comprehensive review", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **110**, pp.277-282.

[31] J.E. Rabinovich, U.D. Kitron, Y. Obed, M. Yoshioka, N. Gottdenker, L.F. Chaves (2011), "Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **106**, pp.479-494.

[32] R. Gurgel-Goncalves, C. Galvao, J. Costa, A.T. Peterson (2012), "Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling", *J. Trop. Med.*, **2012**, article ID705326, 15pp.

[33] C.J. Schofield, J. Jannin, R. Salvatella (2006), "The future of Chagas disease control", *Trends Parasitol.*, **22**, pp.583-588.

[34] E. Dias, O. Neves (1943), "Determinacao da infeccao natural por

Schizotrypanum em Triatoma rubrofasciata no Estado de Pernambuco", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **39(3)**, pp.331-334.

[35] Tạ Huy Thịnh, Lê Xuân Huệ, Đặng Đức Khương, Hoàng Vũ Trụ (2002), "Nghiên cứu điều tra thành phần loài số họ côn trùng tỉnh Vĩnh Phúc", *Kỷ yếu Hội nghị Côn trùng học toàn quốc lần thứ 4*, Nxb. Nông nghiệp, pp.443-446.

[36] Lam Trương Xuân (2004), "Hai loài bọ xít hút máu thuộc giống Triatoma Laporte, 1832 (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) được ghi nhận ở Vườn quốc gia Tam Đảo", *Tạp chí Sinh học*, **26(3A)**, pp.73-76.

[37] Lam Truong Xuan, Zhao Ping, Cai Wanzhi (2006), "Taxonomic notes on the genus Epidaus Stal (Heteroptera: Reduviidae: Harpactorinae) from Vietnam, with the description of a new species", *Zootaxa*, **1256**, pp.1-9.

[38] Trương Xuân Lam (2010), *Đánh giá đa dạng sinh học và tiềm năng sử dụng các loài bọ xít họ Reduviidae và Aradidae ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam*, đề tài nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên do Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ quốc gia tài trợ năm 2010.

[39] Trụ Hoàng Vũ, Khương Đặng Đức (2013), "Nghiên cứu thành phần loài bọ xít (Insecta: Heteroptera) ở Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên, tỉnh Thanh Hóa", *Kỷ yếu Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 5 về sinh thái và tài nguyên sinh vật*.

[40] Trung Triệu Nguyên (2010), *Kết quả điều tra bước đầu BXHM người tại miền Trung và những cảnh báo cần thiết về loài bọ xít này*, <http://www.impe-qn.org.vn/impe-qn/vn/portal/InfoDetail.jsp?area=58&cat=936&ID=3873>.

[41] Chau Nguyen Van, Chinh Vu Duc (2013), *Distribution, ecological habits and results in in jury of blood sucking bugs Triatoma rubrofasciata (De Geer, 1773) in some areas of Vietnam*, Science and Technics Publishing House, pp.35-40.

[42] Trương Xuân Lam, Nguyễn Thị Hạnh, Vũ Thị Chỉ (2011), "Bước đầu nghiên cứu khả năng nhện đói của loài BXHM Triatoma rubrofasciata (De Geer, 1773) (Heteroptera:

Reduviidae)", *Kỷ yếu Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 4 về sinh thái và tài nguyên sinh vật*.

[43] Lam Truong Xuan (2011), "Taxonomic notes on species of Reduviidae with the descriptive species of tribe Ploiariolini to subfamily emesinae (Heteroptera: Reduviidae) in Viet Nam", *Kỷ yếu Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 4 về sinh thái và tài nguyên sinh vật*.

[44] Khoa Phạm Thị, Duong Tran Thanh, Pierre Dujardin Jean (2013), *Kissing bugs in Vietnam: rearing and insecticide test*, Science and Technics Publishing House, pp.48-56.

[45] R.P. Brazil, A.R. Da Silva (1983), "Triatomine vectors of Trypanosoma cruzi-like trypanosomes in urban areas of Sao Luiz, Maranhao, Brazil", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77(4)**, p.568.

[46] J.P. Dujardin, C.J. Schofield (2007), "Vector control by surveillance networks: the ECLAT program and Chagas", *Encyclopedia of infectious diseases: modern methodologies*, pp.423-432.

[47] J.A. Rozedaal (1997), "Triatominae Bugs", *Vector control*, WHO, Geneva, pp.210-237.

[48] WHO (2017), *Chagas disease: prevention of Chagas disease*, <http://www.who.int/chagas/disease/prevention/en/>.

[49] WHO (2017), *Chagas disease (American trypanosomiasis): Epidemiology*, <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>.

[50] WHO (2006), "Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update", *weekly epidemiological record*, http://www.who.int/trypanosomiasis_african/resources/who_wer8108/en/.

[51] WHO (2002), *Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee*, <http://www.who.int/iris/handle/10665/42443>.

Xây dựng công thức nhũ tương tạo bọt chứa dầu mè đen (*Sesamum indicum* L.), cao chiết Cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L) L.) và cao chiết Hồng hoa (*Carthamus tinctorius* L.)

Trần Thị Thúy Oanh, Phạm Đình Duy*

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

Ngày nhận bài 25/9/2017; ngày chuyển phân biện 29/9/2017; ngày nhận phân biện 6/11/2017; ngày chấp nhận đăng 14/11/2017

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu là xây dựng công thức nhũ tương tạo bọt chứa dầu mè đen (*Sesamum indicum* L.), cao chiết từ các dược liệu Hồng hoa (*Carthamus tinctorius* L.), Cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L) L.) và đánh giá khả năng kích thích mọc tóc của thành phẩm trên mô hình *in vivo*. Để đạt được mục tiêu, nhóm nghiên cứu đã xây dựng công thức nền nhũ tương có khả năng tạo bọt thông qua việc xác định tỷ lệ giữa hai chất tạo bọt natri lauryl sulfat và cocamidopropyl betain trong hỗn hợp chất tạo bọt, lựa chọn chất nhũ hóa và tỷ lệ chất nhũ hóa phù hợp với pha dầu. Công thức nhũ tương tạo bọt được đánh giá thông qua các chỉ tiêu: Cảm quan, pH, tỷ trọng nhũ tương, mật độ bọt được tạo ra, độ bền vật lý và định tính. Khả năng kích thích mọc tóc của nhũ tương tạo bọt được đánh giá trên chuột Swiss albino *in vivo*. Kết quả cho thấy, tỷ lệ giữa chất tạo bọt natri lauryl sulfat và cocamidopropyl betain phù hợp là 1:1. Cremophor RH 40 được chọn là chất nhũ hóa với tỷ lệ là 10%. Công thức nhũ tương tạo bọt chứa cao chiết từ các dược liệu có màu nâu mờ, mùi thơm đặc trưng của cao dược liệu, pH 5,2, tỷ trọng nhũ tương 1,06, mật độ bọt được tạo ra 0,108 g/cm³, bền vững vật lý và cho phản ứng dương tính với FeCl₃. Khả năng kích thích mọc lông trên chuột của nhũ tương tạo bọt so với dung dịch minoxidil 2% khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Công thức nhũ tương tạo bọt đã được xây dựng thành công và có khả năng kích thích mọc lông trên chuột tương đương thuốc đối chiếu, cho thấy tiềm năng có thể ứng dụng thực tiễn để kích thích mọc tóc.

Từ khóa: Bọt nhũ tương, Cỏ mực, dầu mè đen, Hồng hoa, kích thích mọc tóc.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Tóc là một bộ phận của cơ thể, tuy chức năng sinh lý không đáng kể, nhưng lại đóng vai trò quan trọng về mặt thẩm mỹ. Sự rụng tóc (làm thưa tóc, hói đầu) không đe dọa tính mạng nhưng gây mất thẩm mỹ, ảnh hưởng nhiều đến tâm lý và sinh hoạt hàng ngày [1].

Việc nghiên cứu các thuốc kích thích mọc tóc đã và đang được các nhà nghiên cứu quan tâm. Thuốc kích thích mọc tóc dạng dùng ngoài thường chứa hoạt chất chủ yếu là minoxidil. Tuy nhiên, hiện nay các sản phẩm từ dược liệu cũng được quan tâm nghiên cứu. Điển hình là đã có nhiều nghiên cứu về khả năng kích thích mọc tóc của các dược liệu như dầu mè đen (*Sesamum indicum* L.) [2, 3], Cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L) L.) [4, 5] và Hồng hoa (*Carthamus tinctorius* L.) [6, 7].

Dạng nhũ tương tạo bọt dùng ngoài khắc phục được những nhược điểm của các dạng bào chế lotion, kem, gel và thuốc mỡ như không gây cảm giác nhờn dính, khó chịu

cho người sử dụng. Việc nghiên cứu và phát triển dạng nhũ tương tạo bọt chứa các thành phần dược liệu có thể kế thừa các ưu điểm và khắc phục các nhược điểm trên [8]. Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng công thức nhũ tương dầu mè đen tạo bọt chứa cao chiết từ các dược liệu Hồng hoa (*Carthamus tinctorius* L.) và Cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L) L.), và đánh giá khả năng kích thích mọc tóc của thành phẩm trên mô hình *in vivo*.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Cao đặc Cỏ mực, cao đặc Hồng hoa đã được tiêu chuẩn hóa (Bộ môn Bào chế, Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh), dầu mè đen (TCVN 7597:2013 - Việt Nam), Cremophor RH 40 (BP2010 - Đức), benzalkonium clorid (BP2010 - Ấn Độ); butyl hydroxy toluen-BHT (USP37 - Tây Ban Nha); natri lauryl sulfat (NLS), cocamidopropyl betain (CAPB), span 80, tween 80, propylen glycol, đạt tiêu chuẩn Dược điển Trung Quốc 2010 (Trung Quốc). Các hóa

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

Formulation of foamable emulsion containing *Sesamum indicum* L. oil, *Eclipta prostrata* (L) L. extract, and *Carthamus tinctorius* L. extract

Thi Thuy Oanh Tran, Dinh Duy Pham*

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

Received 25 September 2017; accepted 14 November 2017

Abstract:

The objectives of the study were to formulate a foamable emulsion containing black sesame (*sesamum indicum* L.) oil, *Carthamus tinctorius* L. extract, and *Eclipta prostrata* (L) L. extract and to evaluate its hair growth promoting activity *in vivo*. The base formulation of the foamable emulsion was established based on the ratio of each foaming agent (sodium lauryl sulfate: cocamidopropyl betaine) in the mixture, type of emulsifier, and concentration of the emulsifier. The quality criteria of the final foamable emulsion such as appearance, pH, emulsion density, foam density, physical stability, and identification were evaluated. The Swiss albino mice were used for evaluating the hair growth stimulation activity of the final foamable emulsion. The results showed that the chosen ratio of sodium lauryl sulfate and cocamidopropyl betaine was 1:1. The emulsifier was Cremophor RH 40 with the concentration of 10%. The formulated foamable emulsion containing black sesame oil, *Carthamus tinctorius* L. extract, and *Eclipta prostrata* (L) L. extract has dark brown colour, herbal extract flavour, pH of 5.2, emulsion density of 1.06, foam density of 0.108 g/cm³, suitable physical stability, and positive reaction with FeCl₃ solution. The *in vivo* hair growth stimulation activity of the foamable emulsion showed no significant difference as compared to that of the control group. In conclusion, the formulation of foamable black sesame oil emulsion containing *Carthamus tinctorius* L. and *Eclipta prostrata* (L) L. extracts was successfully established and could be applied for promoting hair growth in human.

Keywords: Black sesame oil, *Carthamus tinctorius* L., *Eclipta prostrata* (L) L., Foamable black sesame oil emulsion, hair growth promoting activity.

Classification number: 3.4

chất, dung môi cần thiết khác đạt tiêu chuẩn dành cho phân tích (Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng công thức nền nhũ tương tạo bọt:

Xác định tỷ lệ phối hợp giữa NLS và CAPB: Khảo sát 9 công thức có tỷ lệ NLS:CAPB tương ứng thay đổi từ 1:9 đến 9:1. Sau đó, các công thức này được đánh giá thông qua tiêu chí khả năng tạo bọt để xác định tỷ lệ tạo bọt tốt nhất. Phương pháp đánh giá dựa trên chiều cao cột bọt tạo được.

Xác định chất nhũ hóa và tỷ lệ chất nhũ hóa: Khảo sát từng chất nhũ hóa tween 80, Cremophor RH 40 ở các tỷ lệ từ 5-20% để lựa chọn chất nhũ hóa và tỷ lệ chất nhũ hóa phù hợp. Các công thức khảo sát có chứa dầu mè đen 3%, NLS:CAPB (1:1) 2,5%, propylen glycol 10%, nước và chất nhũ hóa với tỷ lệ thay đổi như bảng 1.

Bảng 1. Các công thức khảo sát chất nhũ hóa và tỷ lệ chất nhũ hóa.

Công thức	Tỷ lệ % (kl/kl)					
	Dầu mè	Cremophor RH 40	Tween 80	CAPB:NLS (1:1)	Propylen glycol	Nước
A1		5,0	-			77,0
A2		7,5	-			74,5
A3		10,0	-			72,0
A4		12,5	-			69,5
A5		15,0	-			67,0
A6		17,5	-			64,5
A7	3,0	20,0	-	2,5	10,0	62,0
A8		-	5,0			77,0
A9		-	7,5			74,5
A10		-	10,0			72,0
A11		-	12,5			69,5
A12		-	15,0			67,0
A13		-	17,5			64,5
A14		-	20,0			62,0

Điều chế nền nhũ tương tạo bọt: Cho NLS, CAPB, propylen glycol vào cốc có mỏ đã chứa sẵn nước, khuấy đều cho tan hoàn toàn (1). Cho dầu mè và chất nhũ hóa vào một cốc có mỏ khác, khuấy đều bằng máy khuấy từ (2). Sau đó thêm từ từ (1) vào (2) và khuấy ở tốc độ cố định cho đến khi tạo nhũ tương đồng nhất.

Đánh giá nền bọt nhũ tương: Sau khi được điều chế, các công thức từ A1 đến A14 được đánh giá thông qua các tiêu chí sau:

- Độ bền của hệ nhũ tương: Được đánh giá bằng phương pháp ly tâm. Lấy 10 g mỗi công thức đã điều chế cho vào ống ly tâm 15 ml. Sau khi để ổn định 24 h, các ống được đem đi ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 30 phút [9]. Quan sát bằng mắt thường, ghi nhận thể chất của hệ sau khi

ly tâm. Lựa chọn công thức không bị tách lớp hay nổi kem.

- Khả năng tạo bọt: Lấy 5 g mỗi công thức cho vào ống nghiệm có nắp, đáy bằng, đường kính 2 cm. Đem lắc rung bằng máy lắc rung orbital ở mức 10 trong 5 phút. Đo chiều cao cột bọt ngay sau khi lắc, ghi nhận và so sánh kết quả. Tiến hành khảo sát lần lượt tất cả các công thức, mỗi công thức thực hiện 3 lần và lấy kết quả trung bình. Công thức có chiều cao cột bọt càng lớn thì khả năng tạo bọt của công thức đó càng tốt [10].

- Hệ số bền bọt: Thực hiện tương tự khả năng tạo bọt. Thêm vào đó, chiều cao cột bọt sau khi để yên 5 phút được ghi nhận và kết quả được tính theo công thức: Hệ số bền bọt = (chiều cao cột bọt sau khi lắc – chiều cao cột bọt sau 5 phút để yên)/chiều cao cột bọt sau khi lắc. Tiến hành lần lượt tất cả các công thức khảo sát, mỗi công thức thực hiện 3 lần và lấy kết quả trung bình. Công thức có hệ số bền bọt càng nhỏ thì độ bền bọt của công thức đó càng tốt [10].

Điều chế nhũ tương tạo bọt chứa các cao dược liệu:

Hòa cao dược liệu với nước vào cốc có mỏ, khuấy đều cho tan, siêu âm trong 10 phút (1). Thêm NLS, CAPB, propylen glycol, benzalkonium clorid vào (1) và khuấy bằng máy khuấy từ Stuart CB 162 của Anh với tốc độ mức 2 cho đến khi tan hoàn toàn (2). Phân tán dầu mè và chất nhũ hóa vào cốc becher và khuấy đều bằng máy khuấy từ với tốc độ mức 2, sau đó cho BHT vào, khuấy đến khi tan hoàn toàn (3). Cho từ từ (2) vào (3), tiếp tục khuấy với tốc độ cố định trong 5 phút, thêm acid lactic để điều chỉnh pH. Đóng chai, dán nhãn.

Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng của thành phẩm:

Nhũ tương sau khi hoàn tất được đóng vào chai và tiến hành đánh giá các chỉ tiêu:

- Cảm quan: Quan sát bằng mắt thường về độ trong, màu sắc, mùi của chế phẩm; quan sát hình dạng, màu sắc, độ đồng đều của bọt tạo thành sau khi bóp khỏi đầu phun tạo bọt.

- pH của nhũ tương: pH thành phẩm được xác định bằng máy đo pH Mettler Toledo AG8603 của Thụy Sĩ. Thực hiện đo 6 lần và lấy giá trị trung bình.

- Tỷ trọng của nhũ tương: Xác định bằng picnomet ở 20°C. Tỷ số giữa khối lượng mẫu thử và khối lượng nước cất thu được là tỷ trọng cần xác định. Thực hiện đo 6 lần và lấy giá trị trung bình.

- Mật độ bọt được tạo ra: Cân bì 1 cốc hình trụ có thể tích V nhất định đã biết trước được khối lượng m_0 . Cho nhũ tương vào bao bì có đầu xịt tạo bọt. Trước khi tạo bọt thì lắc đều và xịt bỏ một lượng bọt ban đầu khoảng 2-3 g. Sử dụng bình xịt tạo vào cốc sao cho bọt phủ đầy và cao hơn mặt cốc. Dùng một phiến mỏng gạt cho bọt bằng phẳng và vừa

đúng thể tích của cốc. Cân khối lượng thu được m_1 . Khối lượng bọt thu được là $m_1 - m_0$. Tỷ số giữa khối lượng bọt thu được và thể tích của cốc là mật độ bọt cần xác định. Thực hiện 6 lần và lấy giá trị trung bình [10].

- Độ ổn định vật lý: Cân 10 g chế phẩm cho vào ống nghiệm có nắp đậy. Đặt ống nghiệm này lần lượt ở các điều kiện nhiệt độ 40°C ở tủ sấy trong 8 giờ, nhiệt độ 4°C ở tủ lạnh trong 16 giờ. Sau mỗi ngày quan sát và ghi nhận thời gian tách lớp bằng cách đưa ống nghiệm ngang tầm mắt, đối diện với ánh sáng đèn. Mẫu được cho là tách lớp khi chế phẩm bị tách thành 2 pha rõ rệt. Tiếp tục lặp lại các chu kỳ tương tự, thực hiện tối đa 12 chu kỳ [9].

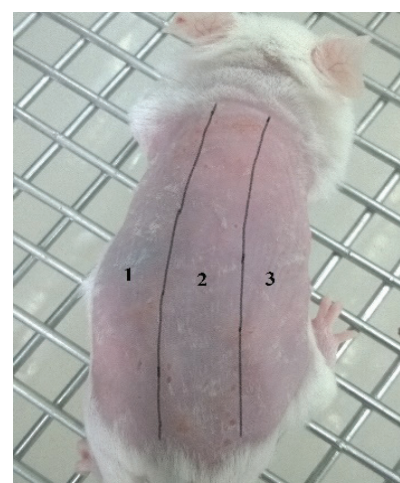
- Định tính: Thành phẩm được pha loãng với nước cất theo tỷ lệ 1:10 trong ống nghiệm, thêm vài giọt thuốc thử $FeCl_3$. Phản ứng dương tính khi màu của dung dịch trong ống chuyển sang màu xanh đen. Thực hiện song song với mẫu trắng để đối chứng.

Đánh giá khả năng kích thích mọc lông in vivo:

Động vật thử nghiệm: Chuột nhắt trắng trưởng thành, giống đực, chủng *Swiss albino*, trọng lượng trung bình 30-35 g, được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế Nha Trang. Chuột được giữ trong 7 ngày để quen với môi trường thử nghiệm. Trong suốt quá trình thử nghiệm, chuột được cung cấp đầy đủ thức ăn và nước uống. Chuột được ngăn riêng từng con trong mỗi lồng.

Thuốc đối chiếu là dung dịch Minoxidil 2% mua từ Galien Pharma (Pháp). Thuốc thử là bọt nhũ tương đang khảo sát. Tá dược 1 (hỗn hợp tá dược của công thức bọt nhũ tương). Tá dược 2 (tá dược của dung dịch Minoxidil 2%, gồm ethanol 96% và propylen glycol).

Tiến hành: Chuột được chia ngẫu nhiên thành 3 lô (Lô 1, Lô 2 và Lô 3), mỗi lô 12 con. Dùng dao cạo sạch vùng lông hình chữ nhật có kích thước 3×5 cm trên lưng chuột,



1: Vùng 1
2: Vùng 2
3: Vùng 3

Hình 1. Chia vùng trên lưng chuột.

tiến hành cạo lông cho tất cả các chuột ở 3 lô. Sau khi được cạo lông, lưng chuột được chia thành 3 vùng đều nhau dọc sống lưng chuột như hình 1. Phân vùng bôi thuốc ở từng lô được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Vị trí bôi thuốc ở từng lô chuột.

Lô	Vùng 1	Vùng 2	Vùng 3
1	Tả dược 1	Chứng bệnh	Thành phẩm
2	Minoxidil 2%	Chứng bệnh	Thành phẩm
3	Tả dược 2	Chứng bệnh	Minoxidil 2%

Chuột được bôi 200 μ l mỗi loại thuốc tương ứng lên từng vùng da, đồng thời mát-xa vùng da trong 5 phút sau khi bôi để thuốc thấm đều. Sau 4 giờ kể từ khi bôi thuốc, dùng bông tẩm nước lau sạch vùng đã bôi thuốc. Sau 6 giờ kể từ lần bôi thuốc đầu, tiến hành bôi thuốc lần thứ 2 trong ngày. Chuột được cách ly riêng biệt từng con trong suốt quá trình thử nghiệm. Thực hiện thí nghiệm trong 28 ngày liên tiếp, mỗi ngày chuột được bôi thuốc 2 lần đều đặn vào buổi sáng và buổi chiều [11].

Phương pháp đánh giá:

- Quan sát: Các vùng da trên lưng chuột được chụp hình vào các thời điểm ngày 7, ngày 14, ngày 21 và ngày 28 của thử nghiệm. Đánh giá mức độ lông mọc trên da đã cạo.

- Đo độ dài lông: Tiến hành đo độ dài lông tại các thời điểm ngày 21 và ngày 28. Nhổ ngẫu nhiên 50 sợi lông từ mỗi vùng của mỗi lô, dùng thước kẹp đo độ dài và ghi nhận kết quả [12]. Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (Mean $\pm$ SEM). Số liệu được phân tích thống kê sử dụng phép kiểm Mann-Whitney với phần mềm SPSS 20 với N = 50. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị p < 0,05.

Kết quả và bàn luận

Kết quả xây dựng công thức nền nhũ tương tạo bọt

Kết quả khảo sát về khả năng tạo bọt của 9 tỷ lệ giữa NLS và CAPB được trình bày ở bảng 3. Công thức số 5 có khả năng tạo bọt tốt nhất, nên lựa chọn tỷ lệ NLS:CAPB là 1:1. Tỷ lệ này được ứng dụng vào khảo sát các công thức từ A1 đến A14.

Bảng 3. Khả năng tạo bọt của các tỷ lệ NLS:CAPB.

Công thức	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tỷ lệ NLS:CAPB	1:9	1:4	3:7	2:3	1:1	3:2	7:3	4:1	9:1
Chiều cao cột bọt (cm)	3,2	4,5	4,5	4,8	5,1	4,9	4,8	4,7	4,7

Kết quả khảo sát các chất nhũ hóa và tỷ lệ chất nhũ hóa được thể hiện ở bảng 4. Các công thức A1, A2, A8 đến A14

đều bị tách lớp, các công thức từ A3-A7 thì ổn định không tách lớp, nên nồng độ Cremophor RH 40 có thể được sử dụng từ 10-20% để nhũ hóa. Dựa vào các chỉ tiêu khả năng tạo bọt và hệ số bền bọt, thì công thức A3 (Cremophor RH 40 tỷ lệ 10%) là phù hợp nhất vì có khả năng tạo bọt tốt hơn các công thức còn lại. Vậy Cremophor RH 40 được lựa chọn làm chất nhũ hóa cho công thức ở nồng độ 10%.

Bảng 4. Kết quả khảo sát các chất nhũ hóa và tỷ lệ chất nhũ hóa.

Công thức	Cremophor RH 40 (%)	Tween 80 (%)	Độ bền hệ nhũ tương	Chiều cao cột bọt sau khi lắc (cm)	Hệ số bền bọt
A1	5,0	-	Tách lớp	6,1	0,26
A2	7,5	-	Tách lớp	5,8	0,47
A3	10,0	-	Không tách	5,2	0,44
A4	12,5	-	Không tách	4,1	0,51
A5	15,0	-	Không tách	3,0	0,47
A6	17,5	-	Không tách	1,9	0,58
A7	20,0	-	Không tách	0,7	0,57
A8	-	5,0	Tách lớp	0,8	0,63
A9	-	7,5	Tách lớp	2,0	0,65
A10	-	10,0	Tách lớp	2,2	0,64
A11	-	12,5	Tách lớp	3,5	0,63
A12	-	15,0	Tách lớp	4,0	0,65
A13	-	17,5	Tách lớp	5,1	0,61
A14	-	20,0	Tách lớp	5,5	0,55

Sau khi đã chọn lựa được chất nhũ hóa và tỷ lệ của chất này thì công thức nền nhũ tương tạo bọt được thiết lập và trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Thành phần nhũ tương tạo bọt chứa các cao chiết dược liệu.

Thành phần	Tỷ lệ (%)
Cao dược liệu	
Cao Hồng hoa	5,00
Cao Cỏ mực	10,00
Dầu mè	3,00
Cremophor RH 40	10,00
Propylen glycol	10,00
Natri lauryl sulfat	2,50
Nền nhũ tương tạo bọt	
CAPB	2,50
Acid lactic	0,01
BHT	0,05
Benzalkonium clorid	0,02
Nước cất	54,42

Kết quả đánh giá các chỉ tiêu chất lượng của thành phẩm

Việc đánh giá chất lượng thành phẩm được xây dựng dựa trên các chỉ tiêu được đưa ra trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu chất lượng của thành phẩm.

Chỉ tiêu	Kết quả					
Cảm quan	Thành phẩm có dạng lỏng, màu nâu mờ, mùi thơm đặc trưng của cao dược liệu, không tách lớp hay nổi kem ở điều kiện thường. Khi xịt bột cho bột đều, mịn, màu sắc đồng nhất					
Mật độ bột	0,109	0,108	0,109	0,109	0,106	0,108
	$D_{\text{bột}} = 0,108 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$					
Tỷ trọng nhũ tương	1,05	1,06	1,06	1,06	1,06	1,07
	$d = 1,06 \pm 0,01$					
pH	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
	$\text{pH} = 5,2$					
Độ bền vật lý	Thực hiện trên 6 mẫu, sau 12 chu kỳ các mẫu đều không có sự tách pha, màu nâu mờ, thể chất đồng nhất					
Định tính	 Phản ứng với dung dịch FeCl_3 cho sản phẩm màu xanh đen					

Kết quả đánh giá in vivo

Quan sát: Khi quan sát diện tích vùng lông mọc lên sau 1 tuần thử nghiệm thì không nhận thấy có sự khác biệt giữa các nhóm thử nghiệm. Từ tuần thứ 2 trở đi, bắt đầu có sự khác biệt về diện tích lông mọc lại so với các nhóm khác. Ở nhóm thành phẩm và nhóm minoxidil, lông mọc bao phủ gần như hoàn toàn vùng da khảo sát. Ở các nhóm còn lại thì

Bảng 7. Quá trình phát triển lông ở các lô chuột.

Tuần	Tá dược 1	Chứng	Thành phẩm	Tá dược 2	Minoxidil
1					
2					
3					
4					

diện tích lông bao phủ nhỏ hơn. Tuy nhiên đến tuần thứ 4 thì ở tất cả các nhóm, lông đều mọc phủ hết vùng da khảo sát (bảng 7). Vì thế cần đánh giá thêm tiêu chí độ dài lông trung bình giữa các nhóm để kết luận.

Đánh giá độ dài lông chuột: Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (Mean $\pm$ SEM). Số liệu được phân tích thống kê sử dụng phép kiểm Mann-Whitney với phần mềm SPSS 20. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$. Kết quả đo chiều dài lông chuột ở tuần 3 và tuần 4 được thể hiện ở bảng 8.

Bảng 8. Kết quả đo lông chuột ở thời điểm tuần 3 và tuần 4.

Lô	Nhóm	Loại thuốc	Chiều dài lông trung bình $\pm$ SEM (mm)	
			Tuần thứ 3	Tuần thứ 4
1	Nhóm 1	Tá dược 1	$8,8020 \pm 0,1746^{\#}$	$8,9380 \pm 0,1438^{\#}$
	Nhóm 2	Chứng bệnh	$8,6200 \pm 0,1647$	$9,0240 \pm 0,1562$
	Nhóm 3	Thành phẩm	$9,5660 \pm 0,1383^{**}$	$9,6780 \pm 0,1235^{*}$
2	Nhóm 1	Tá dược 2	$9,4340 \pm 0,1893^{\#}$	$9,3580 \pm 0,1627^{\#}$
	Nhóm 2	Chứng bệnh	$9,0340 \pm 0,1832$	$9,4060 \pm 0,1929$
	Nhóm 3	Minoxidil 2%	$9,9180 \pm 0,1704^{*}$	$10,8020 \pm 0,1560^{*}$
3	Nhóm 1	Minoxidil 2%	$9,5120 \pm 0,1358^{**}$	$9,7320 \pm 0,1511^{**}$
	Nhóm 2	Chứng bệnh	$8,3660 \pm 0,1324$	$8,9260 \pm 0,1346$
	Nhóm 3	Thành phẩm	$9,3280 \pm 0,1802^{**}$	$9,6800 \pm 0,1726^{**}$

*: $p < 0,05$ và **: $p < 0,01$ so với nhóm chứng trong cùng lô.

#: $p < 0,05$ và #: $p < 0,01$ so với nhóm khác nhóm chứng trong cùng lô.

Xét Lô 1 ở 2 thời điểm tuần 3 và tuần 4, chiều dài lông trung bình ở nhóm 1 và nhóm 2 không khác nhau, cho thấy tá dược 1 không có khả năng kích thích mọc lông. Bên cạnh đó, chiều dài lông trung bình ở nhóm 3 lớn hơn nhóm chứng và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả trên thể hiện khi sử dụng thành phẩm bột nhũ tương lông mọc dài hơn so với nhóm đối chứng không sử dụng. Điều này cho thấy thành phẩm có tác dụng kích thích mọc lông, và tác dụng này là do hoạt tính của các dược liệu có trong thành phẩm vì kết quả nhóm tá dược 1 không có khác biệt với nhóm chứng.

Xét Lô 2, nhóm minoxidil có chiều dài lông trung bình lớn hơn các nhóm chứng và nhóm tá dược 2 ($p < 0,05$), chứng tỏ mô hình có đáp ứng với Minoxidil 2%.

Xét Lô 3, nhóm 3 có lông mọc dài hơn so với lông ở nhóm chứng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Mặt khác, không có sự khác nhau về độ dài lông khi so sánh nhóm 1 với nhóm 3, chứng tỏ thành phẩm đang khảo sát có tác dụng kích thích mọc lông tương đương Minoxidil 2% đang lưu hành trên thị trường.

Kết quả đánh giá trên mô hình *in vivo* cho thấy thành phẩm bột nhũ tương từ dược liệu có khả năng kích thích mọc lông trên chuột. Đồng thời thành phẩm thể hiện khả năng kích thích mọc lông tương đương với sản phẩm Minoxidil

2% đang lưu hành trên thị trường. Bên cạnh đó, thử nghiệm cũng cho thấy khả năng kích thích mọc lông là do tác dụng của các dược liệu trong thành phẩm.

Kết luận

Công thức bột nhũ tương đã được xây dựng với tỷ lệ NLS:CAPB là 1:1 và 10% Cremophor RH 40. Khi đánh giá các chỉ tiêu chất lượng, công thức nhũ tương tạo bọt chứa cao chiết từ các dược liệu có màu nâu mờ, mùi thơm đặc trưng của cao dược liệu, pH 5,2, tỷ trọng nhũ tương 1,06, mật độ bọt được tạo ra 0,108 g/cm³, bền vững vật lý và cho phản ứng dương tính với FeCl₃. Khả năng kích thích mọc lông trên chuột của nhũ tương tạo bọt so với dung dịch Minoxidil 2% khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Với những kết quả đạt được, nhũ tương tạo bọt chứa dầu mè đen, các cao chiết Cỏ mực và Hồng hoa có thể được ứng dụng để kích thích mọc tóc ở người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.C. Carolyn (2003), "Alopecia in Women", *American Family Physician*, **67**(5), pp.1007-1014.
- [2] M. Kong, Y. Kim (2010), "Promotion Effect of Black Sesame Oil on Hair Growth in an Alopecia Model of C57BL/6 Mice", *Journal of Biomedical Research*, **11**(2), pp.103-116.
- [3] R.C. Rawal, et al. (2013), "Clinical evaluation of Hairbac tablet and oil in the management of diffuse hair loss: an open clinical study", *International Journal of Research Ayurveda Pharm.*, **4**(4), pp.564-569.

- [4] K. Datta, A.T. Singh, A. Mukherjee, B. Bhat, B. Ramesh, A.C. Burman (2009), "Eclipta alba extract with potential for hair growth promoting activity", *Journal of Ethnopharmacology*, **124**(3), pp.450-456.
- [5] S. Mondal, D. Ghosh, S. Ganapaty, M. Sushrutha (2016), "Preliminary phytochemical analysis and evaluation of hair growth stimulating potential of ethanol extract from *Eclipta alba* L. (Asteraceae) leaves in *Wistar albino* rats", *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2**(5), pp.121-127.
- [6] J. Junlatat, B. Sripanikulchai (2014), "Hair growth-promoting effect of *Carthamus tictorius* floret extract", *Phytotherapy Research*, **28**(7), pp.1030-1036.
- [7] N. Kumar, W. Rungseewijitprapa, N.A. Narkkhong, M. Suttajit, C. Chaiyasut (2012), "5 α -reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment", *Journal of Ethnopharmacology*, **139**(3), pp.765-771.
- [8] C.H. Purdon, J.M. Haigh, C. Surber and E.W. Smith (2003), "Foam drug delivery in dermatology", *American Journal of Drug Delivery*, **1**(1), pp.71-75.
- [9] Brazil National Health Surveillance Agency (2005), "Cosmetic Products Stability Guide", *Brazil National Health Surveillance Agency Press*, pp.16-17.
- [10] K. Klein (2004), "Evaluating shampoo foam", *Cosmetic and Toiletries*, **119**(10), pp.32-35.
- [11] M.S. Orasan, et al. (2016), "Hair loss and regeneration performed on animal models", *Clujul Medical*, **89**(3), pp.327-334.
- [12] T. Regupathi, K. Chitra, K. Ruckmani, K.G. Lalitha and Mohan Kumar (2017), "Formulation and evaluation of herbal hair gel for hair growth potential", *Journal of Pharmacology & Clinical Research*, **2**(2), pp.1-8.

Đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống sâm thu thập tại Lai Châu

Phạm Quang Tuyền^{1*}, Nguyễn Minh Đức², Khương Thị Bích², Nguyễn Thái Dương², Nguyễn Trường Khoa²,
Bùi Thanh Tân², Nguyễn Thị Hoài Anh¹, Trịnh Ngọc Bon¹, Trần Thị Kim Hương³, Trần Đăng Khánh², Khuất Hữu Trung²

¹Viện Nghiên cứu lâm sinh, Viện Khoa học lâm nghiệp Việt Nam

²Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam

³Sở Khoa học và Công nghệ Lai Châu

Ngày nhận bài 4/12/2017; ngày chuyển phản biện 8/12/2017; ngày nhận phản biện 9/1/2018; ngày chấp nhận đăng 19/1/2018

Tóm tắt:

Sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) là một loại dược liệu quý hiếm tại Việt Nam. Do bị khai thác quá mức, hiện nay sâm Lai Châu được liệt kê ở thứ hạng *Bị tuyệt chủng trầm trọng*. Chính vì thế, việc bảo tồn và phát triển loại dược liệu quý này không chỉ góp phần làm tăng số lượng của loài trong tự nhiên mà còn cần thiết để phát triển nguồn cây thuốc quý cung cấp cho nhu cầu của người dân. Đoạn trình tự gen ITS1-5.8S-ITS2 của 24 mẫu sâm Lai Châu thu thập tại Mường Tè, Lai Châu đã được giải trình tự để nghiên cứu sự đa dạng di truyền. Mức tương đồng di truyền của 24 mẫu sâm Lai Châu dao động trong khoảng 96,27 đến 100%. Dựa vào sự sai khác về trình tự gen ITS1-5.8S-ITS2 để nhận biết chính xác 24 nguồn gen của các mẫu sâm Lai Châu.

Từ khoá: Đa dạng di truyền, ITS (Internal Transcribed Spacer), *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, sâm Lai Châu.

Chỉ số phân loại: 3.4

Mở đầu

Chi sâm *Panax* L. gồm 15 loài và dưới loài, hầu hết chúng là nguồn dược liệu cho y học cổ truyền như các loại Nhân sâm, Nhân sâm Hoa Kỳ, Tam thất, Nhân sâm Nhật Bản và sâm Ngọc Linh. Sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) có tên gọi khác là Tam thất hoang Mường Tè, Tam thất rừng, Tam thất đen. Năm 2013, loài cây này đã được công bố phát hiện tại Lai Châu và đăng trên các tạp chí khoa học quốc tế uy tín, đồng thời đăng ký mẫu ADN vào Genbank. Tính đến năm 2016, diện tích phân bố tự nhiên của sâm Lai Châu đã giảm đáng kể, chỉ còn lại rất ít (cây phân bố rải rác) trong rừng rậm nguyên sinh chưa bị tác động hoặc tác động nhẹ thuộc vùng núi cao xã Pa Vệ Sủ, Ka Lăng, Thum Lũm và Tả Bạ thuộc huyện Mường Tè, tỉnh Lai Châu. Hiện nay, do bị khai thác vô tội vạ, sâm Lai Châu được liệt kê ở thứ hạng *Bị tuyệt chủng trầm trọng* (CR) vì đáp ứng các tiêu chí A2a,c,d; B2b(ii,iii,v); C2a(i); E (tiêu chuẩn của Liên minh Quốc tế bảo tồn thiên nhiên và tài nguyên thiên nhiên IUCN) [1].

Tại nhiều nước trên thế giới, việc sử dụng các chỉ thị phân tử trong phân loại chi *Panax* đã được triển khai và đạt được nhiều kết quả mang tính ứng dụng cao. Shim và cs (2003) [2] tiến hành phân biệt *P. ginseng* (Hàn Quốc) với các taxon *Panax* khác gồm Nhân sâm SheoAn (Trung Quốc), *P. notoginseng* (Trung Quốc), *P. japonicus* (Nhật Bản) và hai loại Nhân sâm thuộc loài *P. quinquefolius* từ Mỹ và Canada

được thu thập từ 6 vùng khác nhau bằng kỹ thuật RAPD. Thuận và cs (2010) [3] cũng đã sử dụng kỹ thuật RFLP với các môi khuếch đại các vùng rADN 18S và ITS cũng như kỹ thuật Random Amplified Microsatellite (RAMS) xác định được 4 loài là *P. ginseng*, *P. quinquefolius*, *P. notoginseng* và *P. vietnamensis*. Gần đây, Lee và cs (2011) [4] đã phát triển một chỉ thị SCAR dẫn xuất từ ISSR để nhận dạng các chủng giống sâm *P. ginseng* nhằm phân biệt các chủng nông nghiệp có đặc tính tốt phục vụ cho chọn giống, kết quả này là công cụ chỉ thị ADN hữu ích để xác định Nhân sâm Hàn Quốc (đặc biệt là chủng Sunwon), quản lý hạt giống và các chương trình chọn giống được hỗ trợ bằng chỉ thị phân tử. Tại Việt Nam, trước đây cũng đã có nghiên cứu về sử dụng chỉ thị phân tử để phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm và tam thất thu thập tại Lai Châu của tác giả Phan Kế Long và cs (2014) [5]. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) tạo thành nhánh riêng biệt và có mối quan hệ gần gũi với *Panax zingiberensis* và Tam thất trắng (*P. stipuleanatus*). Gần đây, Nguyen T.P. Trang và cs (2017) cũng ứng dụng ADN Barcoding để xác thực một số loài trong chi *Panax*, trong đó có sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu [6].

Trình tự ITS được sử dụng phổ biến cho các nghiên cứu phân tử ở thực vật nhằm xác định mối quan hệ giữa các loài gần gũi về nguồn gốc tiến hoá. Trong nghiên cứu này, chúng

*Tác giả liên hệ: Email: tuyen.phamsri@gmail.com

Genetic diversity of several ginseng plants collected in Lai Chau

Quang Tuyen Pham^{1*}, Minh Duc Nguyen², Thi Bich Khuong²,
Thai Duong Nguyen², Truong Khoa Nguyen²,
Thanh Tan Bui², Thi Hoai Anh Nguyen¹, Ngoc Bon Trinh¹,
Thi Kim Huong Tran³, Dang Khanh Tran², Huu Trung Khuat²

¹Silviculture Research Institute (SRI), VAFS

²Agricultural Genetics Institute, VAAS

³Department of Science and Technology Lai Chau

Received 4 December 2017; accepted 19 January 2018

Abstract:

Lai Chau Ginseng (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) is a medicinal plant which has recently been found in Lai Chau province, Vietnam. In this study, the internal transcribed spacer (ITS) markers were employed to investigate the genetic diversity and variability of 24 individual plants collected in Muong Te, Lai Chau. The ITS1-5.8S-ITS2 gene sequence of 24 samples of Lai Chau Ginseng was identified. The genetic similarities of them were ranged from 96.27 to 100%. This study may be useful information in quality control, propagation, cultivation and conservation of this medicinal plant.

Keywords: Genetic diversity, ITS, Lai Chau Ginseng, *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*.

Classification number: 3.4

tôi sử dụng trình tự ITS để đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống sâm Lai Châu phục vụ cho công tác tuyển chọn, bảo tồn và phát triển nguồn gen quý.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu là 24 mẫu giống sâm Lai Châu được thu thập ở các xã Pa Vệ Sừ và Thu Lũm thuộc huyện Mường Tè, tỉnh Lai Châu (bảng 1).

Hóa chất

Nghiên cứu sử dụng một số hóa chất thông dụng dùng trong sinh học phân tử của các hãng Sigma, Merck... như CTAB, Tris base, Boric acid, NaCl, dNTPs, EDTA, 6X orange loading dye solution, Taq Polymeraza, ethanol, 2-propanol, acetic acid glacial, phenol, chloroform, isoamylalcohol, agarose, các môi ITS (bảng 2).

Bảng 1. Danh sách 24 mẫu giống sâm Lai Châu.

STT	Ký hiệu ADN	Tên giống	Địa điểm thu thập
1	AS03	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
2	AS04	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
3	AS05	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
4	MX1	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
5	MX4	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
6	PT11	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
7	PT14	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
8	PT19	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
9	PT1	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
10	PT7	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
11	PT5	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
12	PX10	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
13	PX17	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
14	PX23	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
15	PX8	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
16	PX9	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
17	SLC10	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
18	SLC2	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
19	SLC3	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
20	SLC7	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
21	SLC9	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
22	PTPX4	Sâm Lai Châu tím	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
23	PTPX3	Sâm Lai Châu tím	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
24	PTPX2	Sâm Lai Châu tím	Pa Vệ Sừ - Mường Tè

Bảng 2. Danh sách các môi ITS.

TT	Trình tự nucleotide
ITS1	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG
ITS8	CACGCTTCTCCAGACTACA

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN tổng số: Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn phương pháp sử dụng CTAB của J. Doyle và L. Doyle (1987) [7] có một số cải tiến nhỏ để tiến hành tách chiết ADN từ các mẫu nghiên cứu.

Phản ứng PCR được thực hiện với dung tích 20 µl: Đệm

chứa 2 mM $MgCl_2$, 0,25 mM mỗi loại dNTP, 1U Taq DNA polymerase (Thermo Scientific), 0,2 μ M mỗi và khoảng 30 ng khuôn mẫu ADN và nước cất dùng cho PCR.

Chương trình chạy PCR: Các phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: 94°C (5 phút), 35 chu kỳ [94°C (1 phút), 59°C (45s), 72°C (50s)] và kết thúc ở 72°C (5 phút). Sau khi hoàn thành chương trình chạy PCR, sản phẩm PCR được bổ sung 4 μ l thuốc nhuộm rồi tiến hành điện di.

Phương pháp thổi gel theo kit Qiagen:

- Cắt lấy đoạn ADN mong muốn từ gel agarose, cho đoạn gel vừa cắt vào ống eppendorf 2 ml. Bổ sung buffer QG theo tỷ lệ 3:1.

- Ủ ở nhiệt độ 50°C trong khoảng 10 phút cho đến khi gel tan hoàn toàn.

- Cho dung dịch mẫu đã hoà tan ở trên vào cột QIAquick và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút.

- Bổ sung 500 μ l buffer QG vào cột QIAquick và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút để loại hết agarose dư thừa.

- Bổ sung 750 μ l buffer PE vào cột QIAquick, để cột thẳng đứng 5 phút sau đó ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút.

- Chuyển cột QIAquick sang ống microcentrifuge 1,5 ml sạch.

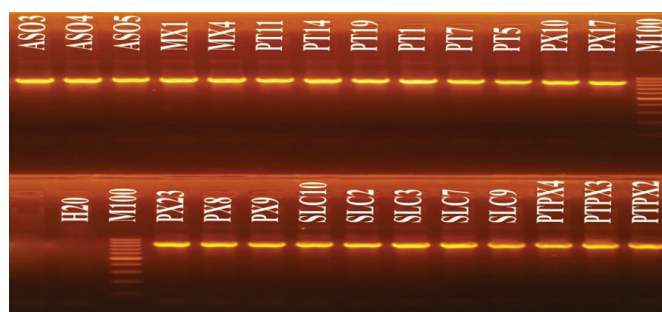
- Để hòa tan ADN, bổ sung 30 μ l nước (pH = 7-8,5) vào giữa màng của cột QIAquick và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút, thu lượng ADN tinh sạch.

Phương pháp giải trình tự: Sản phẩm PCR vùng ITS sau khi tinh sạch được đọc trình tự tại Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả giải trình tự được so sánh với các trình tự tương đồng trên NCBI. Sau đó các trình tự được tập hợp lại và phân tích bằng chương trình MEGA v6.0 và CLC v8.02 để tạo cây phát sinh loài.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phân tích các sản phẩm khuếch đại

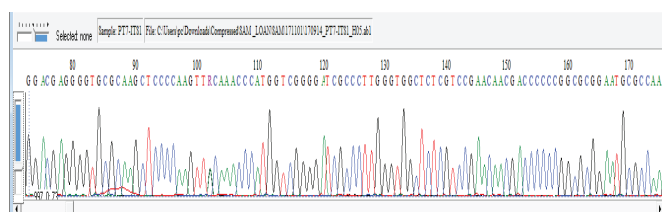
Sau khi thực hiện phản ứng PCR, sản phẩm khuếch đại với cặp mồi ITS1/ITS8 và được điện di trên gel agarose 1,5% cho băng đơn hình với kích thước khoảng 750 bp (hình 1). Sau khi khuếch đại sản phẩm PCR, chúng tôi tiến hành thổi gel bằng việc sử dụng cột QIAquick Spin Columns (USA) nhằm thu được sản phẩm PCR đặc hiệu.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/ITS8 trên 24 mẫu sâm Lai Châu với thang chuẩn Marker 100 bp và mẫu đối chứng trắng (H_2O).

Kết quả giải trình tự vùng ITS-rADN của các mẫu sâm Lai Châu nghiên cứu

Kích thước đoạn trình tự của các mẫu sâm Lai Châu: Sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/ITS8 (ITS1: *GGAAGGAGAAAGTCTGTAACAAGG* / ITS8: *CACGCTTCTCCAGACTACA*) sau khi tinh sạch được phân tích trực tiếp trên máy giải trình tự ABI PRISM 3100 DNA Analyzer (Applied Biotech) và phần mềm MEGA v6.0, kết quả cho ra giản đồ có các đỉnh (peak) với 4 màu sắc khác nhau tương ứng với 4 loại nucleotide và biểu thị dãy trình tự các nucleotide (hình 2). Kết quả đã thu được 24 đoạn trình tự ITS của 24 mẫu sâm Lai Châu với số nucleotide khác nhau trên từng mẫu giống.



Hình 2. Một đoạn giản đồ có các đỉnh với 4 màu sắc khác nhau tương ứng với 4 loại nucleotide của mẫu sâm Lai Châu PT7.

Vào năm 2012-2013, nhóm nghiên cứu của Phan Kế Long và cs đã tiến hành thu thập mẫu, giải trình tự *P. vietnamensis* tại Kon Tum và một taxon *Panax* tại Lai Châu, công bố trình tự vùng gen *matK* và ITS-rDNA (ITS1-5,8S và một phần ITS2) của taxon này lên Genbank và xác định đây là taxon *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* Komatsu, Zhu & Cai (<http://www.vast.ac.vn>). Trình tự ITS-rDNA mà các tác giả công bố là trình tự vùng ITS1-5,8S và một phần ITS2 có kích thước 588 bp.

Kết quả phân tích vùng ITS-rADN cho thấy, trình tự các nucleotide giữa các mẫu sâm Lai Châu có sự khác biệt nhau. Cụ thể, các mẫu giống nghiên cứu có tỷ lệ Guanin và Cytosine cao hơn tỷ lệ Adenine và Thymine, hay nói cách

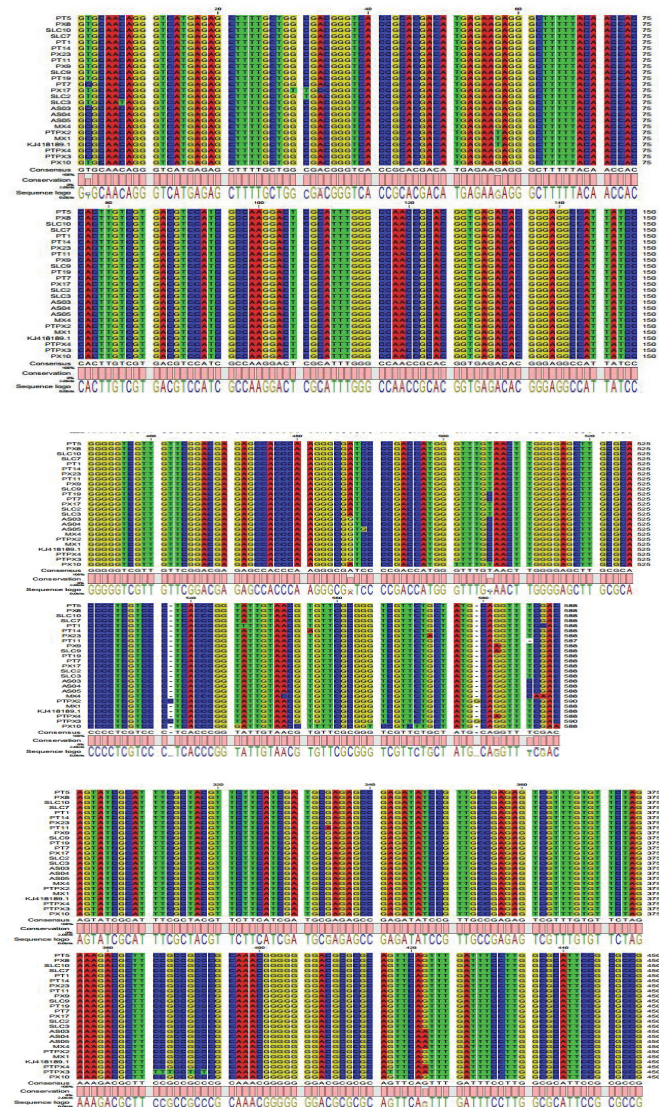
khác là đều có thành phần %GC cao hơn thành phần %AT. Mẫu AS03, AS04, AS05 đều có thành phần GC cao nhất (59,9%) và có thành phần TA (40,1%) thấp hơn. Tỷ lệ thành phần %GC trung bình ở cả 24 mẫu nghiên cứu là 59,3% và tỷ lệ thành phần %AT trung bình 40,7% (bảng 3).

Bảng 3. Thành phần bốn loại nucleotide của các mẫu giống nghiên cứu.

Mẫu giống	Tỷ lệ (%)						Tổng số nucleotide
	T(U)	C	A	G	GC	AT	
AS03	21,8	29,3	18,4	30,6	59,9	40,1	588
AS04	21,8	29,3	18,4	30,6	59,9	40,1	588
AS05	21,8	29,1	18,4	30,8	59,9	40,1	588
MX4	21,8	29,3	18,5	30,4	59,7	40,3	588
PT1	22,4	28,9	18,4	30,3	59,2	40,8	588
PT11	22,1	28,8	18,7	30,3	59,1	40,9	587
PT14	22,1	28,7	18,7	30,4	59,2	40,8	588
PT19	22,1	28,9	18,5	30,4	59,4	40,6	588
PT5	22,3	28,7	18,5	30,4	59,2	40,8	588
PT7	21,9	29,1	18,7	30,3	59,4	40,6	588
PTPX2	22,0	29,2	18,3	30,5	59,7	40,3	590
PTPX3	22,9	28,6	18,3	30,2	58,8	41,2	590
PTPX4	21,9	29,1	18,5	30,4	59,5	40,5	588
PX10	22,4	28,9	18,7	29,9	58,8	41,2	588
PX17	22,6	28,7	18,4	30,3	59,0	41,0	588
PX23	22,3	28,7	18,7	30,3	59,0	41,0	588
PX8	22,3	28,7	18,5	30,4	59,2	40,8	588
PX9	22,3	28,7	18,7	30,3	59,0	41,0	588
SLC10	22,3	28,7	18,5	30,4	59,2	40,8	588
SLC2	22,6	28,4	18,5	30,4	58,8	41,2	588
SLC3	22,6	28,4	18,5	30,4	58,8	41,2	588
SLC9	22,3	28,7	18,7	30,3	59,0	41,0	588
MX1	22,1	29,1	18,2	30,6	59,7	40,3	588
SLC7	22,3	28,7	18,5	30,4	59,2	40,8	588
KJ418189.1*	22,1	29,1	18,2	30,6	59,7	40,3	588
Trung bình	22,2	28,9	18,5	30,4	59,3	40,7	588,1

*: Trình tự tương ứng của sâm Lai Châu được lấy từ Genbank với mã truy cập là KJ418189.1.

Kết quả so sánh trình tự nucleotid vùng ITS-rADN của các mẫu sâm Lai Châu: Trình tự đoạn ITS-rADN của 24 mẫu sâm Lai Châu sau khi đã xác định được đem so sánh với nhau. Phép so sánh giống hàng được thực hiện bằng phần mềm Megav6.0 và CLC v8.02. Kết quả được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Kết quả giống hàng, giống cột 24 trình tự ITS-rADN của sâm Lai Châu.

Kết quả hình 3 cho thấy, sự khác biệt giữa các trình tự chủ yếu là các vị trí đa hình đơn (SNP), trong đó 1 nucleotide bị thay thế bởi một nucleotide khác, bên cạnh đó cũng có rất nhiều khoảng trống giữa các trình tự. Điều này có thể là do hệ quả sự biến động theo hướng mất và tăng thêm (deletion và insertion) một hay một số nucleotide trong trình tự vùng ITS-rADN của các mẫu sâm Lai Châu khảo sát. 24 mẫu sâm Lai Châu được nghiên cứu có sự khác biệt rất ít về trình tự vùng ITS-rADN, sự biến động trình tự giữa các mẫu thể hiện rõ nhất ở khoảng 200 nucleotide đầu và 200 nucleotide cuối. Do vậy dẫn đến sự khác biệt về trình tự đoạn ADN thu được.

Thực hiện so sánh từng cặp bằng công cụ BLAST thu được hệ số tương đồng trình tự vùng ITS-rADN giữa 24 mẫu sâm Lai Châu nghiên cứu. Kết quả ma trận nhận dạng trình tự được thể hiện ở bảng 4.

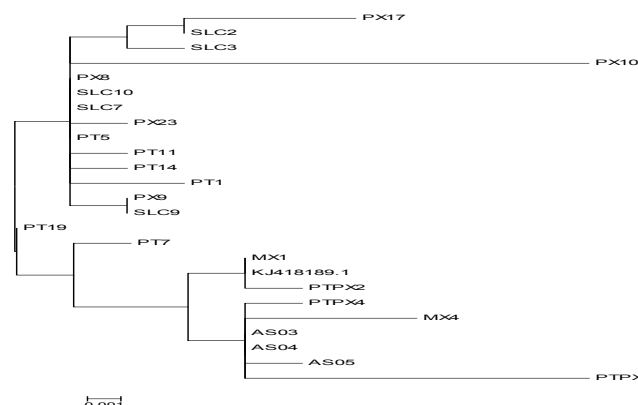
Bảng 4. Hệ số tương đồng và khoảng cách di truyền trình tự vùng ITS-rADN giữa 24 mẫu sâm Lai Châu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
PT5	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT6	2	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC10	3	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC7	4	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT1	5	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
PT14	6	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT3	7	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT11	8	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT14	9	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC9	10	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT19	11	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT12	12	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT7	13	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC2	14	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC3	15	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AS03	16	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AS04	17	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AS05	18	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MX4	19	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PTP3	20	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00	0,00
MX1	21	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00	0,00
KJ418189.1	22	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1	0,00	0,00
PTP4	23	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	1
PTP2	24	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80
PT3	25	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47	98,47

Kết quả bảng 4 cho thấy, có sự tương đồng cao giữa 24 trình tự của 24 mẫu sâm Lai Châu, hệ số tương đồng cao nhất là 100%, còn hệ số thấp nhất là 96,27%; khoảng cách di truyền gần nhất là 0,00 và xa nhất là 0,03.

Cây phân loại trình tự ITS-rADN của 24 mẫu sâm Lai Châu

Sau khi xác định được trình tự nucleotide vùng ITS-rADN tiến hành dựng cây phân loại. Kết quả thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Cây phân loại 24 mẫu sâm Lai Châu dựa trên so sánh trình tự ITS-rADN.

Kết quả nghiên cứu mối quan hệ họ hàng của các mẫu sâm thu được ở Lai Châu với các loài/thứ trong cùng chi trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS-rADN (hình 4) bằng phương pháp Maximum Likelihood đều cho thấy, các mẫu sâm thu ở Lai Châu nằm trong hai nhóm. Nhóm 1, gồm 10 trình tự vùng ITS-rADN của các mẫu: PT19, PT7, MX1, PTP2, PTP4, MX4, AS03, AS04, AS05, PTP3 và trình tự sâm Lai Châu được lấy từ Genbank với mã truy cập là KJ418189.1 cũng thuộc nhóm này. Nhóm 2, gồm trình tự vùng ITS-rADN của 14 mẫu còn lại: PX17, SLC2, SLC3, PX10, PX8, SLC10, SLC7, PX23, PT5, PT11, PT14, PT1, PX9 và SLC9.

AS04, AS05, PTPX3 và trình tự sâm Lai Châu được lấy từ Genbank với mã truy cập là KJ418189.1 cũng thuộc nhóm này. Nhóm 2, gồm trình tự vùng ITS-rADN của 14 mẫu còn lại: PX17, SLC2, SLC3, PX10, PX8, SLC10, SLC7, PX23, PT5, PT11, PT14, PT1, PX9 và SLC9.

Kết quả nghiên cứu đã xác định được trình tự nucleotide vùng ITS-rADN của 24 mẫu sâm Lai Châu. Kích thước vùng ITS dao động từ 587 đến 590 bp và tỷ lệ % (G+C) dao động từ 58,8 đến 59,9%, trung bình là 59,3%. Với kết quả thu được như vậy thì 24 mẫu sâm Lai Châu nghiên cứu có kết quả tương tự như kích thước và tỷ lệ thành phần (G+C) vùng ITS của nhiều loài thực vật hạt kín đã được công bố. Việc xác định trình tự và sử dụng trình tự nucleotide đoạn ITS-rADN để so sánh nhằm tìm ra mối quan hệ tiến hóa giữa các loài hoặc sự đa dạng di truyền của các cá thể trong cùng một loài đã được sử dụng phổ biến từ lâu trên thế giới.

Kết luận

Kết quả phân tích về quan hệ phát sinh giữa 24 mẫu sâm Lai Châu nghiên cứu và taxon cùng chi với đối tượng nghiên cứu có quan hệ với *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, trên vùng bảo tồn ITS1-5,8S rDNA-ITS2 hay vùng gen ITS-rADN. Mức tương đồng di truyền của 24 mẫu này dao động trong khoảng 96,27 đến 100%.

Sau khi xác định được các mẫu sâm Lai Châu *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* thu thập tại Mường Tè, việc sử dụng trình tự vùng ITS1-5,8S rDNA-ITS2 cho phép phân biệt các sự khác biệt được khảo sát và cũng thể hiện rõ mối quan hệ phát sinh giữa taxon này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] <https://www.iucn.org/>.
- [2] Y.H. Shim, et al. (2003), "Molecular Differentiation of *Panax* Species by RAPD Analysis", *Archives of Pharmacol Research*, **26**(8), pp.601-605.
- [3] Nguyễn Thanh Thuận, Vũ Thanh Thảo, Nguyễn Văn Thanh, Trần Cát Đông (2010), "Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để xác định một số loài sâm thuộc chi *Panax*", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, **14**(1), tr.129-133.
- [4] J.W. Lee, et al. (2011), "Development of an ISSR-Derived SCAR Marker in Korean Ginseng Cultivars (*Panax ginseng* C.A. Meyer)", *Journal of Ginseng Research*, **35**(1), pp.52-59.
- [5] Phan Kế Long, Vũ Đình Duy, Phan Kế Lộc, Nguyễn Giang Sơn, Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thị Mai Linh, Lê Thanh Sơn (2014), "Mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng Matk và ITS-rADN", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **12**(2), tr.327-337.
- [6] Nguyen T.P. Trang, Nguyen T.H. Mai, Yuri N. Zhuravlev (2017), "Application of DNA Barcoding to Authentic *Panax Vietnamensis*", *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*, **29**(1), pp.60-67.
- [7] J.J. Doyle, J.L. Doyle (1987), "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue", *Phytochemical Bulletin*, **19**, pp.11-15.

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng cadimi và chì trong đất đến khả năng sinh trưởng và hấp thu các kim loại này của cây cỏ màn trâu (*Eleusine indica* L.)

Phạm Thị Mỹ Phương^{1,2*}, Đoàn Văn Tú¹, Nguyễn Mạnh Khải², Đặng Thị Kim Chi³

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Ngày nhận bài 8/12/2017; ngày chuyển phản biện 19/12/2017; ngày nhận phản biện 24/1/2018; ngày chấp nhận đăng 31/1/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng cadimi (Cd) và chì (Pb) trong đất đến khả năng sinh trưởng và hấp thu các kim loại này của cây cỏ màn trâu (*Eleusine indica* L.) đồng thời xác định được khả năng loại bỏ chúng ra khỏi đất chuyên canh rau sau 3 tháng thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cây cỏ màn trâu sinh trưởng và phát triển được trong môi trường đất canh tác bị ô nhiễm Cd và Pb. Với hàm lượng Cd trong đất khoảng 50-200 mg/kg thì hàm lượng Cd tích lũy trong phần thân lá đạt $75,61 \pm 3,12$ đến $195,21 \pm 4,20$ mg/kg, trong rễ đạt $365,09 \pm 10,11$ đến $482,08 \pm 20,51$ mg/kg và khả năng loại bỏ Cd ra khỏi đất của cây tương đối cao, đạt 2,883-2,973 mg/cây. Hàm lượng Pb trong đất khoảng 1.500-3.000 mg/kg, khả năng tích lũy Pb trong thân lá đạt $149,25 \pm 7,23$ đến $189,60 \pm 8,19$ mg/kg và trong rễ đạt $1.332,65 \pm 13,16$ đến $2.754,6 \pm 25,34$ mg/kg, khả năng loại bỏ Pb ra khỏi đất của cây cao, đạt 14,01-14,36 mg/cây.

Từ khóa: Cây cỏ màn trâu, Cd, Pb, tích lũy.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Hiện nay, bên cạnh việc phát triển kinh tế - xã hội thì hệ lụy mà nó đưa lại cho môi trường cũng rất nặng nề. Cùng với ô nhiễm môi trường nước, ô nhiễm không khí thì tình trạng ô nhiễm đất và thực phẩm đang là vấn đề thời sự, được các nhà khoa học trong và ngoài nước cũng như toàn xã hội rất quan tâm [1].

Nguyên nhân của tình trạng này một phần là do tình trạng khai thác khoáng sản nhưng không có biện pháp xử lý đồng bộ dẫn đến hậu quả ô nhiễm kim loại nặng (KLN), một phần do chạy theo lợi nhuận và sự kém hiểu biết của người dân nên việc sử dụng không hợp lý các nguồn nước thải để tưới cây trong nông nghiệp, sử dụng phân bón vô cơ, các hóa chất bảo vệ thực vật vượt quá mức cho phép dẫn đến ô nhiễm môi trường.

Để xử lý tình trạng này, có các phương pháp vật lý, hóa học và sinh học, mỗi phương pháp có những ưu, nhược điểm khác nhau. Trong đó, phương pháp sinh học hiện đang được quan tâm nhiều, đặc biệt là việc sử dụng thực vật để tách chiết, cô lập hoặc khử độc các chất ô nhiễm thông qua quá trình hóa - lý - sinh. Công nghệ này vừa xử lý ô nhiễm hiệu quả, thân thiện với môi trường vừa có chi phí thấp [1].

Trên thế giới, việc ứng dụng thực vật để xử lý ô nhiễm KLN trong môi trường đã đạt được nhiều thành tựu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn [2, 3]. Thống kê cho thấy, có khoảng 400 loài cây có khả năng siêu tích lũy KLN [4]. Ở Việt Nam, việc nghiên cứu dùng thực vật trong xử lý đất và nước bị ô nhiễm cũng đã được nghiên cứu ở nhiều địa phương như Thái Nguyên, Hưng Yên, Hà Nội... [1, 5]. Tuy nhiên, các nghiên cứu đã tiến hành chủ yếu tập trung vào các vùng đất khai thác khoáng sản, nơi có mức độ ô nhiễm cao, mà chưa có nhiều nghiên cứu nhằm cải tạo đất trồng rau, nơi mà việc ô nhiễm sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến sản phẩm của nó, từ đó ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá khả năng hấp thu Cd và Pb của loại thực vật bản địa, cây cỏ màn trâu (*Eleusine indica* L.), thuộc vùng trồng rau thành phố Thái Nguyên và tìm hiểu khả năng ứng dụng loài thực vật này trong việc xử lý ô nhiễm Cd và Pb trong đất nông nghiệp. Đây là một loại cây thuộc chi *Eleusine Gaertn*, họ lúa *Poaceae*, cây cao 15-90 cm, mùa ra hoa từ tháng 3-11. Cây cỏ màn trâu là loài cỏ nhiệt đới, mọc phổ biến ở nhiều nơi, thường gặp ở bờ ruộng, ven đường, bãi hoang, có thời gian sinh trưởng ngắn (3-4 tháng) nhưng nó là cây được xếp trong danh mục các loại cây siêu tích tụ Pb ở trên thế giới [1].

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

Study of the affect of cadmium and lead concentrations in soil to the growth and accumulation of these metals in *Eleusine indica* L.

Thi My Phuong Pham^{1,2*}, Van Tu Doan¹,
Manh Khai Nguyen², Thi Kim Chi Dang³

¹Institute of Regional Research and Development, Ministry of Science and Technology

²University of Science, Vietnam National University, Hanoi

³Hà Nội University of Science and Technology

Received 8 December 2017; accepted 31 January 2018

Abstract:

This study evaluated cadmium (Cd) and lead (Pb) accumulation by *Eleusine indica* L. plants grown in soil with different Cd and Pb concentrations in 3 months to assess the affect of the metal concentrations in soil to the plant's remediating ability to grow in Cd- and Pb-contaminated soil for phytoremediation purpose. At the Cd concentration in soil of 50-200 mg/kg, the cumulative Cd content in leaves of *Eleusine indica* L. was from 75.61±3.12 mg/kg to 195.21±4.20 mg/kg; that in root was from 365.09±10.11 mg/kg to 482.08±20.51 mg/kg; and its ability to remove Cd reached a peak of 2.883-2.973 mg/plant. At the Pb concentration in soil of 1,500-3,000 mg/kg, the ability of Pb accumulation in the leaves was from 149.25±7.23 mg/kg to 189.60±8.19 mg/kg, and the Pb accumulation capacity in roots was from 1,332.65±13.16 mg/kg to 2,754.6±15.34 mg/kg. The capability of removing Pb from the soil was high, reached 14.01-14.36 mg/plant.

Keywords: Accumulation, cadmium, *Eleusine indica* L., lead.

Classification number: 4.1

Đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

- Đất thí nghiệm được lấy từ vùng trồng rau thuộc phường Túc Duyên, thành phố Thái Nguyên.

- Cây cỏ mần trầu (*Eleusine indica* L.): Khả năng sinh trưởng (sinh khối) của cây sau 3 tháng trồng trong đất có bổ sung Cd và Pb ở các nồng độ khác nhau.

- Hàm lượng Cd và Pb: Hàm lượng Cd và Pb mà cây cỏ mần trầu hấp thu được ở các nồng độ Cd và Pb bổ sung vào đất khác nhau.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Đất dùng trong thí

nghiệm là đất được lấy từ vùng trồng rau thuộc địa phận phường Túc Duyên, thành phố Thái Nguyên. Đất lấy ở tầng mặt 0-20 cm, làm tơi, loại bỏ xác thực vật, đá và các vật cứng, sau đó trộn đều. Hàm lượng Cd và Pb bổ sung ở các công thức thí nghiệm là riêng rẽ.

- Bổ sung Cd: Thí nghiệm được bố trí với 4 công thức. Lượng Cd bổ sung vào các chậu thí nghiệm dưới dạng $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ với các hàm lượng khác nhau để thiết lập các công thức.

Công thức đối chứng (ĐC): Đất được lấy từ vùng trồng rau của phường Túc Duyên không bổ sung Cd.

Công thức 1 (CT1), 2 (CT2), 3 (CT3), 4 (CT4), với các hàm lượng Cd được bổ sung tương ứng ở các mức là 25, 50, 100, 200 mg Cd^{2+} /kg đất, bằng cách: Hòa tan 13,75 g $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bằng nước cất, sau đó định mức đến 500 ml ta được nồng độ dung dịch A có Cd^{2+} là 10.000 mg/l. Tiến hành phối trộn với đất thí nghiệm bằng cách lấy các thể tích dung dịch A khác nhau là 2,5; 5; 10; 20 ml tương ứng với các công thức CT1; CT2; CT3; CT4. Sau đó, các thể tích dung dịch A trên được định mức bằng nước cất tới vạch 50 ml để đảm bảo sự đồng đều về độ ẩm của đất trong các trường hợp tương ứng mỗi công thức.

- Bổ sung Pb: Thí nghiệm được bố trí với 5 công thức. Lượng Pb bổ sung vào các chậu thí nghiệm dưới dạng $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ với các hàm lượng khác nhau để thiết lập các công thức.

Công thức đối chứng (ĐC): Đất được lấy từ vùng trồng rau của phường Túc Duyên không bổ sung Pb.

Công thức 1 (CT1), 2 (CT2), 3 (CT3), 4 (CT4), 5 (CT5) với các hàm lượng Pb được bổ sung tương ứng ở các mức là 500, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000 mg Pb^{2+} /kg đất, bằng cách: Hòa tan 159,92 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ bằng nước cất và định mức đến 1.000 ml ta được dung dịch B có nồng độ Pb^{2+} là 100.000 mg/l. Tiến hành phối trộn với đất thí nghiệm bằng cách lấy các thể tích dung dịch B khác nhau là 5; 10; 15; 20; 30 ml tương ứng với các công thức CT1; CT2; CT3; CT4; CT5. Sau đó, các thể tích dung dịch B trên được định mức bằng nước cất tới vạch 50 ml để đảm bảo sự đồng đều về độ ẩm của đất trong các trường hợp tương ứng mỗi công thức.

Đất sau khi được trộn kim loại sẽ được ủ trong 1 tuần trước khi đặt thí nghiệm. Mỗi công thức được lặp lại 6 lần, cây được trồng 3 tháng. Mỗi chậu thí nghiệm chứa 1 kg đất khô không khí, mỗi chậu trồng 1 cây. Cây được trồng trong chậu thí nghiệm là cây con được gieo từ hạt, tương đồng nhau về chiều cao. Cây cỏ mần trầu dài khoảng 5 cm, cây chia thành 3 nhánh nhỏ.

Phương pháp phân tích trong phòng thí nghiệm: Phương pháp được sử dụng để phân tích các chỉ tiêu trong đất như sau: pH_{KCl} - xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 5979:2007, được đo bằng máy pH meter MI151 của hãng Martini (Rumani); đạm tổng số (N) - xác định theo Tiêu

chuẩn Việt Nam TCVN 6498:1999; lân tổng số (P_2O_5) - xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8940:2011; kali tổng số (K_2O) - xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8660:2011; dung tích trao đổi cation (mg đương lượng/100 g đất) CEC - xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8568:2010; thành phần cơ giới - xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8567:2010; chất hữu cơ (OM) - xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 6644:2000; asen tổng số - xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8467:2010; Pb và Cd tổng số - xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 6496B:2009.

Xác định hàm lượng Pb và Cd trong cây: Các cây được lấy đem về phòng thí nghiệm rửa sạch, phân ra phần lá, thân và phần gốc, rễ. Sấy khô các mẫu trong tủ sấy ở nhiệt độ $60^\circ C$ trong 2 ngày, sau đó tán nhỏ và trộn đều.

Phân hủy mẫu bằng thiết bị phá mẫu vi sóng để phân tích KLN như sau: Cân mỗi mẫu khô 0,20 g, cho vào ống phá mẫu, thêm 10 ml HNO_3 65%, lắc hỗn hợp này và đợi ít nhất 20 phút trước khi đóng nút. Gia nhiệt lên $170^\circ C$ trong 20 phút, giữ tiếp mẫu ở nhiệt độ này trong vòng 45 phút, sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng. Toàn bộ hỗn hợp sau phân hủy được thêm nước, lắc đều, lọc qua giấy lọc băng xanh và định mức đến 100 ml. Hàm lượng KLN trong dịch lọc được xác định trên máy AAS. Xác định Pb tổng số theo TCVN 7766: 2007; xác định Cd tổng số theo TCVN 7768: 2007. Các thí nghiệm đều được tiến hành với mẫu trắng và mẫu lặp để đánh giá sự nhiễm bẩn do hóa chất và môi trường xung quanh cũng như độ lặp lại của phương pháp. Kiểm tra hiệu suất thu hồi của quá trình phá mẫu bằng mẫu thêm chuẩn.

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được tổng hợp, phân tích và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

Các chỉ tiêu theo dõi: Sinh khối của cây, khả năng hấp thu Pb và Cd trong các bộ phận của cây.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng Cd trong đất đến sinh khối và khả năng tích lũy Cd của cây cỏ mần trầu

Kết quả phân tích mẫu đất được sử dụng trong nghiên cứu thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Một số tính chất đất ban đầu trước khi sử dụng trong nghiên cứu.

pH	OM (%)	CEC (mg đương lượng/100 g đất)	N (%)	P_2O_5 (%)	K_2O (%)	Thành phần cơ giới đất	As tổng số (mg/kg)	Pb tổng số (mg/kg)	Cd tổng số (mg/kg)
4,8	1,62	9,62	0,141	0,105	0,76	Thịt nhẹ	5,13	145,02	2,58

Nhìn chung, đất dùng trong nghiên cứu là đất hơi chua, có hàm lượng chất hữu cơ, dung tích hấp thu ở mức trung bình; thành phần cơ giới (TPCG) là thịt nhẹ; hàm lượng N,

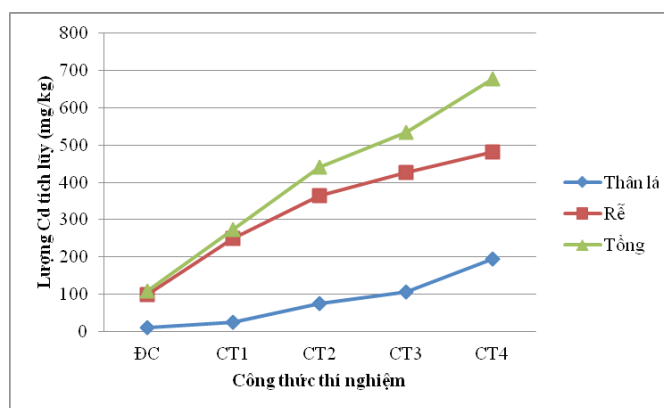
P_2O_5 ở mức trung bình, trong khi đó kali dễ tiêu lại thấp. Bảng 1 cho thấy, hàm lượng Pb tổng số ($Pd_{ts} = 145,02$ mg/kg) và Cd tổng số ($Cd_{ts} = 2,58$ mg/kg) vượt giới hạn cho phép của KLN trong đất nông nghiệp theo QCVN 03:2015/ BTNMT của Bộ Tài nguyên và Môi trường.

Kết quả nghiên cứu thu được khả năng sinh trưởng và tích lũy Cd của cây cỏ mần trầu được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của hàm lượng Cd trong đất đến sinh khối và khả năng tích lũy Cd của cây cỏ mần trầu.

Công thức	Sinh khối (g)			Tích lũy (mg/kg)		Lượng Cd tích lũy trong cây (mg)
	Thân lá	Rễ	Tổng	Thân lá	Rễ	
ĐC	17,29±1,51	6,25±0,71	23,54±2,01	9,93±0,71	98,87±2,11	0,789
CT1	15,20±1,33	5,22±0,63	20,42±1,81	24,05±2,52	250,08±5,52	1,671
CT2	14,86±0,93	4,82±0,41	19,78±1,02	75,61±3,12	365,09±10,11	2,883
CT3	10,53±0,72	4,29±0,40	14,82±1,71	107,12±3,61	426,05±13,52	2,956
CT4	7,13±0,23	3,28±0,3	10,41±0,51	195,21±4,20	482,08±20,51	2,973

Ở tất cả các công thức thí nghiệm, cây cỏ mần trầu vẫn phát triển được và tăng sinh khối, tuy nhiên với hàm lượng Cd bổ sung khác nhau thì sinh khối của cây cỏ mần trầu cũng khác nhau, cụ thể: Ở công thức ĐC sinh khối đạt $23,54 \pm 2,01$ g/cây, khi bổ sung thêm Cd vào đất với hàm lượng 25 mg/kg (CT1) thì sinh khối của cây là $20,42 \pm 1,81$ g/cây, giảm còn 86,75% so với ĐC. Nếu tiếp tục tăng hàm lượng Cd lên 50-200 mg/kg thì sinh khối của cây giảm xuống còn 84,03-44,22% so với ĐC. Điều này chứng tỏ Cd là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của cây. Tuy nhiên, với hàm lượng Cd không quá cao thì cũng không ảnh hưởng nhiều đến sinh khối của cây, cụ thể như ở CT1 và CT2 sinh khối của cây tương ứng là $20,42 \pm 1,81$ g/cây và $19,78 \pm 1,02$ g/cây.



Hình 1. Ảnh hưởng của hàm lượng Cd trong đất đến lượng tích lũy Cd trong thân và rễ cây cỏ mần trầu.

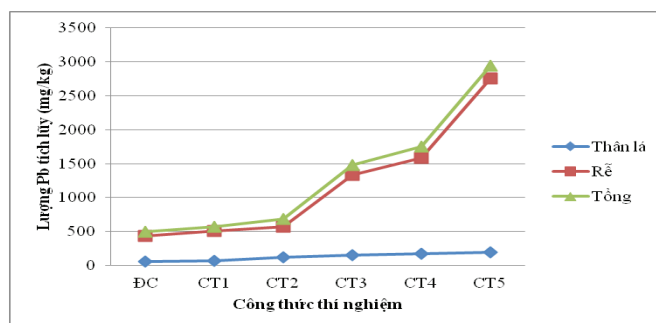
Từ bảng 2 và hình 1 cho thấy, hàm lượng Cd được bổ sung tăng lên thì khả năng tích lũy Cd trong cây cỏ mần trầu tăng lên thể hiện ở cả thân và rễ. Ở CT1 hàm lượng Cd tích

lũy trong thân tăng 2,4 lần so với ĐC thì ở CT2 là 7,6 lần, CT3 là 10,8 lần và CT4 là 19,7 lần. Tương tự đối với rễ, khả năng hấp thu và tích lũy Cd ở các CT1, CT2, CT3 và CT4 tăng tương ứng so với ĐC tương ứng là 2,5; 3,7; 4,3 và 4,9 lần. Tuy nhiên, khả năng loại bỏ Cd ra khỏi đất ở các công thức CT2, CT3, CT4 khác nhau không nhiều, tương ứng là 2,883; 2,956; 2,973 mg Cd/cây. Điều này có thể lý giải vì ở CT2 sinh khối của cây cỏ màn trâu là khá cao (19,78±1,02 g/cây) nên khả năng tích lũy Cd trong thân và rễ tuy không phải là cao nhất so với các công thức khác nhưng khả năng loại bỏ Cd ra khỏi đất là cao nhất. Còn ở các công thức CT3, CT4, mặc dù khả năng tích lũy Cd cao trong cả phần thân lá và phần rễ nhưng do lượng Cd bổ sung vào đất cao nên hạn chế sự phát triển của cây do đó sinh khối giảm, lượng Cd cây lấy ra khỏi đất không cao.

Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng Pb trong đất đến sinh khối và khả năng tích lũy Pb của cây cỏ màn trâu

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng Pb trong đất đến sinh khối và khả năng tích lũy Pb của cây cỏ màn trâu.

CT	Sinh khối (g)			Tích lũy (mg/kg)		Lượng Pb tích lũy trong cây (mg)
	Thân lá	Rễ	Tổng	Thân lá	Rễ	
ĐC	17,29±2,78	6,25±1,12	23,54±3,12	58,7±3,11	435,31±5,24	3,74
CT1	18,78±2,81	6,45±1,01	25,23±4,23	64,78±5,13	505,84±9,14	4,48
CT2	24,23±2,83	10,20±1,45	34,38±5,22	115,72±7,12	567,27±11,13	8,59
CT3	23,18±2,34	7,94±1,32	31,12±4,27	149,25±7,23	1332,65±13,16	14,04
CT4	19,87±2,16	6,68±1,23	26,55±3,16	172,95±8,17	1582,92±14,13	14,01
CT5	12,53±1,53	4,35±0,87	16,88±1,17	189,60±8,19	2754,60±25,34	14,36



Hình 2. Ảnh hưởng của hàm lượng Pb trong đất đến lượng tích lũy Pb trong thân lá và rễ cây cỏ màn trâu.

Kết quả thí nghiệm được tổng hợp ở bảng 3 cho thấy, sinh khối của cây cỏ màn trâu tập trung chủ yếu ở phần trên mặt đất, ở CT2 cây cho sinh khối lớn nhất (34,38±5,22 g/cây), tăng 46,05% so với ĐC. Ở CT5 khi hàm lượng Pb bổ sung vào trong đất 3.000 mg/kg thì sinh khối cây giảm 28,29% so với ĐC.

Khả năng hấp thu Pb ở rễ của cây cỏ màn trâu lớn hơn ở phần thân lá, cụ thể ở dao động từ 7,8 lần (CT1) đến 14,5 lần

(CT5). Nhìn chung, khả năng hấp thu Pb của cây tăng khi hàm lượng Pb trong đất tăng. Khi bổ sung 3.000 mg Pb²⁺/kg đất (CT5) thì khả năng tích lũy Pb trong thân lá và rễ cao nhất, tương ứng là 189,60±8,19 mg/kg và 2.754,60±25,34 mg/kg, lượng Pb mà cây lấy ra được khỏi đất lại là cao nhất, đạt 14,36 mg/cây. Tuy nhiên, khi hàm lượng Pb bổ sung vào đất tăng thì sinh khối của cây giảm xuống, do đó lượng Pb mà cây lấy ra khỏi đất ở các công thức CT3, CT4, CT5 sai khác nhau không nhiều, tương ứng là 14,04; 14,01; 14,36 mg/cây.

Kết luận

Qua thử nghiệm trên, chúng tôi rút ra được một số kết luận như sau:

- Cây cỏ màn trâu đều sinh trưởng và phát triển được trong môi trường đất canh tác bị ô nhiễm Cd và Pb. Tuy nhiên, với hàm lượng Cd và Pb bổ sung khác nhau thì sinh khối của cây cỏ màn trâu cũng khác nhau. Nếu bổ sung vào đất 200 mg Cd²⁺/kg đất và 3.000 mg Pb²⁺/kg đất thì sinh khối cây giảm tương ứng là 44,22% và 28,29% so với đối chứng.

- Hiệu quả loại bỏ Cd và Pb của cây cỏ màn trâu và khả năng tích lũy Cd và Pb ở rễ cao hơn ở phần thân lá. Khi bổ sung Cd vào đất nhiều thì lượng Cd tích lũy trong rễ và trong thân lá đều tăng. Tuy nhiên, khi hàm lượng Cd cao quá thì khả năng loại bỏ Cd ra khỏi môi trường đất của cây tăng không đáng kể. Với hàm lượng Cd bổ sung là 100, 200 mg Cd²⁺/kg đất thì khả năng loại bỏ Cd ra khỏi môi trường đất ở các công thức không có sự sai khác nhiều, tương ứng là 2,956; 2,973 mg Cd/cây. Khả năng loại bỏ Pb lớn nhất ở công thức bổ sung 3.000 mg Pb²⁺/kg đất (CT5), đạt 14,36 mg/cây. So với công thức bổ sung 1.500, 2.000 mg Pb²⁺/kg đất thì lượng Pb cây lấy ra được khỏi đất ở CT5 tăng không đáng kể. Như vậy, đối với đất ô nhiễm Cd hoặc Pb thì cây cỏ màn trâu có thể được sử dụng như một giải pháp hiệu quả, an toàn để xử lý đất ô nhiễm Cd hoặc Pb tương ứng ở mức khoảng 50-200 mg/kg và 1.500-3.000 mg/kg.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đặng Đình Kim, Lê Đức, Trần Văn Tựa, Bùi Thị Kim Anh, Đặng Thị An (2011), *Xử lý ô nhiễm bằng thực vật*, NXB Nông nghiệp.
- [2] Rufus L. Chaney, Minnie Malik, Yin M. Li, Sally L. Brown, Eric P. Brewer, J. Scott Angle, Alan J.M. Baker (1997), "Phytoremediation of soil metal", *Current Opinion in Biotechnology*, **8**(3), pp.279-284.
- [3] Chen Tongbin, Wei Chaoyang, Huang Zechun, Huang Qifei, Lu Quanguo, Fan Zilian (2002), "Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its arsenic accumulation", *Chinese Science Bulletin*, **47**(11), pp.902-905.
- [4] M. Varsha, M. Nidhi, M. Anurag (2010), "Heavy metals in plants: phytoremediation: plants used to remediate heavy metal pollution", *Agric. Biol. J.N. Am.*, **1**(1), pp.40-46.
- [5] Đặng Xuyên Như và cs (2003), *Nghiên cứu xác định một số giải pháp sinh học (thực vật và vi sinh vật) để xử lý ô nhiễm KLN trong nước thải ở Thái Nguyên 2002-2003*, đề tài cấp bộ.

Tạo phôi bò nhân bản không có zona pellucida

Nguyễn Khánh Vân, Quấn Xuân Hữu, Vũ Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Hương,
Nguyễn Thị Lệ Hương, Phạm Doãn Lân*

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

Ngày nhận bài 20/10/2017; ngày chuyển phản biện 25/10/2017; ngày nhận phản biện 27/11/2017; ngày chấp nhận đăng 4/12/2017

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu này là tạo phôi bò nhân bản bằng phương pháp cấy chuyển nhân tế bào soma (nguyên bào sợi da tai bò) vào tế bào trứng bò không có zona pellucida. Phương pháp này bao gồm các bước: Loại nhân tế bào trứng bò thành thực không có zona pellucida bằng dao vi phẫu thuật hoặc micro pipette; dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho (nguyên bào sợi da tai bò); nuôi *in vitro* trong hệ thống nuôi microwell. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng được loại nhân thành công đạt 84,89%, tỷ lệ tế bào trứng dung hợp thành công với tế bào cho đạt 86,91%. Sau khi dung hợp, các tế bào trứng đã dung hợp với tế bào cho được lựa chọn cho quá trình hoạt hóa và nuôi *in vitro* trong môi trường SOFaa. Tại thời điểm 18 giờ sau hoạt hóa, 88,89% tế bào trứng đã được tái cấu trúc ở giai đoạn 2 tiền nhân. Tỷ lệ phát triển phân chia và tạo phôi nang bò nhân bản tương ứng đạt 87,61 và 24,78%. Kết quả này cho thấy, các tác giả đã thực hiện thành công phương pháp tạo phôi bò nhân bản không có zona pellucida. Phương pháp tạo phôi bò nhân bản không có zona pellucida đơn giản, dễ sử dụng và hiệu quả.

Từ khóa: Cấy chuyển nhân, microwell, phôi bò nhân bản không có zona pellucida.

Chỉ số phân loại: 4.2

Production of zona-free cloned bovine embryos

Khanh Van Nguyen, Xuan Huu Quan, Thi Thu Huong Vu,
Thi Huong Nguyen, Thi Le Huong Nguyen, Doan Lan Pham*

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

Received 20 October 2017; accepted 4 December 2017

Abstract:

The objective of this work was to apply a new zona-free cloning method for producing cloned bovine embryos. The procedure of the method included enucleation of matured oocytes without zona pellucida using a microblade or micropipette; electrofusion of oocyte-donor cell pairs; *in vitro* culture in microwell system. By this method, the percentage of enucleated oocytes was 84.89%, and the percentage of fused oocytes with donor cells was 86.91%. After fusion, oocytes fused with donor cells were selected for activation and *in vitro* culture in SOFaa medium. At 18 hours after activation and culture, the rate of reconstructed oocytes was 88.89%. The development rates of cleavage and blastocyst embryos were 87.61 and 24.78%, respectively. In conclusion, the method of zona-free cloning of bovine embryos was conducted successfully in our lab. This method could be an easy, simple, fast, and efficient operation.

Keywords: Microwell, nuclear transfer, zona-free cloned bovine embryos.

Classification number: 4.2

Đặt vấn đề

Nhân bản động vật bằng phương pháp cấy chuyển nhân tế bào soma (SCNT) đã và đang được áp dụng ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Tuy nhiên, hiệu quả của phương pháp này vẫn thấp và tỷ lệ tạo con non dao động 5-10% tùy thuộc loài [1]. Hiện nay quy trình tạo phôi nhân bản bằng SCNT vẫn chỉ thực hiện ở trong các phòng thí nghiệm, đòi hỏi những kỹ năng vi thao tác phức tạp và chi phí cao. Để giúp cho việc tạo phôi nhân bản trở thành một phương pháp dễ áp dụng phục vụ nghiên cứu, một số nhà khoa học đã cải tiến làm cho quy trình tạo phôi nhân bản bằng SCNT trở nên đơn giản và dễ áp dụng hơn [2, 3]. Điểm nổi bật trong cải tiến của các nhà khoa học chính là việc sử dụng tế bào trứng không có zona pellucida (ZP). Các phôi nang tạo ra từ phương pháp này có chất lượng tương tự như phôi nang có ZP.

Phương pháp tạo phôi nhân bản không có ZP là một phương pháp đơn giản, hiệu quả và dễ sử dụng hơn khi

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

được so sánh với phương pháp nhân bản truyền thống [4]. Quá trình chuẩn bị tế bào chất bằng cách loại nhân tế bào trứng không có màng có thể được thực hiện mà không cần phải nhuộm tế bào trứng với thuốc nhuộm huỳnh quang, hiệu quả loại nhân lên tới 95-100% và bảo tồn được 96-97% thể tích tế bào trứng [5]. Tỷ lệ dung hợp giữa tế bào trứng nhận không có ZP với tế bào soma lên tới 95-100% khi được so sánh với 60-70% của phương pháp nhân bản truyền thống [6]. Số lượng phôi nang được tạo ra bằng phương pháp không ZP bằng hoặc cao hơn so với phương pháp nhân bản truyền thống [7]. Kết quả cấy truyền phôi cũng đã được so sánh đối với cả hai phương pháp. Phương pháp nhân bản không có ZP có thể làm tăng số lượng phôi nhân bản và con non nhân bản bởi tính đơn giản và hiệu quả cao [7].

Tại Việt Nam, việc nghiên cứu tạo phôi bò nhân bản bằng kỹ thuật SCNT truyền thống đã được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học (Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam) với sự hợp tác của Viện Nghiên cứu nông nghiệp quốc gia Pháp (INRA) và Đại học Kinki, Nhật Bản [8, 9]. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có nơi nào công bố về việc tạo được phôi bò nhân bản không có ZP. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu tạo được phôi bò nhân bản không có ZP bằng kỹ thuật SCNT trong điều kiện Việt Nam, từ đó hướng tới việc tạo được bò nhân bản tại Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Thu tế bào trứng và nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng bò

Thu buồng trứng bò từ lò mổ và chuyển về phòng thí nghiệm trong dung dịch NaCl 0,9% ở 32 đến 35°C trong vòng 2-3 giờ. Sử dụng phương pháp chọc hút để thu tế bào trứng bò từ những nang có đường kính 2-6 mm trên buồng trứng. Lựa chọn và sử dụng các tế bào trứng bò có từ 2 lớp tế bào cumulus trở lên, khối tế bào chất đồng

nhất, chặt chẽ cho nuôi thành thực *in vitro*. Các tế bào trứng bò được nuôi thành thực *in vitro* từ 20 đến 22 giờ trong môi trường TCM 199 có bổ sung 10% (v/v) huyết thanh thai bê (FCS, Sigma), cysteamine, sodium pyruvate, kháng sinh và hormone ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa.

Chuẩn bị tế bào chất nhận

Lựa chọn các tế bào trứng bò thành thực và loại bỏ ZP: Sau nuôi thành thực *in vitro* 20-22 giờ, loại bỏ lớp tế bào cumulus của tế bào trứng trong môi trường 0,1% hyaluronidase (Sigma). Sau khi loại bỏ tế bào cumulus, các tế bào trứng được rửa 3 lần trong môi trường TALP - Hepes + 10% FCS và chuyển sang môi trường TCM 199 - Hepes (Sigma) + 10% FCS. Lựa chọn các tế bào trứng có thể cực thứ nhất với khối tế bào chất đồng nhất chặt chẽ dưới kính hiển vi soi nổi. Các tế bào trứng có thể cực thứ nhất sẽ được loại bỏ ZP trong môi trường TALP - Hepes + 5 mg/ml pronase (Sigma). Sau khi đã loại bỏ hoàn toàn ZP chuyển các tế bào trứng sang môi trường TCM 199 - Hepes + 10% FCS để bắt hoạt pronase.

Loại nhân tế bào trứng: Tế bào trứng sau khi được loại ZP sẽ được chuyển sang môi trường SOFaa có bổ sung 4 µM Demecolcine (Sigma). Sau 30-40 phút, lựa chọn các tế bào trứng với khối hình nón lồi lên trên màng tế bào trứng sử dụng cho quá trình loại nhân. Quá trình loại nhân tế bào trứng được tiến hành như sau: Loại bỏ một phần tế bào chất có hình nón lồi ra trên màng tế bào trứng bằng một dao cắt vi phẫu thuật hoặc micro pipette dưới kính hiển vi soi nổi có độ phóng đại 100 lần trong môi trường có chứa 5 µg/ml cytochalasin B (Sigma). Phần thể tích tế bào chất bị loại chiếm 10-15% thể tích tế bào trứng.

Chuẩn bị tế bào cho

Nguyên bào sợi bò được phân lập từ mẫu mô tai của bò sữa cao sản trưởng thành. Loại bỏ mỡ thừa, lông bao xung

quanh mảnh mô tai và cắt thành những mảnh mô có diện tích khoảng 1 mm². Đặt các mảnh mô vào trong đĩa nuôi có chứa môi trường nuôi nguyên bào sợi dulbecco modified eagles (DMEM, Sigma) + 10% (v/v) FCS. Nuôi các mảnh mô trong điều kiện 5% CO₂, 37°C và độ ẩm không khí bão hòa. Sau 9-10 ngày kiểm tra các đĩa nuôi, loại bỏ mảnh mô tai từ những đĩa nuôi có chứa nguyên bào sợi bò phát triển. Thay môi trường nuôi và nuôi tiếp cho tới khi nguyên bào sợi bò phát triển đạt tới > 80% thể tích đáy đĩa nuôi thì tiến hành cấy chuyển. Sử dụng nguyên bào sợi bò ở lần cấy chuyển thứ 6-10 cho quá trình cấy SCNT. Trước khi được cấy chuyển vào tế bào trứng nhận, nguyên bào sợi sẽ được nuôi 48 giờ trong môi trường nuôi thiếu huyết thanh DMEM + 0,5% huyết thanh thai bê. Mục đích của việc nuôi nguyên bào sợi bò trong môi trường nuôi thiếu huyết thanh là đồng pha nhân của nguyên bào sợi về giai đoạn G0/G1 của chu trình tế bào.

Cấy SCNT, dung hợp và kích hoạt tế bào trứng

Cấy SCNT: Các tế bào trứng sau loại nhân sẽ được chuyển vào môi trường TCM 199 - Hepes có bổ sung 10 µg/ml phytohemagglutinin (PHA, Sigma) trong vòng 3-5 giây. PHA có tác dụng như một chất keo dính để gắn tế bào trứng nhận đã loại nhân với tế bào cho. Tiếp theo chuyển tế bào trứng vào trong môi trường có chứa tế bào cho đã chuẩn bị trước đó và gắn với tế bào cho theo nguyên tắc: Một tế bào trứng gắn với một tế bào cho.

Dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho: Cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho trước khi dung hợp sẽ được chuyển sang môi trường dung hợp (0,2 M manitol, 50 µM CaCl₂, 100 µM MgSO₄, 0,1% PVA) từ 1 đến 2 phút. Sau đó chuyển các cặp tế bào trứng - tế bào cho này vào buồng dung hợp được kết nối với máy dung hợp (BTX, San Diego, CA) để dung hợp tế bào cho với tế bào trứng nhận. Các cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho sau dung hợp sẽ được

chuyển sang môi trường SOFaa có bổ sung FCS, để trong tủ nuôi 2 giờ. Sau 2 giờ, kiểm tra các cặp tế bào trứng - tế bào cho đã dung hợp được với nhau. Các cặp tế bào trứng - tế bào cho đã dung hợp được với nhau là khi tế bào cho di chuyển vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận.

Kích hoạt tế bào trứng: Chỉ sử dụng cặp tế bào trứng - tế bào cho đã dung hợp được với nhau cho quá trình kích hoạt tế bào trứng để tạo phôi bò nhân bản. Quá trình kích hoạt tế bào trứng được thực hiện như sau: Chuyển cặp tế bào trứng - tế bào cho đã dung hợp được với nhau sang môi trường TALP - Hepes có bổ sung 5 mM ionomycine trong vòng 4 phút; sau đó sẽ được chuyển sang môi trường SOFaa có bổ sung 1,9 mM 6-DMPAP trong vòng 3 giờ.

Thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò

Tinh trùng bò đông lạnh được giải đông ở 37°C và rửa 3 lần trong môi trường rửa tinh trùng BO [10] không có bovine serum albumin (BSA, Sigma) nhưng có bổ sung 5 mM caffeine bằng cách ly tâm 1.800 vòng/phút ở 37°C trong vòng 5 phút. Sau đó tinh trùng sẽ được pha loãng bằng môi trường BO có bổ sung BSA cho tới khi mật độ tinh trùng đạt $15-18 \times 10^6$ tế bào/ml. Tạo các giọt thụ tinh có chứa tinh trùng đã pha loãng (95 μ l/giọt). Chuyển các tế bào trứng bò sau nuôi thành thực *in vitro* sang giọt thụ tinh và để ở điều kiện 5% CO₂, 5% O₂, 38,5°C, độ ẩm không khí bão hòa. Sau 5-6 giờ, loại bỏ lớp tế bào cumulus bao xung quanh và chuyển các tế bào trứng sang môi trường nuôi phôi SOFaa có bổ sung huyết thanh thai bê bằng hệ thống

Nuôi phôi *in vitro*

Các cặp tế bào trứng - tế bào cho sau khi được xử lý với ionomycine và 6-DMPAP (hợp tử giả định) sẽ được chuyển sang nuôi trong môi trường nuôi phôi SOFaa có bổ sung huyết thanh thai bê bằng hệ thống đĩa nuôi microwell (1 hợp tử giả

định/microwell) ở điều kiện 5% CO₂, 5% O₂, 38,5°C, độ ẩm không khí bão hòa. Kiểm tra khả năng phân chia của phôi ở ngày thứ 2; phôi dâu, phôi nang ở ngày thứ 6-7 sau kích hoạt. Phôi được tạo ra từ các tế bào trứng thành thực không có ZP sẽ được sử dụng như là nhóm đối chứng để đánh giá chất lượng tế bào trứng và điều kiện nuôi phôi *in vitro*.

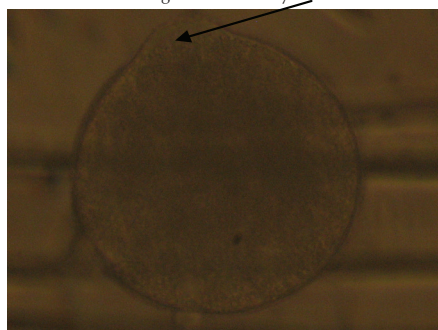
Đánh giá quá trình tái cấu trúc nhân và chất lượng phôi bò nhân bản

Để đánh giá quá trình tái cấu trúc nhân tế bào cho, một số hợp tử giả định sẽ được thu ở thời điểm 18-24 giờ sau kích hoạt và nhuộm với Hoechst 33342. Các hợp tử còn lại sẽ được nuôi tiếp để đánh giá khả năng phân chia và hình thành phôi nang. Các phôi nang bò nhân bản và phôi nang bò thụ tinh *in vitro* sẽ được nhuộm với Hoechst 33342 và tổng số nhân tế bào được đếm dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phân tích số liệu

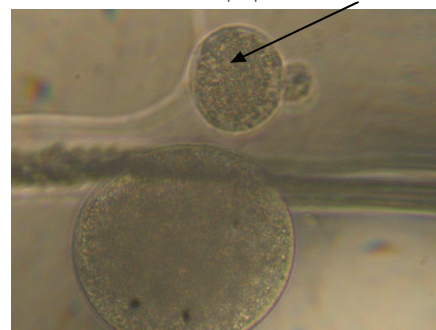
Số liệu của tất cả các nội dung nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excell 2007, sự khác nhau có ý nghĩa được kiểm tra bằng χ^2 sử dụng hàm CHITEST, sự sai khác có ý nghĩa với $p < 0,05$.

Nhân tế bào trứng lỗi ra sau xử lý với demecolcine



Hình 1. Tế bào trứng trước loại nhân.

Phần tế bào chất bị loại có chứa nhân



Hình 2. Tế bào trứng sau loại nhân.

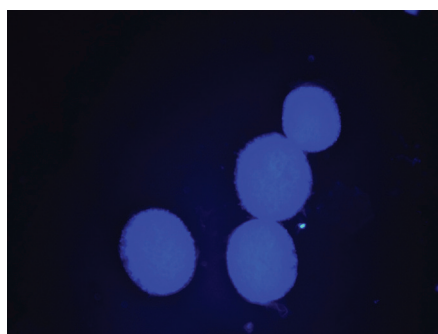
Bảng 1. Hiệu quả loại nhân tế bào trứng.

Tế bào trứng loại nhân (n)	Tế bào trứng không bị hỏng sau loại nhân n; % (M $\pm$ SE)	Tế bào trứng không bị hỏng sau loại nhân và không còn nhân sau loại n; % (M $\pm$ SE)
422	404 95,25 $\pm$ 1,69	342 84,89 $\pm$ 1,38

thường được sử dụng như là tế bào chất nhận. Kỹ thuật loại nhân tế bào trứng nhận bằng cách loại bỏ phần tế bào chất xung quanh thể cực thứ nhất của tế bào trứng là phương pháp phổ biến nhất, tuy nhiên hiệu quả của phương pháp này vẫn còn thấp. Theo Jeon và cs (2011) [11], mặc dù lượng thể tích tế bào chất xung quanh thể cực thứ nhất bị loại bỏ chiếm 20-30% thể tích tế bào trứng thì tỷ lệ tế bào trứng được loại nhân thành công chỉ đạt 42-60% tổng số tế bào trứng được loại nhân. Nhuộm tế bào trứng với hoechst 33342 xác định chính xác vị trí và hiệu quả loại nhân lên tới 100%. Tuy nhiên, việc tiếp xúc dù chỉ rất ngắn với tia UV có thể ảnh hưởng đến chất lượng tế bào chất [11].

Ở giai đoạn phát triển đầu tiên của kỹ thuật tạo phôi động vật nhân bản không có ZP, tế bào trứng nhận sau khi được loại bỏ ZP sẽ được chia đôi bởi một dao cắt vi thao tác và chỉ sử dụng nửa tế bào trứng không có nhân cho cấy SCNT. Tuy nhiên, nhược điểm của kỹ thuật này là làm lãng phí 50% tế bào chất của tế bào trứng ban đầu trong quá trình loại nhân, khi dung hợp cần phải sử dụng hai nửa tế bào chất của tế bào trứng để khôi phục lại lượng tế bào chất ban đầu. Do đó, phôi nhân bản vô tính tạo ra bằng kỹ thuật này có thể chứa ba kiểu gen khác nhau của ADN ty thể trong một tế bào, và không tốt cho sự phát triển tiếp theo của phôi [12]. Để giải quyết được vấn đề này, Vajta và cs (2005) [12] đã đưa ra đề xuất xác định nhiễm sắc thể bằng cách xử lý tế bào trứng với một chất hóa học có thể tác động đến bộ khung tế bào, qua đó giúp các kỹ thuật viên có thể xác định chính xác vị trí của nhân tế bào trứng, lượng thể tích tế bào chất có chứa nhiễm sắc thể bị loại bỏ trong quá trình loại nhân ít hơn 10% thể tích tế bào trứng nhận. Bằng cách này, chỉ cần sử dụng một tế bào trứng nhận cho quá trình cấy chuyển nhân tế bào cho, nâng cao hiệu quả quá trình tạo phôi động vật nhân bản không có ZP.

Hiện nay, các nhà nghiên cứu đã sử dụng một số chất hóa học trong quá trình này với mục đích xác định được chính xác vị trí của nhân tế bào trứng. Cũng theo Jeon và cs (2011) [11], khi sử dụng demecolcine trong quá trình loại nhân tế bào trứng sẽ nâng cao được hiệu quả loại nhân, tỷ lệ loại nhân thành công có thể lên tới 95,7% mà tế bào trứng không bị những ảnh hưởng tiêu cực.



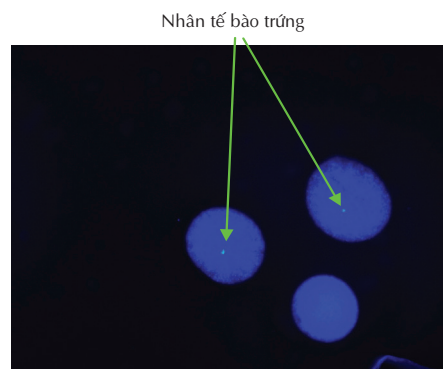
Hình 3. Tế bào trứng loại nhân thành công.

Demecolcine có tác dụng đẩy phần nhân tế bào trứng thành thực ra sát ngoại vi tế bào trứng [13]. Phần nhân tế bào trứng khi bị đẩy ra sẽ có hình nón (hình 1), qua đó giúp cho các kỹ thuật viên dễ nhận biết được vị trí nhân tế bào trứng dưới kính hiển vi soi nổi thông thường, nhờ vậy mà quá trình loại nhân tế bào trứng trở nên đơn giản hơn. Lượng thể tích tế bào chất chứa vật liệu di truyền được loại bỏ trong quá trình loại nhân sẽ <15%, do đó lượng tế bào chất còn lại đủ để hoàn thiện một phôi tái cấu trúc sau khi đã được dung hợp với một tế bào cho. Bên cạnh đó, phương pháp này cho phép tế bào trứng không cần phải nhuộm hoechst 33342 và tiếp xúc với tia cực tím (UV). Việc nhuộm tế bào trứng với hoescht 33342 và tiếp xúc với tia UV có thể là nguyên nhân gây tổn thương các bào quan trong tế bào chất, ADN ty thể, qua đó giảm hiệu quả tạo phôi nhân bản [14].

Hiệu quả dung hợp tế bào cho với tế bào nhận

Để tạo ra được phôi nhân bản, nhân

của tế bào cho hoặc tế bào cho phải được chuyển vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận bằng cách sử dụng kỹ thuật vi tiêm hoặc dung hợp tế bào cho với tế bào trứng nhận. Theo Malenko và cs (2015) [7], hiện nay dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho là kỹ thuật phổ biến nhất trong quá trình tạo phôi nhân bản. Đối với kỹ thuật tạo phôi nhân bản không màng sáng, trước khi dung hợp tế bào trứng



Hình 4. Tế bào trứng vẫn còn nhân sau loại nhân.

nhận sẽ được kết dính với tế bào cho bằng dung dịch phytohemagglutinin (PHA). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng PHA ở nồng độ 1 mg/ml. Theo Oback và cs (2007) [4] đây là nồng độ PHA phù hợp và không ảnh hưởng đến sự phát triển tiếp theo của phôi nhân bản. Quá trình dung hợp tế bào trứng nhận - tế bào cho thành công là sau khi dung hợp tế bào cho đi vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã dung hợp 544 cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho. Kết quả cho thấy, có 470 (86,91%, bảng 2) cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho được dung hợp thành công.

Kết quả của chúng tôi là cao hơn so với Oback và cs (2003) [15]. Theo các tác giả này, hiệu quả dung hợp tế bào cho với tế bào trứng nhận trong nghiên cứu của họ chỉ đạt 80%. Sự thành công của quá trình dung hợp phụ thuộc rất nhiều vào việc tiếp xúc giữa tế bào cho với màng tế bào trứng nhận. Việc sử dụng PHA sẽ làm tăng hiệu quả kết dính giữa tế bào cho với

tế bào trứng nhận, giúp cho quá trình kết dính tế bào cho với tế bào trứng nhận trở nên đơn giản hơn, rút ngắn thời gian kết dính tế bào cho với tế bào trứng nhận so với phương pháp tạo phôi nhân bản có ZP [15]. Đối với phương pháp tạo phôi nhân bản có ZP, tế bào cho trước khi dung hợp với tế bào trứng nhận sẽ được chuyển vào dưới ZP bằng một micropipette. Do không có sự kết dính nên tế bào cho sẽ di chuyển trong không gian dưới ZP, chính vì thế theo Lagutina và cs (2007) [6] hiệu quả dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho theo phương pháp này thường không vượt quá 60-70% đối với bò. Trong khi đó đối với phương pháp tạo phôi nhân bản không ZP, theo Lagutina và cs (2007) [6] tỷ lệ tế bào trứng nhận dung hợp được với tế bào cho có thể lên tới 100% đối với bò, ngựa.

Hiệu quả tạo phôi bò nhân bản không có ZP

Khả năng tái cấu trúc của nhân tế bào cho sau kích hoạt: Sau khi nhân của tế bào cho được dung hợp với tế bào trứng nhận đã loại nhân và trải qua quá trình kích hoạt chúng sẽ bắt đầu quá trình hình thành tiền nhân thứ hai. Với 90 tế bào trứng đã được cấy SCNT và kích hoạt thành công có 80 (88,89%, bảng 3) tế bào trứng hình thành tiền nhân thứ hai tại thời điểm 18 giờ sau kích hoạt.

Kết quả của chúng tôi cho thấy, hiệu quả của quá trình kích hoạt tế bào trứng bò sẽ được nâng cao khi sử dụng kết hợp ionomycine với 6-DMAP trong quá trình kích hoạt. Kết quả này cũng phù hợp với một số báo cáo trước đây về việc sử dụng kết hợp một chất hóa học có khả năng làm tăng lượng Ca nội bào với một chất ức chế quá trình tổng hợp protein như 6-DMAP trong quá trình kích hoạt sẽ làm tăng hiệu quả của quá trình kích hoạt và khả năng phát triển tiếp theo của phôi bò nhân bản [16].

Khả năng phát triển in vitro của

Bảng 2. Hiệu quả dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho.

Cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho (n)	Cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho hỏng hoặc không dung hợp được sau dung hợp (n)	Cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho dung hợp thành công n, % (M ± SE)
544	74	470 86,91 ± 1,98

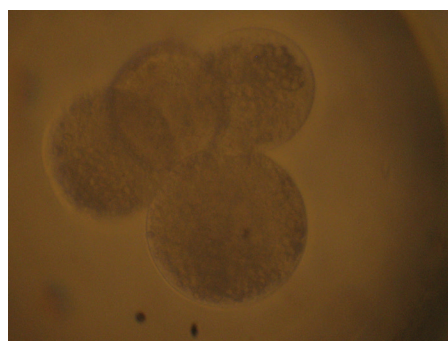
Bảng 3. Khả năng tái cấu trúc của nhân tế bào cho sau khi được cấy chuyển vào tế bào trứng nhận và kích hoạt.

Thời gian sau kích hoạt	Tế bào trứng đã cấy chuyển nhân và kích hoạt (n)	Tế bào trứng có 2 tiền nhân n, % (M ± SE)
18 giờ	90	80 88,89 ± 2,9

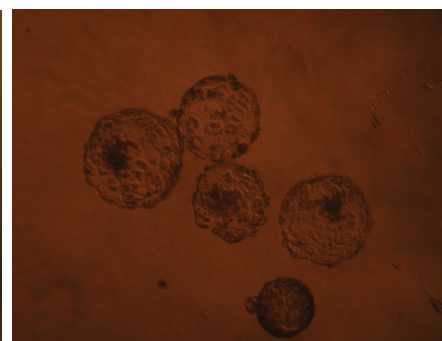
Bảng 4. Khả năng tạo phôi bò nhân bản không có ZP.

Loại phôi	n	Phân chia n, % (M ± SE)	Phôi nang n, % (M ± SE)	Tổng số tế bào M ± SE
Nhân bản	380	334 87,61 ± 0,65 ^a	91 24,78 ± 0,64 ^b	86,3 ± 2,14
Đối chứng (IVF)	120	104 86,98 ± 1,43 ^a	28 24,06 ± 1,89 ^b	105,6 ± 1,65

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



Hình 5. Phôi bò nhân bản ở giai đoạn 4 tế bào (ngày thứ 2 sau hoạt hóa).



Hình 6. Phôi nang bò nhân bản sau cấy chuyển nhân không có ZP.

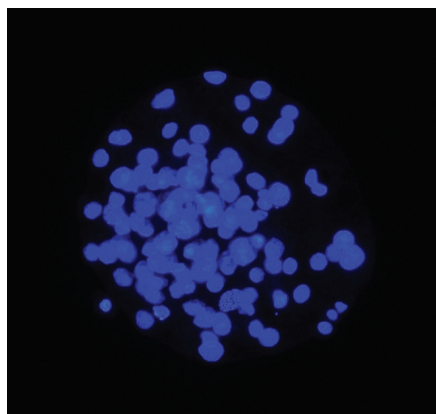
phôi bò nhân bản được tạo ra bằng kỹ thuật SCNT: Các tế bào trứng nhận sau khi đã dung hợp được với tế bào cho và kích hoạt sẽ được chuyển vào nuôi trong hệ thống nuôi microwell. Hiệu quả tạo phôi bò nhân bản sau dung hợp phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như quá trình kích hoạt, môi trường và hệ thống nuôi phôi. Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ phân chia và tạo phôi nang bò nhân bản tương ứng đạt 87,61 và 24,78% (bảng 4, hình 5 và 6). Kết quả này cho thấy, hệ thống nuôi phôi in vitro cũng như môi trường nuôi

phôi SOFaa của chúng tôi là phù hợp cho việc tạo phôi bò nhân bản.

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ phân chia, phôi nang bò thu được từ tế bào trứng đã cấy SCNT và tiếp theo được kích hoạt bằng ionomycine và 6-DMAP là tương tự như nhóm đối chứng (bảng 4, p > 0,05). Tuy nhiên, phôi nang bò nhân bản của chúng tôi có tổng số tế bào thấp hơn so với phôi đối chứng (phôi IVF) (86,3 so với 105,6). Kết quả này phù hợp với báo cáo của Liu và cs (1998), Yamazaki

và cs (2005) [16, 17]. Các tác giả này cũng sử dụng kết hợp ionomycin và 6-DMAP trong quá trình kích hoạt tế bào trứng bò. Mặc dù tổng số tế bào của phôi nang bò nhân bản trong nghiên cứu của chúng tôi là cao hơn so với Yamazaki và cs (2005) (75,4) [17] nhưng lại thấp hơn so với Jang và cs (2011) (118,6) [18]. Sự khác nhau giữa các kết quả nghiên cứu có thể là do điều kiện thí nghiệm, chất lượng tế bào trứng, cũng như điều kiện nuôi phôi *in vitro*.

Việc sử dụng 6-DMAP cho phép kích hoạt khả năng sinh sản đơn tính ở trứng bò với tỷ lệ phân chia đạt 80%, tỷ lệ phôi nang đạt 20-30% [19]. Tuy nhiên, nếu chỉ sử dụng riêng lẻ 6-DMAP thì không đủ để kích hoạt quá trình sinh sản đơn tính của tế bào trứng [20]. Theo Kharche và Birade (2013) [21], tế bào trứng bò khi được xử lý với ionomycin (5 phút), tiếp theo là xử lý với 6-DMAP sẽ làm tăng tối đa sự kích hoạt quá trình sinh sản đơn tính ở trứng bò. Siti Khadijah và cs (2014) [22] cũng nhận thấy, việc sử dụng kết hợp ionomycin với 6-DMAP trong quá trình kích hoạt tế bào trứng bò sẽ cho tỷ lệ phân chia và phôi nang sau kích hoạt cao.



Hình 7. Phôi nang bò nhân bản được nhuộm với hoechst 33342 xác định tổng số tế bào.

Bên cạnh việc sử dụng ionomycin và 6-DMAP cho quá trình kích hoạt tế bào trứng bò, chúng tôi sử dụng môi trường nuôi phôi SOFaa có bổ

sung BSA và huyết thanh thai bê với mục đích nâng cao hiệu quả tạo phôi bò nhân bản. Theo Jang và cs (2011) [18], phôi bò nhân bản được nuôi trong môi trường SOFaa có bổ sung BSA và huyết thanh thai bê sẽ nâng cao khả năng tạo phôi nang bò nhân bản cũng như hỗ trợ cho sự ra đời của bê nhân bản vô tính sau cấy chuyển phôi.

Chúng tôi sử dụng các nguyên bào sợi bò (tế bào cho) đã trải qua quá trình nuôi thiếu huyết thanh trong một thời gian dài (48 giờ) trước khi được cấy chuyển vào tế bào chất của tế bào trứng nhận ở nghiên cứu này. Việc nuôi các nguyên bào sợi bò (tế bào cho) trong điều kiện thiếu huyết thanh sẽ làm tăng tỷ lệ các nguyên bào sợi có nhân ở giai đoạn G0/G1 của chu trình tế bào [23]. Theo Miranda và cs (2009) [23], Saikhun và cs (2004) [24], khi nhân của nguyên bào sợi được nuôi trong điều kiện thiếu huyết thanh sẽ hỗ trợ sự phát triển của phôi tái cấu trúc đến giai đoạn phôi nang tốt hơn là các nguyên bào sợi nuôi trong điều kiện đầy đủ huyết thanh. Hill và cs (2000) [25] khi nghiên cứu ảnh hưởng của tế bào cho đến hiệu quả tạo phôi nang bò nhân bản đã nhận thấy, việc nuôi tế bào cho trong điều kiện thiếu huyết thanh trước khi cấy chuyển nhân sẽ cải thiện đáng kể tỷ lệ phôi nang bò nhân bản so với tế bào cho không được nuôi trong điều kiện thiếu huyết thanh (43 so với 12%).

Đối với phôi không có ZP cần thiết phải có một hệ thống nuôi phôi đặc trưng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nuôi phôi bò nhân bản không có ZP trong hệ thống nuôi microwell. Theo Feltrin và cs (2015) [26], việc nuôi phôi bò nhân bản không có màng ZP trong hệ thống nuôi microwell sẽ hỗ trợ tối đa cho sự phát triển đến giai đoạn phôi nang. Ngoài ra, cũng theo Feltrin và cs (2015) [26], với lượng thể tích môi trường nhỏ trong các microwell sẽ làm tăng nồng độ các yếu tố thuận lợi trong môi trường xung quanh phôi, qua đó làm tăng tỷ lệ phôi nang bò

nhân bản. Tương tự như vậy, Malenko và cs (2015) [7] cũng cho rằng, khi nuôi phôi nhân bản không có ZP trong hệ thống nuôi microwell cho tỷ lệ phôi nang dao động từ 33 đến 48%.

Kết luận

Lần đầu tiên tại Việt Nam, đã tạo thành công phôi bò nhân bản không có ZP bằng kỹ thuật SCNT với tỷ lệ tạo phôi nang đạt 24,78%. Phương pháp nhân bản không có ZP đơn giản, dễ sử dụng, nhanh chóng và hiệu quả hơn so với phương pháp nhân bản thông thường trước đây.

Đề nghị tiếp tục nghiên cứu và sử dụng phôi bò nhân bản làm nguồn phôi nguyên liệu để cấy chuyển phôi tạo bò nhân bản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ hỗ trợ hoạt động thường xuyên cho Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Solter (2000), "Mammalian cloning: Advances and limitations", *Nat. Rev. Genet.*, **1**, pp.199-207.
- [2] P.J. Booth, S.J. Tan, R. Reipurth (2001), "Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona - free manipulation technique", *Cloning Stem Cells*, **3**, pp.139-150.
- [3] G. Vajta, I.M. Lewis, P. Hyttel (2001), "Somatic cell cloning without micromanipulators", *Cloning*, **3**, pp.89-95.
- [4] B. Oback, D.N. Wells (2007), "Cloning cattle: The methods in the madness", *Adv. Exp. Med. Biol.*, **591**, pp.30-57.
- [5] M.I. Prokofiev, et al. (2007), "Blind enucleation of oocytes is highly efficient in zona - free bovine cloning", *Reprod. Fertil. Dev.*, **19**, pp.156-157.
- [6] I. Lagutina, et al. (2007), "Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona - free method in cattle, horse, pig and sheep", *Theriogenology*, **67**, pp.90-98.
- [7] G.P. Malenko, et al. (2015), "Perspective of zona - free method use in farm animal cloning", *Agricultural Biology*, **50(4)**, pp.420-430.
- [8] B.X. Nguyen, et al. (2000), "Cloning of

Ha-an bovine embryos by nuclear transfer with adult somatic cells", *J. Biology*, **1**, pp.10-15.

[9] L.V. Ty, et al. (2003), "Production of embryos of an endangered species (*Bos gaurus*) by the xenogenic nuclear transfer into the ooplast of the domestic cow for preservation of this animal in Vietnam", *J. Biology*, **25(2)**, pp.1-6.

[10] B.G. Brackett, G. Oliphant (1975), "Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*", *Biol. Reprod.*, **12**, pp.260-274.

[11] B.G. Jeon, D.H. Betts, W.A. King, G.J. Rho (2011), "In vitro developmental potential of nuclear transfer embryos cloned with enucleation methods using pre-denuded bovine oocytes", *Reprod. Dom. Anim.*, **46**, pp.1035-1042.

[12] G. Vajta, P.M. Kragh, N.R. Mtango, H. Callesen (2005), "Handmade cloning approach: potentials and limitations", *Reprod. Fertil Dev.*, **17(1-2)**, pp.97-112.

[13] X.C. Li, Y. Zhang, S. Hua, J.H. Shu, Z.P. Zhang, J.W. Cao (2007), "The use of demecolcine for enucleation of bovine oocytes", *Belg. J. Zool.*, **137(2)**, pp.209-214.

[14] G. Verma, et al. (2015), "Handmade cloning: Recent advances, potential and pitfalls", *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, **6**, p.43.

[15] B. Oback, et al. (2003), "Cloned

cattle derived from a novel Zona-free embryo reconstruction system", *Cloning Stem Cells*, **5(1)**, pp.3-12.

[16] L. Liu, J.C. Ju, X. Jang (1998), "Parthenogenetic development and protein patterns of newly matures bovine oocytes following chemical activation", *Mol. Reprod. and Dev.*, **49**, pp.298-307.

[17] W. Yamazaki, et al. (2005), "Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer", *Zygote*, **13**, pp.295-302.

[18] S. Jang, S.G. Hong, B.C. Lee (2011), "Cloned aclves derived from somatic cell nuclear transfer embryos cultured in chemically defined medium or modified synthetic oviduct fluid", *J. Vet. Sci.*, **12(1)**, pp.83-89.

[19] F. Perecin, S.C. Meo, C.L.V. Leal, J.M. Garcia (2007), "Oocytes activation and preimplantation development of bovine embryos obtained by specific inhibition of cyclin-dependent kinases", *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **59(2)**, pp.280-287.

[20] Q.A. Winger, et al. (1997), "Bovine parthenogenesis is characterized by abnormal chromosomal complements: Implications for maternal and paternal co-dependence during early bovine development", *Dev. Genet.*, **21**, pp.160-166.

[21] S.D. Kharche, H.S. Birade (2013),

"Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for *in vitro* embryo production: A review", *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **4**, pp.170-182.

[22] I. Siti Khadijah, et al. (2014), "Comparison of Bovine embryonic development of parthenogenetically activated oocytes by different combinations of chemical treatments", *Mal. J. Anim. Sci.*, **17(1)**, pp.85-94.

[23] M.D.S. Miranda, et al. (2009), "Serum starved apoptotic fibroblasts reduce blastocyst production but enable development to term after SCNT in cattle", *Cloning and stem cells*, **11(4)**, pp.565-573.

[24] J. Saikhun, et al. (2004), "Development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos after parthenogenetic activation and nuclear transfer using serum fed or starved fetal fibroblast", *Reprod. Nutr. Dev.*, **44**, pp.65-78.

[25] J.R. Hill, et al. (2000), "Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells", *Biol. Reprod.*, **62**, pp.1135-1140.

[26] C. Feltrin, et al. (2015), "Effectiveness of mcirowell-based *in vitro* culture systems for zona - free cloned bovine embryos", *Acta Scientiae Veterinariae*, **43**, pp.1- 9.

Sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại một số tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam

Phạm Ngọc Thạch, Nguyễn Thị Lan, Đào Lê Anh*

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 14/9/2017; ngày chuyển phản biện 18/9/2017; ngày nhận phản biện 13/11/2017; ngày chấp nhận đăng 21/11/2017

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại 5 tỉnh biên giới phía Bắc. Nghiên cứu đã tiến hành thu thập 15.248 mẫu swab và 2.830 mẫu nội tạng gà, vịt, ngan, chim cú tại một số chợ bán gia cầm sống ở 5 tỉnh Quảng Ninh, Lạng Sơn, Lào Cai, Lai Châu và Cao Bằng. Bằng phương pháp Realtime RT-PCR, những mẫu dương tính với virus cúm typ A được kiểm tra subtyp H5 và N6, sau đó giải trình tự mẫu dương tính với subtyp H5 và N6 bằng máy giải trình tự Beckman Coulter CEQ 8000, tiếp theo xây dựng cây sinh học phân tử của các chủng virus cúm A/H5N6. Kết quả cho thấy, các mẫu swab gà, vịt, ngan và chim cú tại cả 5 tỉnh nghiên cứu với tỷ lệ dương tính chung là 5,79%. Còn với mẫu nội tạng dương tính chiếm tỷ lệ thấp hơn là 2,05%. Mẫu nội tạng có tỷ lệ dương tính với virus cúm A/H5N6 thấp hơn (2,05%). Lựa chọn giải trình tự nucleotide 10 chủng virus cúm A/H5N6, kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài cho thấy 10 chủng virus mang đoạn gen H5 đều thuộc clade 2.3.4.4 và nằm trong nhánh phát sinh cùng với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập được ở Lào năm 2014 và chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Trung Quốc năm 2013-2014. 10 chủng virus cúm mang đoạn gen N6 nằm trong cùng dòng Á - Âu (Eurasian lineage). Trong đó, 5 chủng virus cúm nằm cùng nhánh phát sinh với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Lào và Trung Quốc năm 2014. Các chủng virus còn lại nằm cùng nhánh phát sinh với một số chủng virus cúm A/H5N6 và H6N6 phân lập ở Việt Nam năm 2011-2014. Những kết quả này có ý nghĩa quan trọng đối với công tác dự báo nguy cơ xảy ra bệnh cúm gia cầm A/H5N6 tại khu vực nghiên cứu.

Từ khóa: Đặc điểm sinh học phân tử, sự lưu hành, tỉnh phía Bắc, virus cúm A/H5N6.

Chỉ số phân loại: 4.3

Đặt vấn đề

Cúm gia cầm (Avian Influenza) là bệnh truyền nhiễm cấp tính của nhiều loài gia cầm, do virus cúm A thuộc họ Orthomyxoviridae gây ra. Virus cúm được phân làm hai loại là có độc lực cao HPAI (High Pathogenic Avian Influenza) và có độc lực thấp LPAI (Low Pathogenic Avian Influenza). Sự phân loại này dựa trên cơ sở khả năng của virus gây bệnh cho gia cầm [1]. Tại Việt Nam, virus cúm A/H5N6 cũng đã được phát hiện tại một số tỉnh biên giới phía Bắc (Chi Lăng, Trảng Định, Lạng Sơn; phố Lu, Bảo Thắng, Lào Cai) và một số tỉnh thuộc vùng Trung Bộ (Kỳ Thọ, Kỳ Anh, Hà Tĩnh; Trung Hải, Gio Linh, Quảng Trị; Tĩnh Đông, Sơn Tịnh, Quảng Ngãi); tổng số gà, vịt, ngan và chim trĩ mắc bệnh cúm A/H5N6 và chết là 2.013 con,

tổng số gia cầm phải tiêu hủy là 5.188 con (tại 6 hộ chăn nuôi). Kết quả xét nghiệm, giải trình tự gen các mẫu virus cúm A/H5N6 đã phát hiện tại Việt Nam cho thấy, chúng có tỷ lệ tương đồng trên 99% so với chủng virus cúm A/H5N6 gây tử vong trên người tại tỉnh Tứ Xuyên, Trung Quốc năm 2014 (A/Sichuan/2622/2014) [2].

Trong thời gian vừa qua, các cơ quan chức năng tại các tỉnh Quảng Ninh, Lạng Sơn đã bắt giữ và xử lý nhiều vụ nhập lậu hàng chục nghìn gia cầm và trứng gia cầm qua biên giới (chủ yếu là gia cầm giống và trứng gia cầm giống). Kết quả xác minh một số ổ dịch cúm A/H5N6 vừa qua cho thấy, dịch xảy ra có liên quan đến việc buôn bán, vận chuyển gia cầm giống không rõ nguồn gốc, chưa qua kiểm dịch thú y. Như vậy, nguy cơ các chủng virus

cúm mới tiếp tục xâm nhập vào Việt Nam thông qua các hoạt động nhập khẩu trái phép gia cầm và sản phẩm gia cầm qua các tỉnh biên giới, nhất là phía Bắc rất cao [2].

Để ngăn ngừa dịch cúm gia cầm A/H5N6 và các chủng virus cúm khác tiếp tục phát sinh và lây lan trên diện rộng, gây thiệt hại kinh tế và ảnh hưởng đến sức khỏe của cộng đồng, dữ liệu thông tin đầy đủ về sự lưu hành của virus cúm gia cầm A/H5N6 có ý nghĩa rất quan trọng. Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại một số tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam” nhằm xác định được tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm A/H5N6 đang lưu hành trên đàn gia cầm tại các địa phương biên giới phía Bắc.

*Tác giả liên hệ: Email: daoleanh15071984@yahoo.com

The prevalence and genetic characteristics of avian influenza viruses subtype A/H5N6 in a number of northern border provinces in Vietnam

Ngoc Thach Pham, Thi Lan Nguyen, Le Anh Dao*

Faculty Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture

Received 14 September 2017; accepted 21 November 2017

Abstract:

The purpose of this study was to determine the prevalence and genetic characteristics of avian influenza viruses subtype A/H5N6 in five northern border provinces. In the study, 15,248 swab samples and 2,830 internal organ samples of birds were collected at a number of markets in Quang Ninh, Lang Son, Lao Cai, Lai Chau, and Cao Bang. Using the Realtime RT-PCR method, samples positive for influenza A viruses were tested for H5 and N6 subtypes, then sequenced using the Beckman Coulter CEQ 8000, and followed by phylogenetic analysis of A/H5N6 influenza strains. The results showed that the A/H5N6 virus prevalence of swab samples was 5.79%, and that of internal organ samples was lower (2.05%). Ten strains of A/H5N6 viruses were sequenced, and the results of phylogenetic analysis showed that ten strains of H5 subtype belong to the clade 2.3.4.4 and belong to the branch of the A/H5N6 influenza viruses isolated in Laos in 2014 and in China from 2013 to 2014. Ten strains of N6 subtype were in the same Eurasian lineage. Of which, five strains were in the same A/H5N6 viruses isolated in Laos and China in 2014, and the five other strains were located in the same branch with A/H5N6 and H6N6 viruses isolated in Vietnam from 2011 to 2014. These results are important to predict the risk of avian influenza A/H5N6 viruses in the study areas.

Keywords: A/H5N6 virus, molecular biology, northern provinces, prevalence.

Classification number: 4.3

Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

- Nghiên cứu được thực hiện tại 5 tỉnh Quảng Ninh, Lạng Sơn, Lai Châu, Cao Bằng và Lào Cai từ tháng 7/2015 đến 6/2017.

- Đối tượng nghiên cứu là gà, vịt, ngan và chim cút bán tại các chợ có buôn bán gia cầm sống. Mẫu dịch swab được lấy ngẫu nhiên từ gà, vịt, ngan và chim cút bán tại các chợ. Mẫu nội tạng được lấy từ các đối tượng nghi nhiễm virus cúm gia cầm.

- Các chủng virus cúm gia cầm tham chiếu trên Ngân hàng gen thế giới.

Phương pháp thực hiện

+ Phương pháp lấy và bảo quản mẫu: Thu mẫu swab hầu họng của gà, vịt, ngan và chim cút theo quy trình hướng dẫn trong QCVN 01-83:2011/ BNNPTNT [3].

+ Phát hiện sự có mặt của virus cúm gia cầm bằng phương pháp Realtime RT-PCR, ARN của virus được tách chiết bằng kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat No./ID: 52906). Mẫu ARN sau khi tách chiết sẽ được hỗn hợp với các thành phần: 2X Reaction Mix, Primer, Probe, Platinum Taq, nước, ARN của virus. Tiến hành phản ứng khuếch đại sản phẩm trong máy PCR (CFX96 Realtime System - Biorad) với chu kỳ nhiệt 50°C trong

15 phút, 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ: 95°C trong 15 giây, 60°C trong 15 giây. Đọc kết quả Ct với giá trị Ct < 35 thì mẫu dương tính, giá trị Ct ≥ 35 thì mẫu âm tính.

+ Trình tự kiểm tra: Thực hiện phản ứng Realtime RT-PCR phát hiện virus cúm typ A (xác định gen M), mẫu dương tính với cúm typ A tiếp tục kiểm tra subtype H5 và N6, theo các cặp mồi (primers) và probe như sau:

Tên mồi	Ký hiệu mồi/ probe	Trình tự (5'-3')	Tài liệu tham khảo
M	Probe	FAM-TGCAGTCTCGCTCACTGGGCACG-BHQ1	[4]
	Mồi xuôi	GACCRATCCTGTACCTCTGAC	
	Mồi ngược	AGGGCATTYTGGACAAKCGTCTA	
H5-9S	Mồi xuôi	ACATATGACTACCCACARTATTCTAG	
	Probe	FAM-TCAACAGTGGCGAGTTCCTAGCA-BHQ1	
	Mồi ngược 1	AGACCAGCTAYCATGATTGC	
N6-1	Mồi ngược 2	AAACCAGCCACTATGATTGC	
	Probe	CCCCACCAATGGGAACTG	
	Mồi xuôi	FAM-CCAATAACAGGAGGGAGCCCAGACCC-BHQ1	
	Mồi ngược	TCTAGGAATGCAAACCTTTTACC	

+ Sử dụng máy giải trình tự gen tự động Beckman Coulter CEQ 8000 (Mỹ), hoạt động theo cơ sở của phương pháp Sanger. Quá trình thực hiện giải trình tự bao gồm các bước cơ bản sau: 1) Phản ứng PCR sequencing; 2) Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự. Sản phẩm của phản ứng PCR sequencing sẽ được tinh sạch bằng Ethanol kèm theo hóa chất và hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất (Beckman Coulter - Mỹ); 3) Chuyển sản phẩm sau khi tinh sạch vào đĩa chạy mẫu để tiến hành giải trình tự; 4) Thu nhận, xử lý và phân tích dữ liệu của chuỗi gen.

Kết quả thu được được xử lý bằng phần mềm Genetyx để xử lý và thu nhận chuỗi gen cần nghiên cứu với bộ mã di truyền. Phân tích xác nhận chuỗi gen thu được thông qua chương trình Blast trên Ngân hàng gen (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Truy cập ngân hàng gen thu nhận và xác định sự tương đồng về nucleotide của các chuỗi gen tương ứng của virus với các phân đoạn gen thu được trong nghiên cứu. Thành phần amino axit của virus được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (bộ mã vi khuẩn - bacterial code) có trong ngân hàng gen và so sánh thông qua chương trình genetyx.

+ Xây dựng cây sinh học phân tử: Xây dựng cây sinh học phân tử trên cơ sở trình tự gen của chủng virus thu được bằng phần mềm MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) với giá trị bootstrap là 1.000 lần lặp lại.

+ Số liệu được phân tích bằng Excel và phần mềm GraphPad Prism 6.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phát hiện virus cúm gia cầm A/H5N6 từ mẫu dịch swab và mẫu nội tạng thu thập được

Đề tài đã tiến hành thu thập 15.248 mẫu swab và 2.830 mẫu nội tạng gà, vịt, ngan và chim cút tại một số chợ bán gia cầm sống ở 5 tỉnh biên giới

phía Bắc, gồm: Lạng Sơn, Quảng Ninh, Lai Châu, Lào Cai và Cao Bằng. Toàn bộ mẫu swab và mẫu nội tạng được tách chiết ARN, sau đó kiểm tra bằng phương pháp Realtime RT-PCR. Kết quả xác định được 1.287 mẫu swab (chiếm tỷ lệ 8,44%) và 114 mẫu nội tạng dương tính với virus cúm typ A (4,02%). Mẫu cho kết quả dương tính với virus cúm typ A tiếp tục được kiểm tra virus cúm gia cầm subtype H5 và N6 bằng Realtime RT-PCR. Kết quả được tổng hợp tại bảng 1.

Từ kết quả Realtime RT-PCR kiểm tra virus cúm A/H5N6 (bảng 1), chúng tôi đã phát hiện virus cúm A/H5N6 từ các mẫu swab gà, vịt, ngan và chim cút tại cả 5 tỉnh nghiên cứu có tỷ lệ dương tính chung là 5,79%. Còn mẫu nội tạng, phát hiện mẫu dương tính với virus cúm A/H5N6 chiếm tỷ lệ thấp hơn là 2,05%. Riêng tỉnh Lào Cai mẫu nội tạng thu thập từ những gia cầm nghi nhiễm cúm đều âm tính với virus cúm A/H5N6. Như vậy, virus cúm A/H5N6 lưu hành rất phổ biến tại các

tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam.

Kết quả chẩn đoán virus cúm A/H5N6 trên mẫu swab thu được tỷ lệ dương tính khác nhau giữa các tỉnh. Cao nhất là Lạng Sơn (8,13%), thấp nhất là Cao Bằng (3,41%). Các tỉnh Quảng Ninh, Lai Châu và Lào Cai có tỷ lệ dương tính với virus cúm A/H5N6 từ 4,70 đến 6,18%.

Kết quả sự lưu hành virus cúm gia cầm A/H5N6 trong nghiên cứu cùng với thực tế thấy xuất hiện lẻ tẻ các ổ dịch cúm H5N6 tại các địa phương, đưa ra cảnh báo nguy cơ dịch cúm gia cầm do virus cúm chủng A/H5N6 có thể xảy ra bất kỳ lúc nào, tại mọi địa điểm có nuôi và buôn bán gia cầm. Sự lưu hành virus A/H5N6 rộng kết hợp với tình trạng vận chuyển, buôn bán, giết mổ gia cầm thiếu kiểm soát tại các chợ gia cầm sống là điều kiện tiên quyết để bùng phát dịch cúm.

Chúng tôi xác định sự lưu hành virus cúm A/H5N6 theo đối tượng nghiên cứu, kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 1. Kết quả xét nghiệm virus cúm subtype H5 và N6 với mẫu swab và mẫu nội tạng bằng phương pháp Realtime RT-PCR.

Kết quả Realtime RT-PCR						
TT	Tỉnh thu mẫu	Mẫu swab			Mẫu nội tạng	
		Số mẫu kiểm tra	Số mẫu (+) với A/H5N6	Tỷ lệ (%)	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu (+) với A/H5N6
1	Lạng Sơn	2.975	242	8,13	520	26
2	Quảng Ninh	3.090	191	6,18	730	18
3	Lào Cai	3.085	145	4,70	460	0
4	Lai Châu	3.042	201	6,61	550	8
5	Cao Bằng	3.050	104	3,41	570	6
Tổng số		15.248	883	5,79	2.830	58

Bảng 2. Tỷ lệ nhiễm virus cúm A/H5N6 trong 2 năm 2015-2016 theo đối tượng nghiên cứu.

Kết quả phản ứng Realtime RT-PCR						
TT	Loài lấy mẫu	Mẫu swab			Mẫu nội tạng	
		Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính với A/H5N6	Tỷ lệ (%)	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính với A/H5N6
1	Gà	9.744	582	5,97	1.300	25
2	Vịt, ngan	4.710	258	5,48	990	24
3	Chim cút	794	43	5,42	540	9
Tổng		15.248	883	5,79	2.830	58

Kết quả Realtime RT-PCR phát hiện virus cúm A/H5N6 trên mẫu swab và mẫu nội tạng (bảng 2) theo từng đối tượng cho biết mẫu swab gà có tỷ lệ nhiễm cúm A/H5N6 là 5,97%. Còn đối tượng vịt, ngan và chim cút có tỷ lệ dương tính tương ứng là 5,48 và 5,42%, tuy nhiên tỷ lệ nhiễm này không khác biệt về mặt thống kê nên giữa các đối tượng khả năng nhiễm virus cúm A/H5N6 là như nhau. Tương tự mẫu swab, tỷ lệ nhiễm virus cúm A/H5N6 của mẫu nội tạng gà, vịt, ngan và chim cút không có sự sai khác về mặt thống kê.

Theo kết quả xét nghiệm 15.420 mẫu swab gia cầm của Cục Thú y do FAO hỗ trợ thực hiện tại 68 chợ buôn bán gia cầm sống trên địa bàn 32 tỉnh, thành phố từ tháng 12/2015 đến tháng 2/2016 cho thấy, 91% số tỉnh đã phát hiện virus cúm A, 53% số tỉnh có virus H5N6. Tỷ lệ lưu hành trên gà bán tại chợ đối với virus H5N6 là 1,32%; tỷ lệ dương tính trên vịt bán tại chợ đối với virus H5N6 là 5,32% [5]. Kết quả phát hiện virus cúm A/H5N6 trên vịt của chúng tôi cũng thu được tỷ lệ cao, khá tương đồng với giám sát trên của FAO, chứng tỏ vịt là đối tượng có tiềm ẩn nguy cơ lây nhiễm cao virus cúm A/H5N6.

Giải trình tự virus cúm gia cầm A/H5N6

Lựa chọn 10 mẫu dương tính với virus cúm A/H5N6 đem giải trình tự gen nhằm xác định đặc tính di truyền của chủng virus này tại phía Bắc Việt Nam.

Sau khi tiến hành kỹ thuật Realtime RT-PCR và thu được sản phẩm, tiến hành tinh sạch sản phẩm của phản ứng RT-PCR bằng KIT (QIAquick PCR Purification Kit của hãng Qiagen). Tinh sạch sản phẩm PCR sequence, sau đó tiến hành giải trình tự gen trực tiếp từ sản phẩm PCR sau khi tinh sạch. Quá trình giải trình tự được thực hiện bằng máy giải trình tự Beckman Coulter CEQ 8000 của Mỹ tại Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ sinh học thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Bảng 3. Danh sách các chủng virus cúm A/H5N6 được lựa chọn giải trình tự gen.

TT	Ký hiệu mẫu	Loài
1	1001QN	Gà
2	162QN	Vịt
3	835LCH	Vịt
4	931LC	Gà
5	950LS	Gà
6	1097CB	Vịt
7	1173LS	Chim cút
8	1932LCH	Gà
9	2103CB	Gà
10	2930LCH	Gà

Ghi chú: QN: Quảng Ninh; LC: Lào Cai; LS: Lạng Sơn; LCH: Lai Châu; CB: Cao Bằng.

Bảng 4. Sự tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen H5 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm A/H5N6.

	162QN	835LCH	931LC	950LS	1001QN	1097CB	1173LS	1932LCH	2103CB	2930LCH
162QN	100,00									
835LCH	97,14	100,00								
931LC	97,13	98,19	100,00							
950LS	97,77	97,15	97,35	100,00						
1001QN	98,39	96,50	97,13	98,59	100,00					
1097CB	96,46	94,93	95,59	97,55	97,32	100,00				
1173LS	98,60	97,78	97,14	98,19	98,39	96,91	100,00			
1932LCH	97,34	97,15	96,92	99,21	98,18	97,12	98,60	100,00		
2103CB	96,91	96,72	96,48	98,80	97,75	96,68	97,77	98,80	100,00	
2930LCH	98,39	96,50	97,13	98,59	99,60	97,32	98,39	98,18	97,75	100,00

Ghi chú: Mức tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen H5 giữa những chủng virus cúm gia cầm A/H5N6 nằm ở dưới đường chéo.

Bảng 5. Sự tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen N6 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm A/H5N6.

	162QN	835LCH	931LC	950LS	1001QN	1097CB	1173LS	1932LCH	2103CB	2930LCH
162QN	100,00									
835LCH	90,97	100,00								
931LC	90,23	97,36	100,00							
950LS	90,23	97,36	99,61	100,00						
1001QN	99,41	90,71	89,96	89,96	100,00					
1097CB	98,81	91,00	90,26	90,26	98,61	100,00				
1173LS	91,24	98,61	97,58	97,58	90,97	91,27	100,00			
1932LCH	89,61	98,61	96,50	96,50	89,33	89,65	97,56	100,00		
2103CB	92,15	90,61	89,59	89,59	91,90	93,09	90,34	89,26	100,00	
2930LCH	89,37	98,20	96,07	96,07	89,37	89,40	97,14	98,81	88,74	100,00

Ghi chú: Mức tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen N6 giữa những chủng virus cúm gia cầm A/H5N6 nằm ở dưới đường chéo.

Chuỗi nucleotide thu được sau khi giải trình tự được xử lý bằng các phần mềm Genetyx và SEQ 8000 trên máy tính, được xác thực bằng cách Blash trực tiếp qua Ngân hàng gen thế giới, sau đó được lưu trữ trên hệ thống máy chủ để phục vụ cho việc trích xuất và truy cứu dữ liệu.

Giải trình tự 10 chủng virus A/H5N6 thu thập được tại 5 tỉnh biên giới phía Bắc năm 2015 (bảng 3), chúng tôi thu được trình tự nucleotide đoạn H5 và N6 có độ dài lần lượt là 514 nucleotide và 513 nucleotide.

Kết quả so sánh trình tự nucleotide ở đoạn gen H5 và N6 cho thấy, giữa 10 chủng virus cúm gia cầm có sự sai khác về thành phần nucleotide và có sai khác tại 39 vị trí ở trình tự gen H5 và 74 vị trí ở trình tự gen N6.

Chúng tôi so sánh mức độ tương đồng về trình tự nucleotide gen H5 và N6 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm được thống kê tại bảng 4 và bảng 5.

Kết quả so sánh mức độ tương đồng về trình tự nucleotide gen H5 và N6 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm lần lượt là 94,93-99,60% và 88,74-99,61%.

Sau khi so sánh mức độ tương đồng về nucleotide giữa các chủng virus cúm gia cầm A/H5N6, dựa vào phần mềm MEGA6 chúng tôi tiến hành xây dựng cây sinh học phân tử để xác định nguồn gốc phát sinh của 10 chủng virus nghiên cứu. Kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh của các chủng virus nghiên cứu được thể hiện tại hình 1 và 2.

Từ kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài dựa vào sự sai khác nucleotide đoạn gen H5 và N6 của 10 chủng virus cúm là 1001QN, 162QN, 835LCH, 931LC, 950LS, 1097CB, 1173LS, 1932LCH, 2103CB, 2930LCH cho thấy: 1) 10 chủng virus mang đoạn gen H5 đều thuộc clade 2.3.4.4 và 10 chủng virus cúm nằm trong nhánh phát sinh cùng với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập được ở Lào năm 2014 và chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Trung Quốc năm



Hình 1. Cây sinh học phân tử của các chủng virus A/H5N6 nghiên cứu dựa trên trình tự nucleotide gen H5.



Hình 2. Cây sinh học phân tử của các chủng virus A/H5N6 nghiên cứu dựa trên trình tự nucleotide gen N6.

2013-2014. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu di truyền học gen HA virus cúm A/H5N6 của Nguyễn Lê Khánh Hằng và Lê Thị Quỳnh Mai (2016), tác giả đã xác định clade 2.3.4.4 là clade mới xuất hiện bao gồm các virus cúm A/H5N6, H5N8 và H5N2 lưu hành tại Việt Nam, Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản [6]; 2) 10 chủng virus cúm mang đoạn gen N6 nằm trong cùng dòng A - Âu (Eurasian lineage). Trong đó, 5 chủng virus gồm 835LCH, 1932LCH, 2930LCH, 931LC và 950LS nằm cùng

nhánh phát sinh với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Lào năm 2014 và ở Trung Quốc năm 2014. Các chủng virus 1001QN, 162QN, 1097CB và 2103CB nằm cùng nhánh phát sinh với một số chủng virus cúm A/H5N6 và H6N6 phân lập ở Việt Nam năm 2011-2014.

Kết luận

1. Kết quả kiểm tra virus cúm A/H5N6 bằng phản ứng Realtime RT-PCR với 15.248 mẫu swab và 2.830

mẫu nội tạng của gà, vịt, ngan và chim cút tại cả 5 tỉnh nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ dương tính chung từ các mẫu swab là 5,79%, từ mẫu nội tạng cho tỷ lệ dương tính với virus A/H5N6 là 2,05%. Không có sự khác nhau về nguy cơ nhiễm virus cúm A/H5N6 trên các đối tượng gà, vịt, ngan và chim cút.

2. Giải trình tự nucleotide 10 mẫu virus cúm A/H5N6, mức độ tương đồng về trình tự nucleotide gen H5 và N6 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm lần lượt là 94,93-99,60% và 88,74-99,61%.

3. Kết quả xác định 10 chủng virus mang gen H5 đều thuộc clade 2.3.4.4 và gần gũi với virus cúm A/H5N6 ở Lào và Trung Quốc. 10 chủng virus cúm chứa gen N6 nằm trong cùng dòng A - Âu (Eurasian lineage). Trong đó, 5 chủng virus cúm nằm cùng nhánh phát sinh với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Lào và Trung Quốc, số còn lại nằm cùng nhánh phát sinh với virus cúm A/H5N6 và H6N6 phân lập ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] OIE - World organisation for animal health (2005), *Avian influenza. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals*, http://www.oie.int/Eng/info_ev_en_AI_avianinfluenza.htm.
- [2] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2014), *Công điện khẩn (số 7115/CD-BNN-TY ngày 4/9/2014) về việc tăng cường các biện pháp cấp bách phòng, chống dịch cúm gia cầm H5N6 và các chủng virus cúm gia cầm khác*.
- [3] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2014), *QCVN 01-83:2011/BNNPTNT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về bệnh động vật - Yêu cầu chung lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển*.
- [4] H.G. Heine, A.J. Foord, J. Wang, S. Valdeter, S. Walker, C. Morrissey, F.Y. Wong, B. Meehan (2015), "Detection of highly pathogenic zoonotic influenza virus H5N6 by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction", *Virology Journal*, pp.12-18, doi: 10.1186/s12985-015-0250-3.
- [5] Cục Thú y (2016), *Báo cáo chuyên đề công tác thú y năm 2016 và kế hoạch công tác thú y năm 2017*.
- [6] Nguyễn Lê Khánh Hằng, Lê Thị Quỳnh Mai (2016), "Đặc điểm vi rút cúm A/H5N1 và A/H5N6 trên gia cầm tại Việt Nam 2012-2015", *Tạp chí Y tế dự phòng*, **Tập XXVI**, số **10(183)**, tr.126-134.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ N/P và độ mặn đến sự phát triển của vi khuẩn lam (*cyanobacteria*)

Nguyễn Quang Dương Nguyên, Nguyễn Phú Hòa*

Trường Đại học Nông lâm Tp Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 15/6/2017; ngày chuyển phản biện 19/6/2017; ngày nhận phản biện 24/8/2017; ngày chấp nhận đăng 31/8/2017

Tóm tắt:

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ N/P đến sự phát triển của vi khuẩn lam (VKL) ở các độ mặn khác nhau được thực hiện nhằm xác định các yếu tố môi trường có ảnh hưởng tới VKL và ảnh hưởng của tỷ lệ N/P đến sự phát triển của VKL ở các độ mặn khác nhau trong điều kiện thí nghiệm. Ba loài *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp. và *Microcystis* sp. chiếm ưu thế được phân lập từ các ao nuôi tôm được nuôi trong môi trường có các độ mặn khác nhau (0; 5; 10; 15 và 20 ppt) và các tỷ lệ N/P khác nhau (2/1; 4/1; 6/1; 8/1). Trong điều kiện thí nghiệm, loài *Anabaena* sp. phát triển tốt ở các độ mặn từ 5 ppt đến 15 ppt và phát triển tốt nhất ở độ mặn 10 ppt. Loài *Lyngbya* sp. phát triển rất mạnh trong tất cả các nhóm độ mặn, tốt nhất ở độ mặn 10 ppt. Loài *Microcystis* sp. phát triển tốt ở độ mặn từ 0 ppt đến 10 ppt, tốt nhất ở độ mặn 5 ppt. Loài *Anabaena* sp. phát triển tốt nhất ở tỷ lệ N/P = 8/1 và độ mặn 10 ppt, phát triển kém ở tỷ lệ N/P = 2/1 đến 4/1 ở độ mặn 0 ppt. Loài *Lyngbya* sp. phát triển tốt nhất ở tỷ lệ N/P = 8/1 và độ mặn 10 ppt, phát triển kém ở tỷ lệ N/P = 2/1 đến 4/1 ở độ mặn 20 ppt. Loài *Microcystis* sp. phát triển tốt nhất ở tỷ lệ N/P = 8/1 và độ mặn 5 ppt, phát triển kém ở tỷ lệ N/P = 2/1 đến 4/1 ở độ mặn 20 ppt.

Từ khóa: *Anabaena* sp., độ mặn, *Lyngbya* sp., *Microcystis* sp., tỷ lệ N/P, VKL.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Tảo được coi là có lợi cho tôm nuôi bởi chúng giúp duy trì các điều kiện môi trường thích hợp, vừa là nguồn cung cấp oxy hòa tan vừa hấp thụ ammonia [1], nhưng khi chúng phát triển quá mức sẽ gây nên sự ô nhiễm cho ao nuôi. Hậu quả của sự ô nhiễm là việc tiêu thụ oxy trong nước và ngăn cản ánh sáng xuyên qua các tầng nước thấp hơn của một lượng lớn tảo, chính điều này ảnh hưởng đến khả năng hô hấp của động vật thủy sản và các động vật dưới nước [2].

Vi khuẩn lam (VKL) còn được gọi là tảo lam, là nhóm vi sinh vật nhân nguyên thuộc vi khuẩn thật có cấu tạo gần gũi với cấu tạo của vi khuẩn Gram âm, phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Đại bộ phận VKL sống trong nước ngọt, một số phân bố trong những vùng nước mặn giàu chất hữu cơ hoặc trong nước lợ, một số sống cộng sinh. Nhiều VKL có khả năng cố định nitơ và có sức đề kháng cao với các điều kiện bất lợi, cho nên có thể gặp VKL trên các bề mặt tầng đá hoặc trong vùng sa mạc, trong các suối nước nóng có nhiệt độ cao tới 87°C, trong các vùng biển có nồng độ muối lên tới 70 ppt [3].

Nghiên cứu của Yusoff và cộng sự [4] chỉ ra rằng, hàm lượng chất dinh dưỡng quá cao, chủ yếu là hàm lượng phospho hòa tan, ammonia và nitrate là một trong các trở ngại chính ở ao nuôi tôm thâm canh. Khi ở mức cao, nguồn chất dinh dưỡng này thúc đẩy sự phát triển của thực vật thủy

sinh, dẫn đến sự phát triển quá mức của các nhóm thực vật nổi, hiện tượng nở hoa của tảo làm thay đổi cơ bản khu hệ thủy sinh vật [2]. Khi P tổng số cao ($N/P < 5$) sẽ tạo điều kiện cho tảo phát triển, nhất là nhóm VKL và tảo mắt, với mật độ tổng tảo cao nhất là 8.628.200 cá thể/lít [5].

Vì vậy nghiên cứu ảnh hưởng của độ mặn và tỷ lệ N/P trong môi trường đến sự phát triển của một số loài VKL trong điều kiện phòng thí nghiệm là cần thiết cho việc đánh giá sự phát triển của VKL trong ao nuôi tôm cũng như các thủy vực khác.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Loài *Anabaena* sp.: Mật độ ban đầu 500 sợi/ml, tương đương 5.500 tế bào/ml, tất cả các nghiệm thức đều được bố trí trong cùng nhiệt độ, ánh sáng và pH, nhiệt độ trung bình đo được tại thời điểm 9 đến 10 giờ sáng là ($34,3 \pm 0,3^\circ\text{C}$), pH ban đầu = 7,8; cường độ ánh sáng trung bình ($1.717,1 \pm 2,35$ lux), chu kỳ chiếu sáng 24/24 giờ.

Loài *Lyngbya* sp.: Mật độ ban đầu 500 sợi/ml, tương đương 5.250 tế bào/ml, tất cả các nghiệm thức đều được bố trí trong cùng nhiệt độ, ánh sáng và pH, nhiệt độ trung bình đo được tại thời điểm 9 đến 10 giờ sáng là ($33,3 \pm 0,4^\circ\text{C}$), pH ban đầu = 7,9; cường độ ánh sáng trung bình ($1.688,7 \pm 7,69$ lux), chu kỳ chiếu sáng 24/24 giờ.

Loài *Microcystis* sp.: Mật độ ban đầu 8.000 tế bào/ml,

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

The effect of the N/P ratios on the growth of cyanobacteria at different salinities

Quang Duong Nguyen Nguyen, Phu Hoa Nguyen*

Nong Lam University Ho Chi Minh City

Received 15 June 2017; accepted 31 August 2017

Abstracts:

The study “The effect of the N/P ratios on the growth of cyanobacteria at different salinities” was conducted to identify the effect of N/P ratio to the development of cyanobacteria in various saline levels in the experiment conditions. The three prevailing species, *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp., and *Microcystis* sp., which were isolated from the shrimp ponds, were cultured in the conditions of different salinities (0, 5, 10, 15, and 20 ppt) and different N/P ratios (2/1, 4/1, 6/1, and 8/1). In the experimental conditions, *Anabaena* sp. thrived well in the salinity of 5 ppt to 15 ppt and developed the best in 10 ppt. *Lyngbya* sp. thrived in all the ratios of salinity and grew best at 10 ppt. *Microcystis* sp. thrived in salinities from 0 ppt to 10 ppt and grew best at the salinity of 5 ppt. *Anabaena* sp. grew best in the N/P ratio = 8/1 and 10 ppt salinity, grew poorly in the N/P ratio = 2/1 to 4/1 and the salinity of 0 ppt. *Lyngbya* sp. grew best in the N/P ratio = 8/1 and 10 ppt salinity, grew slowly in the N/P ratio = 2/1 to 4/1 and the salinity of 20 ppt. *Microcystis* sp. grew best in the N/P ratio = 8/1 and 5 ppt salinity, grew badly in the N/P ratio = 2/1 to 4/1 and the salinity of 20 ppt.

Keywords: *Anabaena* sp., cyanobacteria, *Lyngbya* sp., *Microcystis* sp., N/P ratio, salinity.

Classification number: 4.5

tất cả các nghiệm thức đều được bố trí trong cùng nhiệt độ, ánh sáng và pH, nhiệt độ trung bình đo được tại thời điểm 9 đến 10 giờ sáng là (34±0,7°C), pH ban đầu = 7,9; cường độ ánh sáng trung bình (1.692,5±11,8 lux), chu kỳ chiếu sáng 24/24 giờ.

Phương pháp bố trí thí nghiệm

Khảo sát tăng trưởng của VKL nuôi trong môi trường có tỷ lệ N/P khác nhau, thí nghiệm được bố trí gồm 20 nghiệm thức, biến số độ mặn tương ứng với 5 mức (0, 5, 10, 15, 20 ppt) và biến số tỷ lệ N/P với 4 mức (2/1, 4/1, 6/1, 8/1), với 3 lần lặp lại. Các nghiệm thức đều dùng chung môi trường Walne (có tỷ lệ N/P = 4/1), các nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 2/1; 6/1; 8/1 được pha bằng cách bổ sung thêm N hoặc P vào môi trường Walne cho đúng tỷ lệ [bổ sung P bằng potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄) và N bằng sodium nitrat

(NaNO₃)]. Tất cả các nghiệm thức đều được bố trí với 3 lần lặp lại.

Chỉ tiêu theo dõi

Mật độ của VKL theo đơn vị tế bào/ml, biến động sau mỗi 2 ngày, từ ngày 0 (ngày bố trí) đến ngày thứ 12 là kết thúc thí nghiệm.

Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Các số liệu sau khi thu thập, xử lý bằng các phương pháp thống kê như phân tích tương quan và hồi quy với hệ số tương quan Pearson, phân tích phương sai, tương quan đa biến, sử dụng trắc nghiệm Duncan, Bonferroni. Vì số liệu gốc là số đếm và phân bố rất rộng nên khi xử lý thống kê đã được chuyển về dạng logarit, phần mềm thống kê sử dụng là SPSS 19.0. Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Excel và SPSS 19.0.

Kết quả và thảo luận

Sự tăng trưởng của loài *Anabaena* sp. trong môi trường có tỷ lệ N/P và độ mặn khác nhau

Kết quả phân tích thống kê ảnh hưởng giữa các tỷ lệ N/P và độ mặn khác nhau đến tăng trưởng của loài *Anabaena* sp. cho thấy, mật độ trung bình của loài *Anabaena* sp. ở nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 8/1 và độ mặn 10 ppt đạt cao nhất và có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Mật độ trung bình của loài *Anabaena* sp. ở 2 nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 2/1 và độ mặn 0 ppt, tỷ lệ N/P = 4/1 và độ mặn 0 ppt đạt thấp nhất, giữa 2 nghiệm thức này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

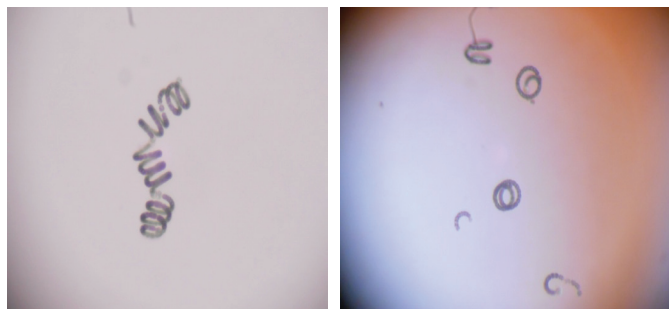
Bảng 1. Mật độ trung bình *Anabaena* sp. trong môi trường có tỷ lệ N/P và độ mặn khác nhau.

N/P x Mặn	Mật độ trung bình <i>Anabaena</i> sp. (x 10 ³ tế bào/ml)				
	0 ppt	5 ppt	10 ppt	15 ppt	20 ppt
2/1	122,51±40,60 ^{ax}	600,05±40,60 ^{bx}	1.535,96±40,60 ^{cx}	403,98±40,60 ^{dx}	168,82±40,60 ^{ex}
4/1	118,69±0,60 ^{ax}	590,85±40,60 ^{bx}	1.570,45±40,60 ^{cx}	431,91±40,60 ^{dx}	169,86±40,60 ^{ex}
6/1	152,28±40,60 ^{ay}	663,51±40,60 ^{by}	1.773,74±40,60 ^{cy}	806,48±40,60 ^{dy}	227,95±40,60 ^{ey}
8/1	188,67±40,60 ^{az}	912,76±40,60 ^{bz}	2.050,00±40,60 ^{cz}	1.049,96±40,60 ^{dz}	263,02±40,60 ^{ez}

Ghi chú: Số liệu trong bảng là giá trị trung bình tổng các lần thu mẫu ±SE. Các giá trị trên cùng một hàng (a,b,c,d,e) và một cột (x,y,z) nếu có các ký tự giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Kết quả thống kê là của các số liệu đã chuyển về dạng logarit.

Xét sự biến động mật độ của loài *Anabaena* sp. nuôi cấy trong điều kiện thí nghiệm theo ngày thu mẫu, mật độ cao nhất đạt được là (4.127,05±459,00)x10³ tế bào/ml ở nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 8/1 và độ mặn 10 ppt vào ngày nuôi thứ 12. Môi trường kém thuận lợi nhất cho sự phát triển của loài *Anabaena* sp. trong nghiên cứu này là tỷ lệ N/P = 2/1 và 4/1 ở độ mặn 0 ppt, ở trong môi trường này, hình dạng sợi của *Anabaena* sp. cũng bị phân cắt nhỏ hơn bình thường (bảng

1, hình 1).

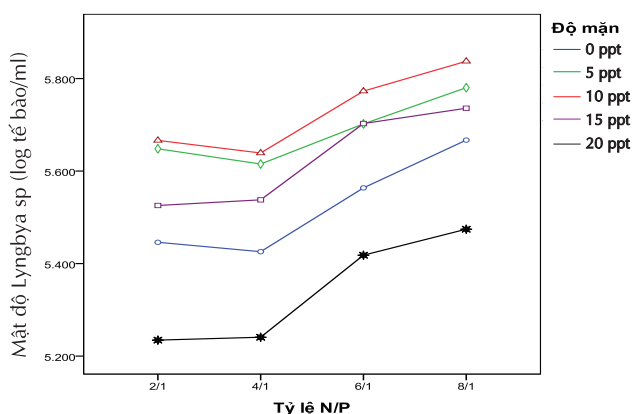


Hình 1. Sợi *Anabaena* sp. khỏe mạnh và sợi bị phân cắt nhỏ (độ phóng đại x 40).

Vào ngày nuôi cấy thứ 6, mật độ trung bình loài *Anabaena* sp. đạt cao nhất ở nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 4/1 và độ mặn 10 ppt; từ ngày thu mẫu thứ 8 đến ngày thu mẫu thứ 12, mật độ trung bình loài *Anabaena* sp. đạt cao nhất ở nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 8/1 và độ mặn 10 ppt, kể đến là nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 6/1 và độ mặn 10 ppt. Điều này cho thấy, dù môi trường có độ mặn phù hợp nhất cho sự tăng trưởng loài *Anabaena* sp. là 10 ppt, nhưng nếu tỷ lệ N/P không tăng lên 6/1 đến 8/1 thì với môi trường ban đầu có tỷ lệ N/P = 4/1, mật độ trung bình loài *Anabaena* sp. tuy vẫn có tăng trưởng theo thời gian nhưng mật độ không cao, đây là vấn đề rất có ý nghĩa khi vận dụng vào thực tế nuôi tôm.

Sự tăng trưởng của loài *Lyngbya* sp. trong môi trường có tỷ lệ N/P và độ mặn khác nhau

Giống như với loài *Anabaena* sp., kết quả phân tích thống kê ảnh hưởng giữa các tỷ lệ N/P và độ mặn khác nhau đến tăng trưởng của loài *Lyngbya* sp. cho thấy, mật độ trung bình của loài *Lyngbya* sp. ở nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 8/1 và độ mặn 10 ppt đạt cao nhất và có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Mật độ trung bình của loài *Lyngbya* sp. ở 2 nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 2/1 và độ mặn 0 ppt, tỷ lệ N/P = 4/1 và độ mặn 0 ppt đạt thấp nhất, giữa 2 nghiệm thức này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) (hình 2).



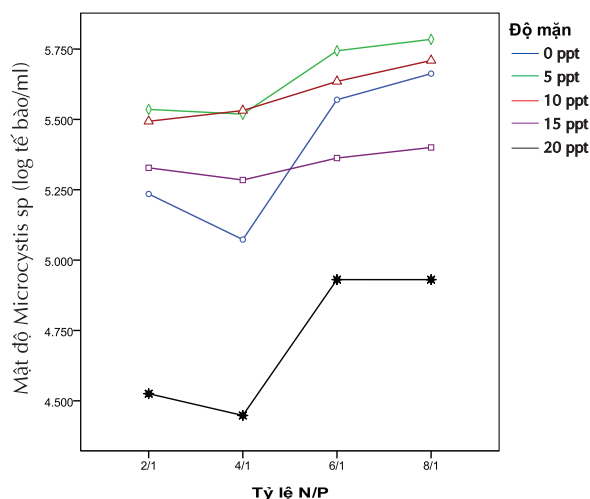
Hình 2. Biến động mật độ trung bình loài *Lyngbya* sp. trong môi trường có tỷ lệ N/P và độ mặn khác nhau.

Xét sự biến động mật độ của loài *Lyngbya* sp. nuôi cấy trong điều kiện thí nghiệm theo ngày thu mẫu, mật độ cao nhất đạt được là $(4.012,18 \pm 164,00) \times 10^3$ tế bào/ml ở nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 8/1 và độ mặn 10 ppt vào ngày nuôi thứ 12. Môi trường kém thuận lợi nhất cho sự phát triển của loài *Lyngbya* sp. trong nghiên cứu này là tỷ lệ N/P = 2/1 và 4/1 ở độ mặn 20 ppt.

Ở loài *Lyngbya* sp., ảnh hưởng của tỷ lệ N/P lên sự tăng trưởng rất rõ nét, từ ngày nuôi cấy cho đến ngày kết thúc thí nghiệm, các nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 8/1 mật độ trung bình của loài *Lyngbya* sp. phát triển mạnh hơn các nghiệm thức có tỷ lệ N/P thấp hơn trong tất cả các độ mặn khảo sát. Điều này cho thấy trong giới hạn của nghiên cứu, tỷ lệ N/P tỷ lệ thuận với sự phát triển của loài *Lyngbya* sp.

Sự tăng trưởng của loài *Microcystis* sp. trong môi trường có tỷ lệ N/P và độ mặn khác nhau

Kết quả phân tích thống kê về mối quan hệ giữa các tỷ lệ N/P cho thấy, mật độ trung bình loài *Microcystis* sp. đạt cao nhất ở nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 8/1 và độ mặn 5 ppt, cao tiếp theo là ở nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 6/1 và độ mặn 5 ppt, tuy nhiên giữa hai nghiệm thức này, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Mật độ trung bình loài *Microcystis* sp. thấp nhất các nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 2/1 và N/P = 4/1 ở cùng độ mặn 20 ppt và giữa 2 nghiệm thức này, sự khác biệt cũng không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) (hình 3).



Hình 3. Biến động mật độ trung bình *Microcystis* sp. trong môi trường có tỷ lệ N/P và độ mặn khác nhau.

Xét sự biến động mật độ của loài *Microcystis* sp. nuôi cấy trong điều kiện thí nghiệm theo ngày thu mẫu, mật độ cao nhất đạt được là $(4.040,44 \pm 286,00) \times 10^3$ tế bào/ml ở ngày nuôi cấy thứ 10. Môi trường kém thuận lợi nhất cho sự phát triển của loài *Microcystis* sp. là tỷ lệ N/P = 2/1, N/P =

4/1 và độ mặn 20 ppt.

Đối với loài *Microcystis* sp., trong phạm vi nghiên cứu, do các nghiệm thức có tỷ lệ N/P = 8/1 và N/P = 6/1 không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) nên ảnh hưởng của tỷ lệ N/P càng lớn, khi tỷ lệ này tăng đến 6/1 thì mật độ trung bình của loài *Microcystis* sp. đã tăng lên rất cao.

Thảo luận

Xét về tỷ lệ N/P = 2/1 ở tất cả các thí nghiệm, không thấy có sự tăng lên có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) ở tất cả các loài VKL khảo sát so với tỷ lệ gốc là N/P = 4/1 (môi trường Walne). Nghiên cứu của [5] cho rằng, khi P tổng số cao ($N/P < 5$) sẽ tạo điều kiện cho tảo phát triển, nhất là nhóm VKL và tảo mắt. Theo chúng tôi, sở dĩ có sự khác biệt này vì trong tự nhiên, rất nhiều loài tảo cùng phát triển trong một thủy vực, khi tỷ lệ N/P giảm xuống, những loài không có khả năng cố định đạm sẽ thiếu dinh dưỡng và tự suy yếu, nhường chỗ cho VKL. Còn trong điều kiện thí nghiệm này, tuy tỷ lệ N/P giảm nhưng là do tăng P chứ N vẫn không thay đổi, với chỉ một loài VKL, hiện tượng này không xảy ra. Nhận định này cũng phù hợp với một số tác giả khác như [6], khi N/P cao, tức P của môi trường thấp, tế bào đòi hỏi cung cấp P, lúc này tảo lục chiếm ưu thế hơn các nhóm khác bởi khả năng sinh trưởng cao hơn của chúng, khi tỷ lệ N/P thấp, một số VKL có thể phát triển mạnh vì chúng có khả năng tổng hợp nitơ của khí trời. Tương tự, nghiên cứu của [7] cho rằng, VKL có mối liên hệ chặt chẽ với nồng độ N và P trong thủy vực hơn là các loại tảo khác. Điều này có nghĩa là chúng có thể cạnh tranh mạnh hơn các nhóm tảo khác ở điều kiện môi trường N và P bị giới hạn. Còn theo [1, 8, 9], nhu cầu P không lớn nhưng P là yếu tố không thể thiếu được trong quá trình nuôi tảo. Tảo silic, VKL và tảo lục phát triển mạnh ở hàm lượng P từ 0,1 mg/l, phát triển yếu ở hàm lượng 0,005 mg/l [10]. Trong thí nghiệm của chúng tôi, với 0,3 ml môi trường Walne (chứa 3,97 g/l P) cho một bình nuôi tảo chứa 300 ml môi trường, hàm lượng P trong 1 bình tảo tối thiểu bằng 1,19 mg/l cho tất cả các nghiệm thức, như vậy hàm lượng P ở tất cả các nghiệm thức đã luôn cao hơn nhu cầu, do vậy khi tăng thêm cũng không thấy khác biệt.

Trong ba loài nghiên cứu, mật độ trung bình của hai loài *Anabaena* sp. và *Lyngbya* sp. đạt cao nhất ở tỷ lệ N/P = 8/1, so với tỷ lệ N/P = 6/1 thì sự khác biệt này là có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); nhưng ở loài *Microcystis* sp., dù mật độ trung bình đạt cao nhất ở tỷ lệ N/P = 8/1, nhưng so với tỷ lệ N/P = 6/1 thì sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$), điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của [11], VKL cố định đạm (*Anabaena* sp. và *Lyngbya* sp.) thường phát triển mạnh trong môi trường có tỷ lệ N/P cao hơn so với các loài không cố định đạm (*Microcystis* sp.). Sự khác biệt trong tỷ lệ N/P giữa các ngành và họ của phiêu sinh thực vật cũng khác nhau đáng kể.

Trong thí nghiệm nuôi cấy loài *Microcystis* sp. khi mật độ trung bình tăng đến khoảng (4×10^6 tế bào/ml) vào ngày

thu mẫu thứ 10, thì sau đó mật độ giảm lại, trong khi với loài *Anabaena* sp. và loài *Lyngbya* sp., đến ngày thu mẫu thứ 12 mới đạt được ngưỡng mật độ này, có thể đây là mức giới hạn về mật độ trong điều kiện nuôi cấy của nghiên cứu, theo chúng tôi, có thể lúc này dinh dưỡng trong môi trường không còn đủ để VKL phát triển thêm.

Kết luận

Trong điều kiện thí nghiệm, độ mặn và tỷ lệ N/P có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của các loài VKL. Loài *Anabaena* sp. và loài *Lyngbya* sp. phát triển tốt ở độ mặn 10 ppt và tỷ lệ N/P là 8/1, nhưng loài *Anabaena* sp. phát triển kém ở tỷ lệ N/P = 2/1 đến 4/1 và độ mặn 0 ppt, loài *Lyngbya* sp. phát triển kém ở tỷ lệ N/P = 2/1 đến 4/1 và độ mặn 20 ppt. Đối với loài *Microcystis* sp. lại phát triển tốt ở độ mặn từ 0 ppt đến 10 ppt, tốt nhất ở độ mặn 5 ppt với tỷ lệ N/P = 8/1, phát triển kém ở tỷ lệ N/P = 2/1 đến 4/1 và độ mặn 20 ppt. Vì vậy đây là cơ sở để quản lý môi trường nhằm hạn chế sự phát triển của VKL, phục vụ nuôi trồng thủy sản nói chung, con tôm nói riêng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.E. Boyd (1998), "Water Quality for Pond Aquaculture", *Research and Development Series*, **43**, p.37.
- [2] Nguyễn Phú Hòa (2012), *Chất lượng môi trường nước trong nuôi trồng thủy sản*, Nxb Nông nghiệp, TP. Hồ Chí Minh.
- [3] Đặng Thị Hoàng Oanh (2008), *Giáo trình vi sinh đại cương*, Trường Đại học Cần Thơ, tr.24-26.
- [4] F.M. Yusoff, A.T. Law and J. Soon (2003), "Effects of aeration and chemical treatments on nutrient release from the bottom sediment of tropical marine shrimp ponds", *Asian Fisheries Society*, **16**, pp.41-50.
- [5] Lưu Đức Điền, Nguyễn Văn Hảo, Đặng Ngọc Thuý và Thới Ngọc Bảo (2012), *Đánh giá hiện trạng chất lượng nước các ao nuôi tôm thâm canh ở huyện Trần Đề, tỉnh Sóc Trăng*, Trung tâm Quốc gia quan trắc cảnh báo môi trường và phòng ngừa dịch bệnh thủy sản khu vực Nam Bộ, Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II.
- [6] D.W. Schindler (1977), "Evolution of Phosphorus limitation in Lakes", *Science New Series*, **195(4275)**, pp.260-262.
- [7] L.R. Mur, et al. (1999), "Chapter 2. Cyanobacteria in the Environment", *Toxic of Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, Eds. I. Chorus and J. Bartram.
- [8] N. DePauw (1981), "Use and production of microalgae as food for nursery bivalves", *Nursery Culturing of Bivalve Molluscs*, C. Claus, N. DePauw, and E. Jaspers (eds.), Spec. Publ., **7**, pp.35-69.
- [9] S.D. Utting (1985), "Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance", *Aquacultural Engineering*, **4(3)**, pp.175-190. doi: 10.1016/0144- 8609(85)90012-3.
- [10] Hoàng Thị Bích Mai (2005), *Biến động thành phần loài và số lượng thực vật nổi trong ao nuôi tôm sú tại Khánh Hòa*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Trường Đại học Thủy sản, TP. Nha Trang, Việt Nam.
- [11] D. Jason (2011), *Limiting Nutrients to Control Blue-Green Algae in Aquaculture Ponds*, <http://www.water-research.net>.

Phát hiện và giám định nhanh vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn bằng kỹ thuật PCR

Dương Thị Nguyên¹, Trịnh Xuân Hoat^{2*}

¹Trường Đại học Nông lâm, Đại học Thái Nguyên

²Viện Bảo vệ thực vật, VAAAS

Ngày nhận bài 7/9/2017, ngày chuyển phản biện 11/9/2017, ngày nhận phản biện 6/10/2017, ngày chấp nhận đăng 18/10/2017

Tóm tắt:

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là một trong những loại cây trồng quan trọng ở Việt Nam, cung cấp tinh bột và nguyên liệu thô phục vụ sản xuất nhiên liệu sinh học. Bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn do *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gây ra, đã ảnh hưởng đến sản xuất sắn tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR đã được áp dụng với 2 cặp primer rpoD_17F/rpoD_1005R và XgyrconpcrF1/Xgyrconpcr1 đặc hiệu cho gen *rpoD* và *gyrB* tương ứng và sử dụng ADN tổng số được chiết xuất trực tiếp từ vết bệnh không qua bước phân lập và nuôi cấy vi khuẩn gây bệnh trên môi trường nhân tạo. Hai cặp primer đã khuếch đại đoạn ADN khoảng 900 bp từ 30 mẫu lá biểu hiện triệu chứng bệnh vi khuẩn tàn lụi. Sản phẩm PCR được giải trình tự trực tiếp và kết quả cho thấy, tất cả các trình tự ADN đều đồng nhất. Kết quả phân tích dựa trên trình tự gen *rpoD* hoặc *gyrB* đều có độ tương đồng 100% với 2 gen này của vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *manihotis* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi tại Đồng Nai (mã số MF774491 và MF774490 đối với gen *rpoD* và *gyrB*, tương ứng) và trên thế giới. Phân tích ADN và cây phả hệ đã khẳng định vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *manihotis* là nguyên nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn tại huyện Krông Pắc, M'Đrăk và Ea Kar, tỉnh Đắk Lắk. Đây là quy trình nhanh, có độ nhạy cao trong việc phát hiện và định loại loài *X. axonopodis* pv. *manihotis* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn không qua bước phân lập, nuôi cấy và làm thuần vi khuẩn gây bệnh.

Từ khóa: Bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn, *gyrB*, PCR, *rpoD*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) với hàm lượng tinh bột cao (chiếm khoảng 30-60%) tổng lượng chất khô đã trở thành một trong những cây trồng quan trọng nhất trên thế giới, là nguồn thực phẩm và cung cấp nguyên liệu cho các ngành công nghiệp với nhiều mục đích khác nhau. Ở Việt Nam, cây sắn được coi là cây trồng cung cấp lương thực, nguồn tinh bột và nguyên liệu thô cho sản xuất ethanol sinh học... Đặc điểm quan trọng nhất của cây sắn là chịu được hạn hán và do đó được trồng rộng rãi ở các vùng miền núi, loại đất cận biên, nơi không có hệ thống tưới tiêu, nhu cầu phân bón thấp.

Tuy nhiên, trong những năm gần đây, sản xuất sắn ở Việt Nam đã bị ảnh hưởng bởi nhiều loại sâu, bệnh khác nhau, đặc biệt là rệp sáp bột hồng (*Phenacoccus manihoti*), bệnh chổi rồng (Cassava witches' broom - CaWB), bệnh thán thư (*Colletotrichum gloeosporioides*), bệnh vi khuẩn tàn lụi (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* - Xam) và bệnh vi rút khảm lá sắn (Cassava mosaic virus - CaMV). Ngoài bệnh chổi rồng và bệnh vi rút khảm lá sắn, thì bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn cũng được xem là một trong những bệnh quan trọng, ảnh hưởng đến cây sắn từ giai đoạn trồng đến

thu hoạch và có thể làm giảm sản lượng sắn lên đến 100% [1, 2].

Các phương pháp truyền thống để chẩn đoán và giám định vi khuẩn gây bệnh thực vật chủ yếu là nuôi cấy và phân tích khuẩn lạc trên đĩa môi trường, phản ứng sinh hóa, phân tích các axit béo và lây nhiễm nhân tạo [3-5]. Tuy nhiên, các phương pháp này thường tốn nhiều thời gian và có độ đặc hiệu thấp.

PCR và phân tích ADN đã trở thành công cụ hữu hiệu để phát hiện và giám định tác nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn như PCR [6], RAPDs [7], RFLPs [8], AFLP [9], nested-PCR và dot-blot assay [10, 11]. Tuy nhiên, những phương pháp này thường vẫn phải thực hiện bước phân lập, nuôi cấy và làm thuần vi khuẩn gây bệnh trên môi trường nhân tạo; và ADN của vi khuẩn được chiết xuất từ dung dịch môi trường lỏng nuôi cấy vi khuẩn.

Để phát triển kỹ thuật giám định nhanh tác nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn, kỹ thuật PCR đã được áp dụng với hai cặp primer đặc hiệu cho gen *rpoD* và *gyrB* sử dụng ADN chiết xuất trực tiếp từ vết bệnh mà không qua bước phân lập, nuôi cấy, làm thuần và nhân sinh khối vi khuẩn gây bệnh.

*Tác giả liên hệ: Tel: 0912363688; Email: trinxuanhoatppri@gmail.com

Rapid detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing cassava bacterial blight based on PCR technique

Thi Nguyen Duong¹, Xuan Hoat Trinh^{2*}

¹College of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University

²Plant Protection Research Institute, VAAS

Received 7 September 2017; accepted 18 October 2017

Abstract:

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most important crops in Vietnam, providing food, starch sources, and raw materials for production of bio-fuel. Cassava bacterial blight disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) has affected cassava production in Vietnam. In the present study, PCR technique applied the primers rpoD_17F/rpoD_1005R and XgyrconpcrF1/Xgyrconpcr1 specific for *rpoD* and *gyrB* genes, respectively with genomic DNAs extracted directly from the symptomatic leaves without isolation and pure culture of the causal bacterium. The two primer pairs amplified amplicons of about 900 bp from the 30 symptomatic leaf samples collected from Krong Pac, M'Drak, and Ea Kar districts of Dak Lak province. The amplified DNA sequences were identical in each gene and shared 100% similarity to that of Xam. Phylogenetic trees were constructed with the sequences of *rpoD* and *gyrB* genes of different *Xanthomonas* species from GenBank. The results indicated that the bacterial species analysed by either *rpoD* or *gyrB* as the target genes showed 100% identity with that of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing cassava bacterial blight disease in Dong Nai, Vietnam (Accession numbers: MF774491 and MF774490, respectively) and in some other countries. DNA and phylogenetic analysis based on the sequences of *rpoD* and *gyrB* genes have confirmed that *X. axonopodis* pv. *manihotis* is the causal agent of cassava bacterial blight in Krong Pak, M'Drak, and Ea Kar districts of Dak Lak province, Vietnam. The protocol in this study is rapid and sensitive for detection and identification of *X. axonopodis* pv. *manihotis* without isolation and pure culture of the causal bacterium.

Keywords: Cassava bacterial blight, *gyrB*, PCR, *rpoD*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Classification number: 4.6

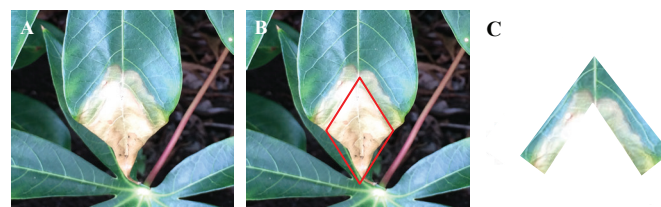
Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

30 mẫu lá sắn biểu hiện triệu chứng bệnh vi khuẩn tàn lụi đã được thu thập tại các huyện Krông Pắc, M'Đrăk và Ea Kar của tỉnh Đắk Lắk trong tháng 8/2017.

Chiết xuất ADN tổng số và phân tích gen

ADN tổng số được chiết xuất từ mẫu lá sắn bao gồm một phần mô khỏe và mô bệnh (như mô tả ở hình 1) bằng phương pháp CTAB theo J.J. Doyle và J.L. Doyle (1990) [12].



Hình 1. Thu thập, lựa chọn mẫu phục vụ chiết xuất ADN trực tiếp từ mô lá sắn bị nhiễm bệnh vi khuẩn tàn lụi.

(A) Triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi thu thập trên đồng ruộng; (B) Loại bỏ mô lá bị hoại tử, có màu nâu (giới hạn trong hình thoi màu đỏ); (C) Chỉ sử dụng mô khỏe xung quanh viền vết bệnh và mô bệnh còn mới, có màu xanh tái phục vụ chiết xuất ADN.

Nồng độ ADN tổng số được đo bằng máy UV-Vis Spectrophotometer Optima SP-3000Nano (Indonesia) và được điều chỉnh thành nồng độ cuối cùng là 20 ng/μl cho tất cả các mẫu. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cặp primer đặc hiệu cho gen *rpoD* rpoD_17F (5'-ATCTGACCTACGCCGAAGTC-3')/rpoD_1005R (5'-CTGCTGCTCGGAGATGATCT-3') đã được thiết kế và sử dụng bởi Kone và cs (2015) [13]; và cặp primer đặc hiệu cho gen *gyrB*, XgyrconpcrF1 (5'-AAGAGCGAGCTGTATCTGAAGGACGA-3')/Xgyrconpcr1 (5'-CGCGTCCTCGATGCGCACCTGCA-3') đã được thiết kế và sử dụng bởi Parkinson và cs (2007) [14].

Phản ứng PCR được thực hiện trong 25 μl dung dịch phản ứng, gồm 2,5 μl 10×PCR buffer (bao gồm 15 mM MgCl₂), 0,75 μl mỗi loại primer (10 μM), 2 μl dNTP mix (2,5 mM each), 0,125 μl Taq polymerase, 1 μl ADN tổng số (20 ng/μl) và điều chỉnh H₂O thành 25 μl. Mẫu ADN chiết xuất từ dung dịch nuôi cấy vi khuẩn Xam phân lập tại Đồng Nai làm đối chứng dương, ADN chiết xuất từ mẫu lá sắn khỏe và nước cất làm đối chứng âm. Điều kiện nhiệt độ cho phản ứng PCR bao gồm 4 phút tại 94°C, 35 chu kỳ với 94°C trong 30 s, Tm (50°C trong 45 s đối với cặp primer XgyrconpcrF1/Xgyrconpcr1 và 60°C trong 30 s đối với cặp primer rpoD_17F/rpoD_1005R) và 72°C trong 1 phút [13, 14] bằng thiết bị Mastercycler Pro (Eppendorf, Đức). Sản

phẩm PCR được điện di bằng 1% agarose gels trong 1×TAE buffer có chứa 0,5 µg/ml ethidium bromide và chụp ảnh bằng UV light of GelDoc-It® 310 Imaging System (United Kingdom).

Sản phẩm PCR được tinh sạch từ agarose gel sử dụng QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Đức) và được giải trình tự gen trực tiếp cả hai chiều bằng máy ABI3100 của Hàn Quốc sử dụng BigDye Terminator 3.1 Kit (Applied Biotech). Trình tự các mẫu được so sánh với Ngân hàng gen bằng phần mềm trực tuyến <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; cây phả hệ xây dựng theo phương pháp Neighbor-joining với khoảng cách di truyền giữa các chuỗi được xác định dựa trên mô hình thay thế Kimura hai tham số, giá trị thống kê bootstrap (%) với 1.000 lần lặp lại trong phần mềm MEGA 6.0 [15].

Kết quả và thảo luận

Kết quả thu thập mẫu bệnh và triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn

Bảng 1. Kết quả thu thập mẫu bệnh vi khuẩn tàn lụi tại Đắk Lắk năm 2017

TT	Ký hiệu mẫu	Vị trí thu mẫu
1	EKBKPD1	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
2	EKBKPD2	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
3	EKBKPD3	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
4	EKBKPD4	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
5	EKBKPD5	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
6	EKBKPD6	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
7	ESEKDL1	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
8	ESEKDL2	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
9	ESEKDL3	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
10	ESEKDL4	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
11	ESEKDL5	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
12	ESEKDL6	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
13	KAMDDL1	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
14	KAMDDL2	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
15	KAMDDL3	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
16	KAMDDL4	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
17	KAMDDL5	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
18	KAMDDL6	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
19	QL26MDDL1	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
20	QL26MDDL2	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
21	QL26MDDL3	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
22	QL26MDDL4	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
23	QL26MDDL5	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
24	QL26MDDL6	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
25	QTMDDL1	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
26	QTMDDL2	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
27	QTMDDL3	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
28	QTMDDL4	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
29	QTMDDL5	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
30	QTMDDL6	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk

Trong tháng 8/2017, đã thu thập 30 mẫu lá sắn biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn tại tỉnh Đắk Lắk, bao gồm 6 mẫu tại xã Ea K'ly, huyện Krông Pắc; 6 mẫu tại xã Ea Sar, huyện Ea Kar; 6 mẫu tại xã Krông Á, huyện M'Đrăk; 6 mẫu tại Quốc lộ 26, huyện M'Đrăk; 6 mẫu tại đường Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, huyện M'Đrăk (bảng 1).

Tất cả các mẫu đều có chung triệu chứng bệnh như: Bệnh có thể xuất hiện từ đầu lá hoặc mép lá và lan rộng vào phía trong phiến lá tạo thành vết bệnh có kích thước lớn và về sau vết bệnh có thể chiếm hết diện tích của lá. Vết bệnh thường có màu nâu, loang lổ; phần tiếp giáp với viền vết bệnh thường có màu xanh xám; phần mô khỏe giáp viền vết bệnh có thể có màu vàng (hình 2).



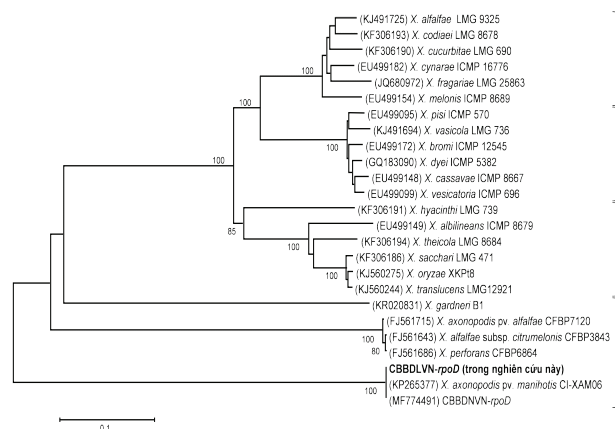
Hình 2. Triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn thu thập tại huyện Krông Pắc, M'Đrăk và Ea Kar, tỉnh Đắk Lắk trong tháng 8/2017.

Phát hiện và xác định vi khuẩn tàn lụi dựa trên trình tự đoạn gen rpoD

Các sản phẩm PCR với chiều dài khoảng 900 bp được khuếch đại bằng cặp primer rpoD_17F/rpoD_1005R từ 30 mẫu lá sắn biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn và mẫu ADN chiết xuất từ vi khuẩn *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn phân lập tại Đồng Nai (đối chứng dương), trong khi không có sản phẩm PCR nào được khuếch đại từ mẫu lá khỏe và mẫu nước (đối chứng âm) (số liệu không thể hiện). Tất cả 30 sản phẩm PCR được chiết xuất từ gel agarose và được giải mã trực tiếp cả hai chiều bằng các primer rpoD_17F và rpoD_1005. Kết quả giải trình tự cho thấy, các trình tự ADN của tất cả 30 sản

phẩm PCR đều đồng nhất và mẫu đại diện được ký hiệu là CBBDLVN-*rpoD* (Cassava Bacterial Blight in Dak Lak, Vietnam, gen *rpoD*).

Kết quả tìm kiếm BLAST cho thấy, CBBDLVN-*rpoD* có độ tương đồng 100% với trình tự đoạn gen *ropD* của *Xam* có mã số Ngân hàng gen KP265372, FJ561609, FJ561607 và MF774491; trong số đó, MF774491 là *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản tại Đồng Nai, Việt Nam.



Hình 3. Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp neighbour-joining, so sánh trình tự đoạn gen *rpoD* của vi khuẩn gây bệnh tàn lụi sản tại Đắk Lắk (CBBDLVN-*rpoD*) với 23 đoạn trình tự gen *rpoD* của vi khuẩn *Xam* khác nhau từ Ngân hàng gen và của vi khuẩn *Xam* phân lập từ Đồng Nai (CBBDNVN-*rpoD*, mã số MF774491). Mã số Ngân hàng Gen được ghi trong dấu ngoặc đơn.

Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen *rpoD* của vi khuẩn phân lập tại Đắk Lắk (CBBDLVN-*rpoD*) với 23 đoạn trình tự gen *rpoD* của các loài vi khuẩn khác nhau thuộc *Xanthomonas* từ Ngân hàng gen và vi khuẩn *Xam* phân lập từ Đồng Nai (CBBDNVN-*rpoD*, mã số MF774490) bằng phương pháp neighbour-joining với 1.000 bootstrap trong phần mềm MEGA6.0.

Các loài *Xam* phân nhánh đầu tiên bao gồm CBBDNVN-*rpoD* của Đồng Nai (mã số MF774490), CI-XAM06 (mã số KP265377), CBBDLVN-*rpoD* (trong nghiên cứu này), *X. perforans* CFBP6864 (mã số FJ561686), *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* CFBP3843 (mã số FJ561643) và *X. axonopodis* pv. *alfalfae* (mã số FJ561715).

Các loài *Xam* còn lại chia thành 3 nhóm chính khác nhau. Nhóm I với giá trị bootstrap là 85% bao gồm *X. translucens* LMG12921 (mã số KJ560244), *X. oryzae* XKPt8 (mã số KJ560275), *X. sacchari* LMG 471 (mã số KF306186), *X. theicola* LMG 8684, *X. albilineans* ICMP 8679 (mã số EU499149) và *X. hyacinthi* LMG 739 (mã số KF306191). Nhóm II với giá trị bootstrap 100% bao gồm *X. vesicatoria* ICMP 696 (EU499099), *X. cassavae* LMG 8667

(mã số EU499148), *X. dyei* ICMP 5382 (mã số GQ183090), *X. bromi* ICMP 12545 (mã số EU499172), *X. vasicola* LMG 736 (mã số KJ491694) và *X. pisi* ICMP 570 (mã số EU499095). Nhóm III với giá trị bootstrap 100% bao gồm *X. melonis* ICMP 8689 (EU499154), *X. fragariae* LMG 25863 (mã số JQ680972), *X. cynarae* ICMP 16776 (mã số EU499182), *X. cucurbitae* LMG 690 (mã số KF306190), *X. codiae* LMG 8678 (mã số KF306193) và *X. alfalfae* LMG 9325 (mã số KJ491725) (hình 3).

Như vậy, loài vi khuẩn phân lập tại Đắk Lắk thuộc nhóm các loài phân nhánh đầu tiên và có khoảng cách tương đồng khá xa so với 3 nhóm còn lại trên cây phả hệ.

Phát hiện và xác định vi khuẩn *Xam* dựa vào gen *gyrB*

Cặp primer XgyrconpcrF1/Xgyrconrpcr1 cũng khuếch đại trình tự của gen *gyrB* từ 30 mẫu lá sản biểu hiện triệu chứng vi khuẩn tàn lụi và mẫu ADN chiết xuất từ vi khuẩn *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản phân lập tại Đồng Nai (đối chứng dương), trong khi không có sản phẩm PCR nào được khuếch đại từ mẫu lá khỏe và mẫu nước (đối chứng âm) (số liệu không thể hiện).

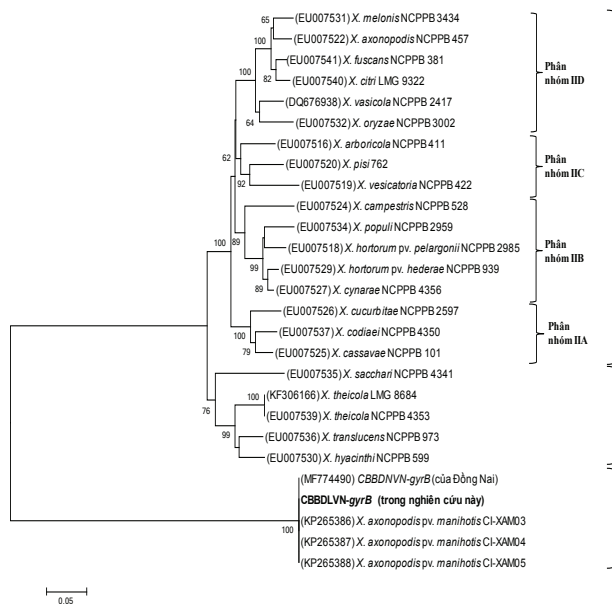
Tất cả các sản phẩm PCR được giải mã trực tiếp cả hai chiều bằng cặp primer XgyrconpcrF1/Xgyrconrpcr1. Tất cả sản phẩm đều có trình tự giống nhau và mẫu đại diện được ký hiệu CBBDLVN-*gyrB* (Cassava Bacterial Blight in Dak Lak, Vietnam, gene *gyrB*). CBBDLVN-*gyrB* có độ tương đồng 100% với trình tự đoạn gen *gyrB* của vi khuẩn *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản phân lập tại Đồng Nai (mã số MF77490).

Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen *gyrB* của vi khuẩn phân lập tại Đắk Lắk (CBBDLVN-*gyrB*) với 26 trình tự đoạn gen *gyrB* của các loài vi khuẩn thuộc *Xanthomonas* khác nhau từ Ngân hàng gen. CBBDLVN-*gyrB* của Đắk Lắk có độ tương đồng 100% với *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản tại Đồng Nai (mã số MF774490), tại Ivory Coast (mã số KP265386, KP265387, KP265388) và tạo thành nhóm những loài phân nhánh đầu tiên trong cây phả hệ.

Các loài vi khuẩn còn lại tạo thành 2 nhóm chính, trong đó, nhóm I với giá trị bootstrap 76% bao gồm *X. hyacinthi* NCPPB 599 (mã số EU007530), *X. translucens* NCPPB 973 (mã số EU007536), *X. theicola* NCPPB 4353 (mã số EU7539), *X. theicola* LMG 8684 (mã số KF306166) và *X. sacchari* NCPPB 4341 (mã số EU007535). Nhóm II, với giá trị bootstrap 100% bao gồm 4 phân nhóm khác nhau. Phân nhóm IIA với giá trị bootstrap 100% bao gồm *X. cassavae* NCPPB 101 (mã số EU007525), *X. codiae* NCPPB 4350 (mã số EU007537), *X. cucurbitae* NCPPB 2597 (mã số EU007526). Phân nhóm IIB với giá trị bootstrap 99% bao gồm *X. cynarae* NCPPB 4356 (mã số EU007527), *X. hortorum* pc. *Hederar* NCPPB 939 (mã số EU007529), *X.*

hortorum pv. *pelargonii* NCPPB 2985 (mã số EU007518), *X. populi* NCPPB 2959 (mã số EU007534) và *X. campestris* NCPPB 528 (mã số EU007524). Phân nhóm IIC với giá trị bootstrap 62% bao gồm *X. vesicatoria* NCPPB 422 (mã số EU007519), *X. pisi* 762 (mã số EU007520) và *X. arboricola* NCPPB 411 (EU007516). Phân nhóm IID với giá trị bootstrap 100% bao gồm *X. oryzae* NCPPB 3002 (mã số EU007532), *X. vasicola* NCPPB 2419 (mã số DQ676938), *X. citri* LMG 9322 (mã số EU007540), *X. fuscans* NCPPB 381 (mã số EU7541), *X. axonopodis* NCPPB457 (mã số EU007522) và *X. melonis* NCPPB 3434 (mã số EU007531).

Như vậy, tương tự như đối với trường hợp sử dụng gen *rpoD* để phân loại *Xam*, khi sử dụng gen *gyrB*, vi khuẩn gây bệnh tàn lụi sản của Việt Nam cũng thuộc nhóm các loài phân nhánh đầu tiên và có khoảng cách tương đồng khá xa so với 2 nhóm còn lại trên cây phả hệ (hình 4).



Hình 4. Cây phân loại được xây dựng bằng phương pháp neighbour-joining sử dụng trình tự đoạn gen *gyrB* phân lập từ Đắc Lắc (CBBDLVN-*gyrB*) với 26 trình tự gen *gyrB* của *Xam* khác nhau từ Ngân hàng gen và của *Xam* phân lập tại Đồng Nai (CBBDNVN-*gyrB*, mã số MF774490).

Như vậy, trong nghiên cứu này, thông qua việc khuếch đại và phân tích trình tự của gen *rpoD* và *gyrB* đều đã đưa ra những bằng chứng chứng minh vi khuẩn phân lập từ triệu chứng bệnh vi khuẩn tàn lụi thu tại Đắc Lắc là *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Trong những năm gần đây, để giám định và phân loại loài vi khuẩn thuộc *Xanthomonas*, kỹ thuật phân tử sử dụng các gen khác nhau đã được áp dụng như 16S rRNA [16], 16S-23S rRNA [17], *rpjB* và *atpD* [18], *gyrB* [14, 19], *rpoB* [20] và *rpoD* [13, 21]. Tại Việt Nam, những năm trước đây,

khi kỹ thuật phân tử chưa phổ biến, việc chẩn đoán, giám định vi khuẩn gây bệnh thực vật nói chung đều chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái của khuẩn lạc, đặc điểm hình thái và cấu trúc của tế bào vi khuẩn và kết quả của các phản ứng sinh hóa. Tuy nhiên, phương pháp này thường mất nhiều thời gian và có thể không giám định được đến loài và dưới loài do độ đặc hiệu thấp.

Để hướng tới hoàn thiện quy trình giám định nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản, cần từng bước kiểm tra độ tin cậy, chính xác và độ nhạy của các cặp primer sử dụng. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi cũng đã áp dụng kỹ thuật PCR với 2 cặp primer *rpoD*_17F/*rpoD*_1005R và *XgyrconpcrF1*/*Xgyrconrprc1* đặc hiệu cho gen *rpoD* và *gyrB* trong việc phát hiện và giám định vi khuẩn gây bệnh tàn lụi sản [22]. Mặc dù vẫn phải thực hiện các bước phân lập, nuôi cấy, làm thuần, nhân sinh khối vi khuẩn gây bệnh, và ADN tổng số được chiết xuất từ dung dịch nuôi cấy khi khuẩn thuần khiết chứ không phải trực tiếp từ vết bệnh (như trong nghiên cứu này), nhưng kết quả cũng đã đưa ra những bằng chứng ghi nhận tính đặc hiệu, độ nhạy của 2 cặp primer sử dụng.

Phương pháp sử dụng trong nghiên cứu này đã lược bỏ bớt các bước nêu trên và chỉ bao gồm một số bước đơn giản: (i) Chiết xuất ADN từ mẫu lá cây sản biểu hiện triệu chứng (như mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu); (ii) Chạy PCR với cặp primer *rpoD*_17F/*rpoD*_1005R hoặc *XgyrconpcrF1*/*Xgyrconrprc1*; và (iii) Giải mã và phân tích gen. Kết quả sử dụng cặp primer *rpoD*_17F/*rpoD*_1005R hoặc *XgyrconpcrF1*/*Xgyrconrprc1* đều đưa ra những bằng chứng chứng minh tính ổn định về vị trí phân loại của trình tự đoạn gen *rpoD* và *gyrB* khuếch đại từ chủng *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản tại Đắc Lắc. Việc sử dụng một trong hai cặp primer đều cho thấy sự tương đồng cao đối với trình tự các đoạn gen tương ứng của *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản đã được công bố. Như vậy, một trong hai cặp primer này đều có thể sử dụng riêng lẻ phục vụ công tác chẩn đoán và giám định nhanh tác nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản tại Việt Nam.

Kết luận

Nguyên nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản thu tại huyện Krông Pắc, M'Đrăk và Ea Kar của tỉnh Đắc Lắc là do vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gây ra. Phương pháp PCR sử dụng cặp primer *rpoD*_17F/*rpoD*_1005R và *XgyrconpcrF1*/*Xgyrconrprc1* khuếch đại đoạn gen *rpoD* và *gyrB* sử dụng ADN chiết xuất trực tiếp từ vết bệnh không qua bước phân lập và nhân nuôi vi khuẩn gây bệnh là phương pháp đơn giản, dễ sử dụng, có tính đặc hiệu cao. Cần nghiên cứu và áp dụng phương pháp này đối với các loài vi khuẩn gây bệnh cây khác phục vụ công tác chẩn đoán và giám định nhanh tác nhân gây bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.A. Ogunjobi (2006), "Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in the south eastern Nigeria", *Afr. J. Biotechnol.*, **5**(20), pp.1868-1872.
- [2] V. Verdier, S. Restrepo, G. Mosquera, V. Jorge, C. Lopez (2004), "Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* - cassava interaction", *Plant Mol. Biol.*, **56**(4), pp.573-584.
- [3] Y. Berthier, V. Verdier, J.L. Guesdon, D. Chevrier, J.B. Denis, G. Decoux, M. Lemattre (1993), "Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns", *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, pp.851-859.
- [4] M. Van den Mooter, J. Swings (1990), "Numerical analysis of 295 phenotypic features from 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, pp.348-369.
- [5] P. Yang, L. Vauterin, M. Vancanneyt, J. Swings, K. Kersters (1993), "Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of genus *Xanthomonas*", *Syst. Appl. Microbiol.*, **16**, pp.47-71.
- [6] V. Verdier, G. Mosquera, K. Assigbetsé (1998), "Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction", *Plant Dis.*, **82**, pp.79-83.
- [7] R.L. Miesfeld (1997), *Applied Molecular Genetics*, John Wiley & Sons, INC Publication.
- [8] V. Verdier, B. Boher, H. Maraite, V. Verdier, J. Geiger (1994), "Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*)", *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(12), pp.4478-4486.
- [9] S. Restrepo, V. Verdier (1997), "Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia", *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(11), pp.4427-4434.
- [10] V. Verdier, S. Ojeda, G. Mosquera (2001), "Methods for detecting the cassava bacterial blight pathogen: A practical approach for managing the disease", *Euphytica*, **120**(1), pp.103-107.
- [11] S. Ojeda, V. Verdier (2009), "Detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava true seeds by nested polymerase chain reaction assay", *Can. J. of Plant Pathol.*, **22**(3), pp.21-24.
- [12] J.J. Doyle, J.L. Doyle (1990), "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, **12**, pp.13-15.
- [13] D. Kone, S. Dao, C. Tekete, I. Doumbia, O. Koita, K. Abo, E. Wicker, V. Verdier (2015), "Confirmation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing cassava bacterial blight in Ivory Coast", *Plant Dis.*, **99**(10), pp.14-45.
- [14] N. Parkinson, V. Aritua, J. Heeney, C. Cowie, J. Bew, D. Stead (2007), "Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial *gyrase B* gene sequences", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, pp.2881-2887.
- [15] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar (2013), "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0", *Mol. Biol. Evol.*, **30**, pp.2725-2729.
- [16] E.R.B. Moore, et al. (1997), "16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intragenic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*", *FEMS Microbiol. Lett.*, **151**, pp.145-153.
- [17] E.R. Goncalves, Y.B. Rosato (2002), "Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, pp.355-361.
- [18] T.H.N. Simoes, E.R. Goncalves, Y.B. Rosato, A. Mehta (2007), "Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rpfB* and *atpD* genes", *FEMS Microbiol. Lett.*, **271**, pp.33-39.
- [19] N. Parkinson, C. Cowie, J. Heeney, D. Stead (2009), "Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, pp.264-274.
- [20] M. Ferreira-Tonin, J. Rodrigues-Neto, R. Harakava, S.A.L. Destefano (2012), "Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial *rpoB* gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **62**, pp.1419-1424.
- [21] I. Wonni, L. Ouedraogo, S. Dao, C. Tekete, O. Koita, G. Taghouti, P. Portier, B. Szurek, V. Verdier (2015), "Report of cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Burkina Faso", *Plant Dis.*, **99**(4), pp.551.
- [22] Duong Thi Nguyen, Nguyen Huy Hoang (2017), "Identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, causing cassava bacterial blight based on *rpoD* and *gyrB* genes", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **15**(3), tr.1-8.

Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá cho các tỉnh phía Bắc

Dương Xuân Tú*, Phạm Thiên Thành, Tăng Thị Diệp, Tống Thị Huyền,
Lê Thị Thanh, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Trí Hoàn

Viện Cây lương thực và cây thực phẩm, VAAS

Ngày nhận bài 24/8/2017; ngày chuyển phản biện 28/8/2017; ngày nhận phản biện 12/10/2017; ngày chấp nhận đăng 20/10/2017

Tóm tắt:

Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá được thực hiện tại Viện Cây lương thực và cây thực phẩm (CLT&CTP) từ năm 2010. Kết quả nghiên cứu đã đưa ra chỉ thị 4 môi (ESP, IFAP, INSP và EAP) được sử dụng để nhận diện gen mùi thơm (*fgr*) với độ chính xác 95%; các chỉ thị Npp181, RG556 và P3 nhận diện các gen *Xa4*, *xa5* và *Xa7* kháng với vi khuẩn gây bệnh bạc lá ở các tỉnh phía Bắc với độ chính xác lần lượt là 96, 93 và 97%. Kết quả của việc sử dụng phương pháp chọn tạo giống bằng đánh giá kiểu hình kết hợp với chỉ thị phân tử chọn kiểu gen mục tiêu đã chọn được giống lúa thơm HDT10 thích hợp cho gieo trồng trong vụ xuân và vụ mùa tại các tỉnh phía Bắc đáp ứng mục tiêu chọn tạo như thời gian sinh trưởng ngắn (105 ngày trong vụ mùa), năng suất đạt 6,0-6,5 tấn/ha, thể hiện tính kháng với bệnh bạc lá. Qua khảo nghiệm quốc gia tại các tỉnh phía Bắc, giống lúa HDT10 đã được đánh giá cao, được công nhận cho sản xuất thử tại các tỉnh phía Bắc từ năm 2017.

Từ khóa: Bệnh bạc lá, cây lúa, chỉ thị phân tử, gen mục tiêu, mùi thơm.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Lúa thơm chất lượng cao là một hướng ưu tiên nhằm nâng cao tính cạnh tranh của sản phẩm và hiệu quả kinh tế trong sản xuất lúa gạo của Việt Nam hiện nay. Tuy nhiên, bộ giống lúa thơm chất lượng hiện đang được sản xuất tại các tỉnh phía Bắc còn đơn điệu, các giống lúa thơm chất lượng vẫn phổ biến là các giống lúa được nhập nội từ Trung Quốc (BT7, HT1) và các giống lúa chọn tạo trong nước (T10, AC5, TL6...) là những giống lúa chất lượng, ngắn ngày, nhưng khả năng thích ứng kém, khả năng chống chịu kém với một số sâu bệnh hại chính như rầy nâu, đạo ôn, đặc biệt là bệnh bạc lá..., do vậy khi sản xuất mang tính rủi ro cao, hiệu quả thấp, khó mở rộng diện tích. Bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) là loại bệnh hại nguy hiểm nhất đối với cây lúa ở khu vực châu Á, gây thiệt hại về năng suất từ 50 đến 80% [1]. Ở Việt Nam, bộ giống lúa thơm chất lượng cao được trồng phổ biến hiện nay ở các tỉnh phía Bắc như BT7, AC5, T10 nhiễm bệnh bạc lá rất nặng. Đây là nguyên nhân làm hạn chế mục tiêu tăng sản lượng lúa chất lượng tại các tỉnh phía Bắc trong những năm qua. Chọn tạo giống lúa thơm chất lượng cao, năng suất khá, kháng bệnh bạc lá là cần thiết cho sản xuất lúa chất lượng ở các tỉnh phía Bắc nước ta.

Hiện nay, chỉ thị phân tử ADN được sử dụng như là một công cụ hỗ trợ cho lai tạo (MABC - Molecular Assisted Backcrossing) và chọn lọc (MAS - Molecular Assisted Selection) đã được khẳng định có hiệu quả trong các chương

trình chọn giống cây trồng. Bằng phân tích kiểu gen kiểm soát các tính trạng, các nhà chọn giống có thể chọn được giống mang nhiều tính trạng mong muốn trong cùng thời điểm. Đối với mùi thơm ở cây lúa, chất 2-acetyl-1-pyrroline (2Ap) được kiểm soát bởi gen *fgr* nằm trên nhiễm sắc thể số 8 đã được công bố là chất chính tạo nên mùi thơm ở các giống lúa thơm, đặc trưng là mùi thơm của giống Jasmine và Basmati [2]. Gen *fgr* đã được tìm ra nhờ các chỉ thị liên kết với những khoảng cách di truyền khác nhau [3, 4]. Đối với bệnh bạc lá, cho đến nay đã phát hiện có trên 36 gen kháng chính với các chủng vi khuẩn gây bệnh tại các vùng trồng lúa trên thế giới. Trong đó, 28 gen đã được định vị trên các nhiễm sắc thể và có chỉ thị liên kết đã được đưa ra [5]. Nhóm tác giả Dương Xuân Tú và cs thuộc Viện CLT&CTP đã tiến hành đề tài “Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá” từ năm 2010. Kết quả nghiên cứu đã lựa chọn được chỉ thị 4 môi (ESP, IFAP, INSP và EAP) nhận diện gen thơm *fgr* có độ chính xác 95%. Kết quả nghiên cứu cũng đã khẳng định gen *Xa4*, *xa5*, *Xa7* và *Xa21* kháng cao hữu hiệu với các nguồn vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa ở các tỉnh phía Bắc. Các chỉ thị phân tử Nbp181, RG556, P3 cũng đã được lựa chọn để nhận diện các gen kháng *Xa4*, *xa5* và *Xa7* với độ chính xác tương ứng là 97, 76 và 92% giữa gen kháng tính kháng [6].

Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm, kháng bệnh bạc lá tại Viện CLT&CTP theo mục tiêu: Thời gian sinh

*Tác giả liên hệ: Email: duongtu390@hotmail.com

Application of molecular markers in the breeding of aromatic rice varieties with resistance to bacterial leaf blight

Xuan Tu Duong*, Thien Thanh Pham, Thi Diep Tang,
Thi Huyen Tong, Thi Thanh Le, Thi Thu Nguyen,
Tri Hoan Nguyen

Field Crops Research Institute (FCRI)

Received 24 August 2017; accepted 20 October 2017

Abstract:

From the results of the study, four markers as: ESP, IFAP, INSP, and EAP could be applied to identify the fragrant gene (*fgr* gene) with the accuracy of 95%; the markers Npp181, RG556, and P3 could be applied to select the *Xa4*, *xa5*, and *Xa7* genes which control the resistance to bacterial races causing leaf blight on rice plants in the Northern Vietnam with the accuracy of 96, 93, and 97%, respectively. The result of the breeding protocol with the combination of phenotypic selection and MAS to select target genes had released an aromatic rice variety, named HDT10 suitable for late spring and early summer seasons in the Northern Vietnam with major characteristics as follows: Short growth duration (105 days in summer season); 6.0-6.5 tons/ha in yield; good quality and resistance to bacterial leaf blight disease. Through the system of national trials in the Northern provinces of Vietnam since 2015, the HDT10 variety has been released in large-scale production in the Northern Vietnam since 2017.

Keywords: Bacterial leaf blight, fragrance, molecular markers, rice, target genes.

Classification number: 4.6

trường ≤ 115 ngày (vụ mùa), năng suất đạt 6,0-6,5 tấn/ha, có mùi thơm, hàm lượng amylose ≤ 22%, cơm mềm, ngon; có tính kháng với bệnh bạc lá tại các vùng sản xuất ở các tỉnh phía Bắc.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu sử dụng trong các phép lai gồm các giống lúa thơm: HT1, HDT8, BT7, Nghi hương, SH8, AC15, N46; các giống lúa năng suất cao: KD18, ĐB6; các giống lúa kháng bệnh bạc lá: TQuynh, các dòng đẳng gen IRBB5, IRBB7, IRBB5/7...

Mỗi chỉ thị phân tử liên kết với gen thơm *fgr* trên nhiễm sắc thể số 8, gồm 4 môi: ESP, IFAP, INSP và EAP được đưa ra bởi Bradbury và cs [4].

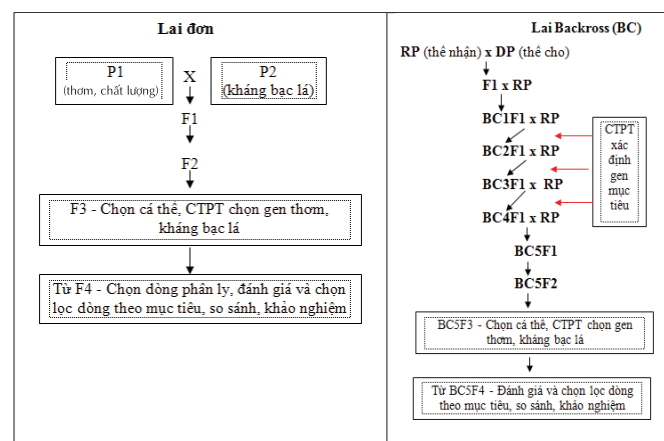
Tên môi	Trình tự môi	Kích thước băng (pb)
ESP	5'-TTGTTTGGAGCTTGCTGATG-3'	580
FAP	5'-CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC-3'	257
INSP	5'-CTGGTAAAGTTTATGGCTTCA-3	355
EAP	5'-AGTGCTTTACAGCCCGC-3'	580

Mỗi chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng bệnh bạc lá: Nbp181 liên kết với gen *Xa4* [7], RG556 liên kết với gen *xa5* và P3 liên kết với gen *Xa7* [8] được đưa ra như sau:

Gen kháng	Tên chỉ thị	Vị trí (nhiễm sắc thể)	Trình tự môi	Kích thước băng (pb)	Tác giả
<i>Xa4</i>	Nbp181	11	5' ATC GAT CGA TCT TCA CGA GG 3' 5' GTG CTA TAA AAG GCA TTCGGG 3'	150	[7]
<i>xa5</i>	RG556	5	5' TAG CTG CTG CCG TGC TGT GC-3' 5' AAT ATT TCA GTG TGC ATC GGA 3'	500	[9]
<i>Xa7</i>	P3	6	5' CAG CAA TTC ACT GGA GTA GTG GTT 3' 5' CAT CAC GGT CAC CAC CAT ATC GGA 3'	250	[8]

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chọn lọc: Phương pháp chọn lọc phả hệ có cải tiến kết hợp với chỉ thị phân tử chọn kiểu gen thơm và gen kháng bệnh bạc lá (MAS). Chọn lọc cá thể được tiến hành từ quần thể phân ly $F_2 - F_3$ của các tổ hợp lai, chọn những cá thể có dạng hình đẹp, thời gian sinh trưởng ngắn, chống chịu sâu bệnh, có khả năng đáp ứng được mục tiêu chọn tạo về năng suất. Đồng thời, các cá thể chọn này được lấy mẫu ADN để chọn gen mục tiêu. Các cá thể mang gen mục tiêu ở trạng thái đồng hợp tử sẽ được gieo thành dòng, tiếp tục chọn lọc phân ly theo mục tiêu chọn giống ở các thế hệ tiếp theo. Sơ đồ lai tạo và chọn lọc như sau (hình 1).



Phương pháp thí nghiệm đồng ruộng: Chọn dòng phân ly được bố trí tuần tự không nhắc lại. Thí nghiệm so sánh giống được bố trí theo khối ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại.

Kỹ thuật sử dụng và phương pháp đánh giá:

* Xác định gen mùi thơm và gen kháng bệnh bạc lá:

Tách chiết ADN: ADN được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp CTAB của Doyle có cải tiến [10].

Phản ứng nhân gen (PCR): Chương trình phản ứng PCR gồm 94°C trong 5 phút; 94°C trong 45 giây, 55°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút, 37 chu kỳ lặp lại; 72°C trong 8 phút và sau đó giữ lạnh ở 4°C.

Điện di sản phẩm PCR: Sản phẩm PCR được điện di bằng máy điện di mao quản và điện di trên gel agarose 2%, ladder 100 bp, hiệu điện thế 100 V, thời gian 40 phút. Bán gel được nhuộm bằng Ethidium bromide 0,5 µg/ml trong 30 phút. Hình ảnh điện di được phân tích trên máy chụp hình gel (gel DOC).

* Phân tích chất lượng gạo:

Mùi thơm: Đánh giá theo Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2004) [11]. Cụ thể, mỗi cá thể lấy 15 hạt được bóc vỏ trấu và nghiền nhỏ, sau đó đặt trong đĩa petri, cho vào 0,5 ml dung dịch KOH pha loãng (1,7%) sau đó đập lại, đặt trong điều kiện 30°C trong 30 phút. Các hộp được mở ra lần lượt để đánh giá mùi thơm theo cảm quan 3 mức (không thơm, thơm nhẹ và thơm).

Hàm lượng amylose: Phân tích và phân loại theo Kumar và Khush (1986), Sadavisam và Manickam (1992) [12, 13].

Nhiệt hóa hồ: Phân tích và đánh giá theo phương pháp của IRRI (1996), [14].

Kết quả lai tạo và chọn lọc

Kết quả lai chuyển gen kháng bệnh bạc lá vào các giống lúa thơm

Các giống lúa thơm được sử dụng để cải tạo tính kháng bệnh bạc lá gồm: HDT8, SH8 và BT7. Thông qua lai backcross để chuyển các gen kháng bệnh bạc lá hữu hiệu ở các tính phía Bắc (*xa5*, *Xa7*) nhằm cải tiến tính kháng bệnh bạc lá của các giống lúa HDT8, SH8 và BT7. Sử dụng chỉ thị phân tử để kiểm tra gen mục tiêu của con lai từ BC1F1 đến BC4F1 để xác định cây nhận trong các lần lai lại. Thực hiện từ vụ xuân 2011 đến 2014, chúng tôi đã tạo được hạt lai của BC5F1. Vụ mùa 2014, con lai BC5F1 được đánh giá và kiểm tra gen mục tiêu bằng chỉ thị phân tử. Kết quả đã chọn được 72 cây BC5F1 mang gen thơm, đồng thời mang 1-2 gen kháng bệnh bạc lá trong các gen *Xa4*, *xa5* và *Xa7*, trong đó 25 cây mang nền di truyền HDT8, 22 cây mang nền di truyền SH8 và 24 cây mang nền di truyền của giống BT7 (bảng 1). Các cây BC5F1 mang gen mục tiêu được cho tự

thụ đến F3. Tiến hành chọn chọn cá thể mang gen mục tiêu đồng hợp tử từ thế hệ BC5F3 trong vụ xuân 2015. Các cá thể được chọn gieo thành dòng, tiếp tục chọn lọc các dòng phân ly dựa trên các đặc điểm nông sinh học theo mục tiêu, từ vụ mùa 2015.

Bảng 1. Kết quả đánh giá con lai BC5F1 trong vụ mùa 2014.

Tổ hợp lai	Thế hệ	Con lai F1 mang gen thơm <i>fgr</i> và gen kháng bệnh bạc lá dị hợp tử			
		<i>fgr</i> , <i>xa5</i>	<i>fgr</i> , <i>Xa7</i>	<i>fgr</i> , <i>Xa4</i> , <i>xa5</i>	<i>fgr</i> , <i>xa5</i> , <i>Xa7</i>
(HDT8/IRBB4-5)////HDT8	BC5F1	7	-	4	-
(HDT8/IRBB5-7)////HDT8	BC5F1	6	3	-	5
(SH8/IRBB4-5)////SH8	BC5F1	3	-	2	-
(SH8/IRBB5-7)////SH8	BC5F1	5	7	-	6
(BT7/IRBB7)////BT7	BC5F1	-	12	-	-
(BT7/IRBB5-7)////BT7	BC5F1	7	-	-	5

Kết quả chọn lọc từ nguồn vật liệu của các tổ hợp lai đơn

Trong phần này, chúng tôi trình bày kết quả chọn dòng lúa thơm từ các thế hệ phân ly của các tổ hợp lai đơn được khởi tạo từ vụ xuân 2010. Con lai của các tổ hợp lai được tự thụ đến thế hệ F3. Từ thế hệ F3 tiến hành chọn những cá thể đẹp, đồng thời sử dụng chỉ thị phân tử chọn kiểu gen thơm và gen kháng bệnh bạc lá ở trạng thái đồng hợp tử (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả chọn cá thể mang kiểu gen thơm và gen kháng bạc lá đồng hợp tử trên quần thể phân ly F3 vụ xuân 2011.

Tên tổ hợp lai	Thế hệ	Chọn cá thể	Chọn cá thể mang kiểu gen thơm <i>fgr</i> và gen kháng bạc lá đồng hợp tử
HT1/IRBB7	F3	67	5 (<i>fgr</i> + <i>Xa7</i>)
HT1/(KN1/KH18)	F3	70	10 (<i>fgr</i>)
Nghi Hương/CSR90R	F3	45	7 (<i>fgr</i>)
HDT8/D604	F3	95	12 (<i>fgr</i>)
AC15/IR72046	F3	15	4 (<i>fgr</i>)
SH8/IRBB7	F3	75	3 (<i>fgr</i> + <i>Xa7</i>)
N46/DB6	F3	150	18 (<i>fgr</i>)
Nghi Hương/IRBB7	F3	50	1 (<i>fgr</i> + <i>Xa7</i>)
BT7/IRBB5	F3	68	6 (<i>fgr</i> + <i>xa5</i>)
Tổng số		635	66

Ở thế hệ F3, chọn được 66 cá thể mang gen mục tiêu ở trạng thái đồng hợp tử, trong đó có 51 cá thể mang gen mùi thơm *fgr*; 15 cá thể mang gen thơm *fgr* và 1-2 gen kháng bệnh bạc lá. Các cá thể được chọn tiếp tục được gieo thành dòng và tiến hành chọn lọc dòng phân ly từ thế hệ F4, theo mục tiêu về thời gian sinh trưởng, dạng hình, tiềm năng

năng suất. Ở thế hệ F6, các dòng chọn có độ thuần cao được kiểm tra gen thơm, gen kháng bệnh bạc lá, đánh giá mùi thơm và tính kháng bệnh bạc lá (bảng 3).

Bảng 3. Kiểm tra gen mùi thơm và gen kháng bệnh bạc lá, đánh giá mùi thơm và tính kháng bệnh bạc lá các dòng chọn ở thế hệ F6 trong vụ xuân 2013.

TT	Tên dòng	Nguồn gốc	Gen mục tiêu		Kháng bệnh bạc lá	Mùi thơm
			Thế hệ F3	Thế hệ F6		
1	D19-9-1	HT1/IRBB7	<i>fgr, xa7</i>	<i>fgr, xa7</i>	R	Thơm nhẹ
2	D19-5-3	HT1/IRBB7	<i>fgr, xa7</i>	<i>fgr</i>	M	Không thơm
3	D199-1-5	HT1/(KN1/KD18)	<i>fgr</i>	<i>fgr</i>	M	Thơm nhẹ
4	D18-10-1	Nghi Hương/CSR90R	<i>fgr</i>	<i>fgr</i>	M	Thơm
5	D4-2-1	HDT8/D604	<i>fgr</i>	<i>fgr</i>	M	Thơm nhẹ
6	D4-3-4	HDT8/D604	<i>fgr</i>	<i>fgr</i>	M	Thơm nhẹ
7	D4-6-10	HDT8/D604	<i>fgr</i>	<i>fgr</i>	M	Thơm nhẹ
8	D9-13-7	AC15/IR72046	<i>fgr</i>	<i>fgr</i>	M	Thơm
9	D9-9-5	AC15/IR72046	<i>fgr</i>	<i>fgr</i>	S	Thơm
10	D142-5-7	SH8/IRBB7	<i>fgr, xa7</i>	<i>fgr, xa7</i>	M	Không thơm
11	D248-5-7	N46/DB6	<i>fgr</i>	<i>fgr</i>	M	Thơm nhẹ
12	D248-7-1	N46/DB6	<i>fgr</i>	<i>fgr</i>	M	Thơm nhẹ
13	D248-9-3	N46/DB6	<i>fgr</i>	-	M	Không thơm
14	D27-5-3	Nghi Hương/IRBB7	<i>fgr, xa7</i>	<i>fgr</i>	S	Thơm
15	D6-1-1	BT7/IRBB5	<i>fgr, xa5</i>	<i>fgr, xa5</i>	R	Thơm nhẹ
	BT7		<i>fgr</i>	-	-	Thơm

8 dòng lúa có mùi thơm, kháng và nhiễm nhẹ với bệnh bạc lá là dòng D19-9-1, D199-1-5, D18-10-1, D4-3-4, D4-6-10, D9-13-7, D248-5-7 và D6-1-1 được đưa vào thí nghiệm so sánh trong vụ mùa 2013 và vụ xuân 2014 để chọn dòng ưu tú đưa khảo nghiệm sản xuất.

Kết quả so sánh một số dòng lúa thơm, kháng bệnh bạc lá triển vọng

Đặc điểm hình thái và sinh trưởng: Dạng cây của các dòng triển vọng đều có dạng hình gọn, thân cứng, chống đổ tốt. Chiều cao cây ở mức trung bình, dao động từ 100 đến 115 cm. Thời gian sinh trưởng của các dòng triển vọng là 100-110 ngày trong vụ mùa và 130-135 ngày trong vụ xuân, tương đương với các đối chứng BT7. Các dòng có thời gian sinh trưởng ngắn, phù hợp với cơ cấu thời vụ tại các tỉnh phía Bắc hiện nay.

Phản ứng với sâu bệnh hại trên đồng ruộng: Đối với một số sâu bệnh hại chính như rầy nâu, bệnh đạo ôn, khô vằn và bệnh bạc lá, các dòng lúa triển vọng thể hiện ở mức nhiễm nhẹ (điểm 0-3) so với đối chứng BT7 ở mức nhiễm nhẹ đến nhiễm (điểm 3-5).

Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất: Các yếu tố cấu thành năng suất: Số bông/khóm, số hạt/bông, tỷ lệ lép, khối lượng 1.000 hạt và năng suất thực thu (NSTT) được tính dựa trên năng suất của ô thí nghiệm được đưa ra trong bảng 4.

Bảng 4. Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của các dòng lúa trong thí nghiệm so sánh (vụ mùa 2013 và xuân 2014).

TT	Tên dòng	Số bông/khóm		Số hạt/bông		Tỷ lệ lép (%)		Khối lượng 1.000 hạt (g)		NSTT (tạ/ha)	
		Xuân	Mùa	Xuân	Mùa	Xuân	Mùa	Xuân	Mùa	Xuân	Mùa
1	D248-5-7	5,2	5,5	190	185	10,5	12,4	21,0	20,4	64,5	60,0
2	D19-9-1	5,0	5,0	168	160	12,5	13,6	23,5	23,0	62,8	58,0
3	D6-1-1	5,2	5,0	164	150	15,6	18,0	21,4	21,0	54,2	49,0
4	D199-1-5	5,0	5,0	170	160	15,0	15,2	24,5	24,0	60,2	57,6
5	D18-10-1	4,8	5,0	165	158	17,0	17,6	24,5	24,2	56,0	52,0
6	D4-6-10	5,0	5,2	170	160	14,4	15,0	24,0	24,0	61,2	57,0
7	D4-3-4	5,0	5,0	165	160	14,5	14,8	23,8	23,5	60,0	56,8
8	D9-13-7	4,8	5,2	160	150	15,6	18,0	24,0	24,0	56,8	52,6
9	BT7 (đ/c)	4,8	5,0	155	145	9,5	10,8	20,0	19,5	54,5	50,2
	CV (%)									8,2	6,4
	LSD _{0,05}									6,4	5,8

Dòng D248-5-7 có năng suất cao hơn giống đối chứng BT7 ở cả trong vụ xuân và vụ mùa, đồng thời đạt được năng suất đặt ra theo mục tiêu là từ 60 tạ/ha trong vụ mùa và 65 tạ/ha trong vụ xuân.

Chất lượng gạo: Chất lượng gạo của các dòng lúa triển vọng được đánh giá sơ bộ theo hàm lượng amylose và chất lượng ăn nếm. Kết quả đánh giá được đưa ra trong bảng 5.

Bảng 5. Chất lượng gạo của các dòng lúa trong thí nghiệm so sánh (vụ mùa 2013 và xuân 2014 tại Viện CLT&CTP).

TT	Tên dòng	Hàm lượng amylose (%)	Đánh giá chất lượng	
			Đánh giá cảm quan	Độ ngon
1	D248-5-7	15,5	Gạo trắng, ít bạc bụng, cơm mềm, thơm nhẹ	3
2	D19-9-1	24,5	Gạo trắng, bạc bụng, cơm hơi cứng, thơm nhẹ	1
3	D6-1-1	18,8	Gạo trắng, ít bạc bụng, cơm mềm, bóng, thơm nhẹ	3
4	D199-1-5	22,3	Gạo trắng, ít bạc bụng, cơm hơi mềm, thơm nhẹ	2
5	D18-10-1	16,8	Gạo trắng đục, cơm mềm, thơm, đậm	3
6	D4-6-10	18,5	Gạo trắng mờ, bạc bụng, cơm mềm, thơm nhẹ	2
7	D4-3-4	25,1	Gạo trắng, gãy, cơm cứng, thơm nhẹ	1
8	D9-13-7	14,6	Gạo trắng mờ, ít bạc bụng, cơm mềm, thơm nhẹ	2
9	BT7	15,2	Gạo trắng, ít bạc bụng, cơm mềm, thơm	3

Từ kết quả so sánh, chúng tôi rút ra dòng D248-5-7 đáp ứng được các tiêu chí trong mục tiêu chọn tạo về thời gian sinh trưởng, năng suất, chất lượng và khả năng chống chịu sâu bệnh hại, được đưa khảo nghiệm sản xuất từ vụ mùa 2014 và được đặt tên là giống HDT10.

Kết quả khảo nghiệm giống HDT10

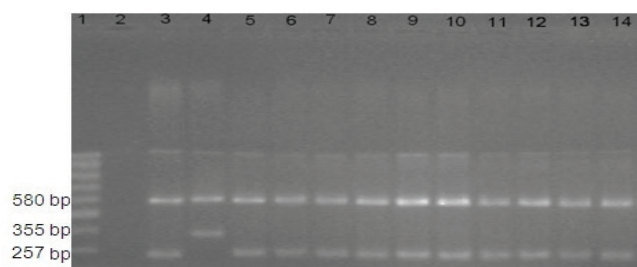
Giống lúa HDT10 được đưa khảo nghiệm quốc gia và khảo nghiệm sản xuất từ vụ mùa 2014 đến vụ mùa 2016. Đặc điểm của giống HDT10 được miêu tả trong bảng 6.

Bảng 6. Đặc điểm giống lúa khảo nghiệm HDT10 trong so sánh với một số giống khác.

Đặc điểm chính	HDT10	N46	ĐB6
Dạng hình	V gòn	V gòn	V gòn
Chiều cao cây (cm)	107	105	95
Khả năng đẻ nhánh	Trung bình	Trung bình	Trung bình
Dạng hạt	Thon dài	Thon dài	Tròn
Màu sắc hạt	Nâu nhạt	Nâu	Vàng sậm
Thời gian sinh trưởng vụ mùa (ngày)	105	110	105
Số hạt/bông	180-85	155-165	160-170
Tỷ lệ lép (%)	12-13	17-18	10-12
Khối lượng 1.000 hạt (g)	21	23	25
Năng suất (tấn/ha)	6,0-6,5	5,4-6,2	6,2-7,0
Đặc điểm chất lượng ⁽¹⁾			
+ Hàm lượng amylose (%)	15,5	16,8	17,5
+ Hàm lượng protein	9,5	8,7	9,1
+ Gen thơm <i>fgr</i>	+	+	-
+ Mùi thơm (điểm)	2	2	1
+ Độ ngon (điểm)	3	3	1
Phản ứng với sâu bệnh hại ⁽²⁾			
+ Bệnh bạc lá	Nhiễm vừa	Nhiễm vừa	Nhiễm vừa
+ Bệnh đạo ôn	Nhiễm vừa	Nhiễm vừa	Nhiễm vừa
+ Rầy nâu	Nhiễm vừa	Nhiễm vừa	Nhiễm vừa

⁽¹⁾Phân tích chất lượng được thực hiện tại phòng phân tích, Viện CLT&CTP; ⁽²⁾Đánh giá sâu bệnh hại nhân tạo thực hiện tại Viện Bảo vệ thực vật.

Đặc điểm kiểu gen thơm của giống HDT10 được chọn bằng chỉ thị 4 mỗi, gồm: 2 mỗi ngoại biên ESP và EAP nhân cả vùng gen thơm và không thơm cho kích thước băng 580 bp; 2 mỗi nội biên là IFAP nhân vùng gen thơm cho kích thước băng 257 bp và mỗi INSP nhân vùng gen không thơm cho kích thước băng 355 bp (hình 2).

**Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng chỉ thị 4 mỗi, trên gel agarose 2%, ladder 100 bp để kiểm tra gen thơm *fgr* của giống lúa HDT10 (1: Size marker 1.000 bp; 2: Nước; 3: BT7; 4: Q5; từ 5 đến 14 là 10 cây mẫu của giống HDT10).**

Kết quả khảo nghiệm quốc gia giống HDT10:

Độ thuần đồng ruộng và các yếu tố cấu thành năng suất: Giống lúa HDT10 có độ thuần cao (mức 1); số bông/khóm ở mức trung bình, từ 4,7 (vụ xuân) đến 5,0 bông/khóm (vụ mùa); số lượng hạt/bông tương đối lớn, từ 184 (vụ xuân) đến 190 hạt/bông (vụ mùa), tỷ lệ lép từ 12,2 (vụ xuân) đến 13,4% (vụ mùa); dạng hạt nhỏ thon dài, khối lượng 1.000 hạt là 20,7 (vụ xuân) và 20,2 g (vụ mùa) (bảng 7).

Bảng 7. Độ thuần đồng ruộng và các yếu tố cấu thành năng suất của giống lúa HDT10 trong khảo nghiệm quốc gia vụ mùa 2014 và xuân năm 2015.

TT	Tên giống	Độ thuần (điểm)		Số bông/khóm		Số hạt/bông		Tỷ lệ lép(%)		Khối lượng 1.000 hạt (g)	
		Xuân	Mùa	Xuân	Mùa	Xuân	Mùa	Xuân	Mùa	Xuân	Mùa
1	HDT10	1	1	4,7	5,0	184	190	12,2	13,4	20,7	20,2
2	BT7	1	1	4,9	4,9	158	148	10,8	9,5	19,5	18,5
3	HT1	1	1	4,4	4,8	163	162	13,2	18,3	24,2	23,5

(Nguồn: Trung tâm Khảo kiểm nghiệm giống và sản phẩm cây trồng quốc gia).

Mức độ nhiễm sâu bệnh trên đồng ruộng: Qua kết quả khảo nghiệm quốc gia cho thấy, giống lúa HDT10 có khả năng kháng tốt với sâu bệnh hại trên đồng ruộng: Đối với bệnh bạc lá, ở mức kháng (điểm 1-3), trong khi giống BT7 ở mức điểm 3-5. Các loại sâu bệnh khác (như sâu cuốn lá, khô vằn, rầy nâu), HDT10 có mức nhiễm (điểm 0-1) nhẹ hơn đối chứng BT7 (điểm 3-5).

Năng suất tại các điểm khảo nghiệm: Kết quả khảo nghiệm cho thấy, năng suất bình quân của giống HDT10 tại các điểm khảo nghiệm đạt 54,18-57,69 tạ/ha, cao hơn hẳn năng suất của giống lúa BT7 (47,76-51,49 tạ/ha) và tương đương với năng suất của giống HT1 (55,92-56,73 tạ/ha). Tại điểm khảo nghiệm Hưng Yên, năng suất của giống HDT10 đạt 60,89-67,42 tạ/ha, cao hơn hẳn năng suất của giống lúa HT1 ở cả vụ xuân và vụ mùa (bảng 8).

Bảng 8. Năng suất của giống lúa HDT10 tại các điểm khảo nghiệm quốc gia

Vụ xuân 2015

Tên giống	Điểm khảo nghiệm								
	Hưng Yên	Hải Dương	Thái Bình	Bắc Giang	Hòa Bình	Thanh Hóa	Nghệ An	Hà Tĩnh	Bình quân
HDT10	67,42	65,99	55,24	60,77	52,33	56,53	61,73	41,53	57,69
BT7	55,0	59,59	49,01	45,38	54,00	49,97	63,33	35,67	51,49
HT1	64,56	64,56	51,77	52,32	55,67	60,90	63,47	40,60	56,73
CV (%)	6,3	5,4	5,7	4,1	5,3	7,6	4,3	6,4	
LSD _{0,05}	6,61	6,07	4,83	3,73	4,92	6,98	4,85	4,13	

Vụ mùa 2015

Tên giống	Điểm khảo nghiệm								
	Hưng Yên	Hải Dương	Thái Bình	Bắc Giang	Hòa Bình	Yên Bái	Thanh Hóa	Nghệ An	Bình quân
HDT10	60,89	56,49	59,48	53,00	48,33	48,00	56,17	51,07	54,18
BT7	48,00	49,72	45,09	40,36	52,00	48,00	48,30	50,60	47,76
HT1	59,96	56,68	59,62	47,41	53,33	61,60	53,07	55,67	55,92
CV (%)	5,9	5,0	5,7	3,7	3,7	5,9	3,9	4,4	
LSD _{0,05}	5,58	4,81	5,18	3,03	3,10	5,61	3,31	4,00	

(Nguồn: Trung tâm Khảo kiểm nghiệm giống và sản phẩm cây trồng quốc gia).

Đặc điểm về chất lượng: Giống lúa HDT10 có hạt gạo thon dài, hàm lượng amylose khoảng 15,5%, tỷ lệ gạo lật, gạo sát, tỷ lệ trắng trong cao hơn gạo của giống BT7 và HT1. Chất lượng ăn nếm được đánh giá ở mức khá (15,5 điểm), tương đương BT7, có mùi thơm nhẹ hơn mùi thơm của BT7 (bảng 9).

Bảng 9. Chất lượng của giống lúa HDT10 khảo nghiệm quốc gia (vụ mùa 2015).

Chất lượng hạt theo phân tích trong vụ mùa 2015

TT	Tên giống	Tỷ lệ gạo lật (%)	Tỷ lệ gạo sát (%)	Tỷ lệ gạo nguyên (%)	Tỷ lệ trắng trong (%)	Nhiệt hóa hồ (%)	Hàm lượng amylose (%)	Dài (mm)	Rộng (mm)
1	HDT10	80,97	70,96	86,30	83,85	Trung bình	15,49	5,7	2,78
2	BT7	77,34	67,81	89,38	48,85	Trung bình	14,6	5,79	2,94
3	HT1	79,79	68,98	72,59	62,28	Trung bình	16,86	6,41	3,12

Chất lượng ăn nếm đánh giá trong vụ mùa 2015

TT	Tên giống	Mùi thơm (điểm)	Độ mềm (điểm)	Độ trắng (điểm)	Vị ngon (điểm)	Điểm tổng hợp	Xếp hạng
1	HDT10	3	4	5	3,5	15,5	Khá
2	BT7	4	4	5	3,5	16,5	Khá
3	HT1	3	4	5	3	15	Trung bình

(Nguồn: Trung tâm Khảo kiểm nghiệm giống và sản phẩm cây trồng quốc gia).

Từ kết quả khảo nghiệm quốc gia, giống HDT10 đã được Trung tâm Khảo kiểm nghiệm giống và sản phẩm cây trồng quốc gia kết luận là giống có triển vọng, có nhiều đặc điểm tốt và đề nghị mở rộng ra sản xuất.

Kết quả khảo nghiệm sản xuất giống lúa HDT10:

Từ vụ xuân 2015 đến vụ xuân 2017, giống lúa HDT10 đã được đưa trồng thử nghiệm tại các vùng đại diện cho khu vực phía Bắc: Thái Nguyên, Hải Dương, Thái Bình, Bắc Giang, Nam Định, Ninh Bình, Hà Nội, Thanh Hóa, Nghệ An. Tổng diện tích thử nghiệm là 120 ha. Năng suất trung bình của giống lúa HDT10 trong sản xuất thử đạt từ 63,0 tạ/ha (vụ mùa) đến 69 tạ/ha (vụ xuân), cao hơn 30-34% so với năng suất của giống BT7 và 15-20% so với năng suất của giống HT1. Chất lượng gạo của giống HDT10 được người sản xuất đánh giá tại các điểm khảo nghiệm: Hạt gạo đẹp, trắng trong, thon dài; tỷ lệ gạo sát và gạo nguyên cao; cơm mềm dẻo, thơm nhẹ, có vị đậm, ăn ngon tương đương BT7, vượt trội so với chất lượng của giống HT1. Qua đánh giá tại các vùng thử nghiệm cho thấy, giống HDT10 có độ ổn định tương đối tốt, khả năng thích ứng rộng. Người sản xuất đánh giá cao về giống HDT10 với một số đặc điểm vượt trội BT7 như năng suất, sức sống tốt, chống đổ và khả năng chống chịu.

Kết luận

Sử dụng các chỉ thị phân tử trong lai tạo (MABC) để chuyển gen kháng bệnh bạc lá *Xa4*, *xa5* và *Xa7* vào các

giống lúa thơm chất lượng đang trồng phổ biến hiện nay: Kết quả đến vụ mùa 2014 đã tạo 72 cây BC5F1 từ các giống lúa HDT8, SH8 và BT7 mang từ 1 đến 2 gen kháng trong các gen *Xa4*, *xa5* và *Xa7*. Các cá thể này được cho tự thụ để chọn dòng thuần lúa thơm mang gen kháng bệnh bạc lá từ các thể hệ phân ly.

Sử dụng chỉ thị phân tử trong chọn lọc (MAS) để chọn các giống lúa thơm, kháng bệnh bạc lá: Kết quả chọn tạo đã đưa ra được giống lúa HDT10 cho sản xuất. Qua kết quả khảo nghiệm quốc gia và khảo nghiệm sản xuất cho thấy, giống lúa HDT10 có thời gian sinh trưởng ngắn (105 ngày trong vụ mùa), thích ứng tốt cho sản xuất tại các tỉnh phía Bắc, năng suất trung bình đạt 6,0-6,5 tấn/ha, kháng khá với bệnh bạc lá và các sâu bệnh hại khác, chất lượng khá (15,5 điểm), gạo trắng đẹp, cơm mềm, có mùi thơm. Giống lúa HDT10 đã đáp ứng được mục tiêu chọn tạo, được người sản xuất đánh giá cao và đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận cho sản xuất thử từ tháng 7/2017.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.W. Mew, A.M. Alvarez, J.E. Leach, J. Swings (1993), "Focus on bacterial blight of rice", *Plant Dis.*, **77**, pp.5-12.
- [2] L.M.T. Bradbury, T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q. Jin, D.L.E. Waters (2005), "The gene for fragrance in rice", *Plant Biotechnol. J.*, **3**, pp.363-370.
- [3] S.N. Ahn, C.N. Bollich, S.D. Tanksley (1992), "RFLP Tagging of a Gene for Aroma in Rice", *Theoretical and Applied Genetics*, **84**, pp.825-828.
- [4] L.M.T. Bradbury, T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q. Jin, R.F. Reinken, D.L.E. Waters (2005), "A perfect marker for fragrance genotyping in rice", *Molecular Breeding*, **16**, pp.279-283.
- [5] X. Chun, H. Chen, X. Zhu (2012), "Identification, Mapping, Isolation of the Genes Resisting to Bacterial Blight and Application in Rice", *Molecular Plant Breeding*, **3**(12), pp.121-131.
- [6] Dương Xuân Tú (2015), "Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá", *Luận án tiến sĩ*, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
- [7] S. Yoshimura, A. Yoshimura, R. Nelson, T.W. Mew, N. Iwata (1992), "RFLP analysis of introgressed chromosomal segments in three near isogenic lines of rice for bacterial blight resistance genes, *Xa1*, *Xa3*, *Xa4*", *Jpn. J. Breed*, **67**, pp.29-37.
- [8] S. Taura, T.T. Bui, M. Matsumoto, S.S. Aye, H.T. Phan (2004), "Gene distribution resistance to bacterial blight in North Vietnam rice varieties", *Abstract of the first international Conference on Bacterial Blight of rice*, pp.42-46.
- [9] S. Yoshimura, et al. (1998), "Expression of *Xa1*, a bacterial blight resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, pp.1663-1668.
- [10] J.J. Doyle (1990), "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, **12**, pp.13-15.
- [11] Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu (2004), "Xác định gen *fgr* điều khiển tính trạng mùi thơm bằng phương pháp Fine Mapping với microsatellites", *Hội nghị quốc gia về chọn tạo giống lúa*, tr.192-200.
- [12] I.S.H. Kumar, G.S. Khush (1986), "Genetics of amylose content in rice (*Oryza sativa* L.)", *J. Genet.*, **65**, pp.1-11.
- [13] S. Sadasivam, A. Manickam (1992), *Biochemical Methods for Agricultural Sciences*, Wiley Eastern Ltd., New Delhi.
- [14] International Rice Research Institute (1996), *Standard Evaluation System for Rice*.

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
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học môi trường
- 1.8. Khoa học nano
- 1.9. Khoa học tính toán
- 1.10. Các lĩnh vực khoa học tự nhiên khác

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 60 - Number 2 - February 2018

Đánh giá kết quả hóa xạ trị tiền phẫu trong ung thư trực tràng giai đoạn xâm lấn.

Nguyễn Văn Hiếu, Lê Văn Quảng, Bùi Công Toàn, Lê Quốc Tuấn

Ứng dụng nội soi trong phẫu thuật bóc tách lấy cơ lưng rộng trong tạo hình ngực.

Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Hồng Hà

Đánh giá tác dụng giảm đau của phương pháp từ trường kết hợp với điện châm điều trị bệnh thoái hóa cột sống thắt lưng.

Nguyễn Đức Minh

Dịch tễ bệnh Chagas và tình hình nghiên cứu bọ xít hút máu *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) ở Việt Nam.

Hồ Viết Hiếu, Lê Thành Đô, Phan Quốc Toàn, Tạ Mai Phương, Phạm Anh Tuấn, Phạm Thị Khoa, Ngô Giang Liên

Xây dựng công thức nhũ tương tạo bọt chứa dầu mè đen (*Sesamum indicum* L.), cao chiết Cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L.) L.) và cao chiết Hồng hoa (*Carthamus tinctorius* L.).

Trần Thị Thúy Oanh, Phạm Đình Duy

Đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống sâm thu thập tại Lai Châu.

Phạm Quang Tuyền, Nguyễn Minh Đức, Khương Thị Bích, Nguyễn Thái Dương, Nguyễn Trường Khoa, Bùi Thanh Tân, Nguyễn Thị Hoài Anh, Trịnh Ngọc Bon, Trần Thị Kim Hương, Trần Đăng Khánh, Khuất Hữu Trung

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng cadimi và chì trong đất đến khả năng sinh trưởng và hấp thu các kim loại này của cây cỏ mần trầu (*Eleusine indica* L.).

Phạm Thị Mỹ Phương, Đoàn Văn Tú, Nguyễn Mạnh Khải, Đặng Thị Kim Chi

Tạo phôi bò nhân bản không có zona pellucida.

Nguyễn Khánh Vân, Quán Xuân Hữu, Vũ Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Thị Lệ Hương, Phạm Doãn Lân

Sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại một số tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam.

Phạm Ngọc Thạch, Nguyễn Thị Lan, Đào Lê Anh

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ N/P và độ mặn đến sự phát triển của vi khuẩn lam (*cyanobacteria*).

Nguyễn Quang Dương Nguyễn, Nguyễn Phú Hòa

Phát hiện và giám định nhanh vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn bằng kỹ thuật PCR.

Dương Thị Nguyên, Trịnh Xuân Hoat

Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá cho các tỉnh phía Bắc.

Dương Xuân Tú, Phạm Thiên Thành, Tăng Thị Diệp, Tống Thị Huyền, Lê Thị Thanh, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Trí Hoàn

1 Evaluating the efficacy of neoadjuvant chemoradiation in the treatment of locally invasive rectal cancer.

Van Hieu Nguyen, Van Quang Le, Cong Toan Bui, Quoc Tuan Le

5 Application of endoscopic surgery in harvesting latissimus dorsi muscle flap in breast reconstruction.

Thi Thu Hang Nguyen, Hong Ha Nguyen

8 Assessing the pain relief effect of combining magnetic field and electroacupuncture in treating degenerative lumbar spine disease.

Duc Minh Nguyen

13 Chagas epidemiology and research into *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) in Vietnam.

Viet Hieu Ho, Thanh Do Le, Quoc Toan Phan, Mai Phuong Ta, Anh Tuan Pham, Thi Khoa Pham, Giang Lien Ngo

21 Formulation of foamable emulsion containing *Sesamum indicum* L. oil, *Eclipta prostrata* (L.) L. extract, and *Carthamus tinctorius* L. extract.

Thi Thuy Oanh Tran, Dinh Duy Pham

27 Genetic diversity of several ginseng plants collected in Lai Chau.

Quang Tuyen Pham, Minh Duc Nguyen, Thi Bich Khuong, Thai Duong Nguyen, Truong Khoa Nguyen, Thanh Tan Bui, Thi Hoai Anh Nguyen, Ngoc Bon Trinh, Thi Kim Huong Tran, Dang Khanh Tran, Huu Trung Khuat

32 Study of the affect of cadmium and lead concentrations in soil to the growth and accumulation of these metals in *Eleusine indica* L.

Thi My Phuong Pham, Van Tu Doan, Manh Khai Nguyen, Thi Kim Chi Dang

36 Production of zona-free cloned bovine embryos.

Khanh Van Nguyen, Xuan Huu Quan, Thi Thu Huong Vu, Thi Huong Nguyen, Thi Le Huong Nguyen, Doan Lan Pham

43 The prevalence and genetic characteristics of avian influenza viruses subtype A/H5N6 in a number of northern border provinces in Vietnam.

Ngoc Thach Pham, Thi Lan Nguyen, Le Anh Dao

49 The effect of the N/P ratios on the growth of *cyanobacteria* at different salinities.

Quang Duong Nguyen Nguyen, Phu Hoa Nguyen

53 Rapid detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing cassava bacterial blight based on PCR technique.

Thi Nguyen Duong, Xuan Hoat Trinh

59 Application of molecular markers in the breeding of aromatic rice varieties with resistance to bacterial leaf blight.

Xuan Tu Duong, Thien Thanh Pham, Thi Diep Tang, Thi Huyen Tong, Thi Thanh Le, Thi Thu Nguyen, Tri Hoan Nguyen