



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 60 - Số 5 - Tháng 5 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

Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN

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

EDITORIAL OFFICE

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

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

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

PUBLICATION LICENCE

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

Đánh giá hiệu quả vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu trong điều trị bệnh nhân viêm khớp vai thể đơn thuần

Phạm Văn Minh^{1*}, Vũ Thị Duyên Trang²

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Việt Tiệp, Hải Phòng

Ngày nhận bài 26/2/2018; ngày chuyển phản biện 28/2/2018; ngày nhận phản biện 22/3/2018; ngày chấp nhận đăng 29/3/2018

Tóm tắt:

Viêm quanh khớp vai (VQKV) là bệnh thường gặp trong lâm sàng phục hồi chức năng, bệnh này có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng lao động và sinh hoạt của người bệnh. Mục tiêu của đề tài nhằm đánh giá hiệu quả vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu trong điều trị bệnh nhân (BN) VQKV thể đơn thuần. Đây là nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng, BN được chia làm 2 nhóm: Nhóm chứng gồm 32 BN được điều trị bằng vật lý trị liệu (parafin và điện xung); nhóm nghiên cứu gồm 32 BN được điều trị bằng vật lý trị liệu (parafin và điện xung) và vận động trị liệu. Qua nghiên cứu cho thấy, sau 30 ngày điều trị, nhóm nghiên cứu đạt kết quả tốt hơn nhóm chứng ($p < 0,01$). Nhóm chứng chỉ có 2 BN đạt kết quả rất tốt (6,2%), 4 BN đạt kết quả tốt (12,5%). Nhóm nghiên cứu có 4 BN đạt kết quả rất tốt (12,5%), 16 BN đạt kết quả tốt (50%).

Từ khóa: Vận động trị liệu, vật lý trị liệu, viêm quanh khớp vai thể đơn thuần.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

VQKV là tên gọi tắt cả các trường hợp đau và hạn chế vận động khớp vai có tổn thương tại các cấu trúc phần mềm quanh khớp, bao gồm gân, cơ, dây chằng và bao khớp. Đây không phải là tổn thương khớp vai chính thức, nó không bao gồm những tổn thương đặc thù của xương và các chấn thương [1, 2]. Theo thống kê 10 năm (1991-2000) tại Khoa Cơ - Xương - Khớp, Bệnh viện Bạch Mai thì VQKV chiếm tỷ lệ 13,24% tổng số BN điều trị [3].

Theo các nghiên cứu của Wagenhauser (1979), tại Thụy Sĩ tỷ lệ mắc bệnh là 8,9% dân số [4]. Tại Anh, thống kê trên cả nước trong 9 tháng có khoảng 11.000 BN VQKV đến khám tại phòng khám [5]. VQKV tuy không ảnh hưởng đến sinh mạng nhưng lại ảnh hưởng rất lớn đến khả năng lao động và sinh hoạt của người bệnh.

Ở Việt Nam, khoảng vài năm gần đây đã có một số cơ sở tiến hành điều trị cho BN VQKV, tuy nhiên chưa có tác giả nào đi sâu tìm hiểu về hiệu quả điều trị bằng vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu. Do vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục tiêu: Đánh giá hiệu quả điều trị bằng vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu đối với VQKV thể đơn thuần.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Gồm 64 BN được chẩn đoán VQKV theo tiêu chuẩn chẩn đoán của M.C. Boissier (1992) [5] điều trị tại Khoa Vật lý trị liệu - Phục hồi chức năng,

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Tiêu chuẩn chọn BN nghiên cứu: BN trên 18 tuổi; được chẩn đoán VQKV thể đơn thuần theo tiêu chuẩn của Boissier MC 1992 [5]; được điều trị tối thiểu 15 ngày và được theo dõi trong 1 tháng.

Tiêu chuẩn loại bệnh nhân khỏi nghiên cứu: 1) VQKV thể đau vai cấp, thể giả liệt, thể đông cứng; 2) Tổn thương khớp ổ chảo - cánh tay do các nguyên nhân khác: U (phổi, vú), thiếu năng vành, tổn thương rễ thần kinh cổ - cánh tay C5...; 3) Các trường hợp đau và hạn chế vận động khớp vai do nguyên nhân khác (liệt nửa người do tai biến mạch máu não...); 4) Trong thời gian điều trị mắc các bệnh cấp tính.

Phương pháp nghiên cứu: Sử dụng phương pháp nghiên cứu tiến cứu thuộc nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng. BN được chia ngẫu nhiên vào 2 nhóm: Nhóm chứng gồm 32 BN được điều trị bằng vật lý trị liệu (parafin + điện xung). Nhóm nghiên cứu gồm 32 BN được điều trị bằng vật lý trị liệu (parafin + điện xung) và vận động trị liệu.

Quy trình điều trị

Parafin: Một miếng parafin đắp trực tiếp ở vùng vai sau, một miếng đắp ở vùng vai trước. Dùng miếng nilon để phủ ngoài, sau đó quấn chăn nhỏ phủ kín và hơi chặt để giữ nhiệt và parafin luôn tiếp xúc tốt với da. Thời gian điều trị: 20 phút/lần x 1 lần/ngày. Đợt điều trị 15 ngày.

Điện xung dòng trung tần: Loại máy Firing, dòng điện

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

Evaluation of effectiveness of exercises therapy combined with physiotherapy in treatment for patients with simple periarthritis of the shoulder

Van Minh Pham^{1*}, Thi Duyen Trang Vu²

¹Hanoi Medical University

²Viet Tiep General Hospital, Hai Phong

Received 26 February 2018; accepted 29 March 2018

Abstract:

Periarthritis of the shoulder is a common disease in clinical rehabilitation. It greatly affects the working and living capacity of the patients. The objective of this study is to evaluate the effect of exercises therapy combined with physiotherapy in the treatment of patients with simple periarthritis of the shoulder. Subjects and methods: Randomized controlled trial. Patients were divided into two groups: the control group consisting of 32 patients treated with physiotherapy (paraffin and pulse), the study group consisting of 32 patients treated with physiotherapy (paraffin and pulse) and exercises therapy. Results and conclusions: After 30 days of treatment, the study group achieved better results than the control ($p < 0.01$). The control group had 2 patients with very good results (6.2%), 4 patients with good results (12.5%). The study group included 4 patients with very good results (12.5%), 16 patients with good results (50%).

Keywords: Exercise therapy, physiotherapy, simple periarthritis of the shoulder.

Classification number: 3.2

xung giao thoa, chu kỳ ngắn. Tần số 4000 Hz, dòng ra có tần số 50-100 Hz. Thời gian điều trị 10 phút/lần x 1 lần/ngày. Đợt điều trị 15 ngày.

Vận động trị liệu: Tập vận động thụ động, tập vận động chủ động, tập với dụng cụ trợ giúp khớp vai. Thời gian điều trị 20 phút/lần x 2 lần/ngày. Đợt điều trị 30 ngày.

Tiêu chuẩn đánh giá kết quả nghiên cứu: Theo tiêu chuẩn C.R. Constant và A.H.G. Murley (1987) gồm mức độ đau, tầm vận động khớp vai, các hoạt động sinh hoạt hàng ngày và lực của vai. Thời điểm đánh giá: Ngày đầu điều trị và ngày thứ 30 sau điều trị.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả theo dõi, đánh giá đối với các BN ở nhóm nghiên cứu (NC) và nhóm chứng về các mức độ: Cải thiện đau, cải thiện tầm vận động khớp vai, cải thiện các hoạt động sinh hoạt hàng ngày, cải thiện lực vai, cải thiện kết quả điều trị chung được thể hiện trong các bảng 1-5.

Bảng 1. Mức độ cải thiện đau.

Mức độ đau	Nhóm NC (1)	Nhóm chứng (2)	p2 (2)/(1)
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
Ngày 1	3,4 $\pm$ 3,2	3,8 $\pm$ 3,6	>0,05
Ngày 30	14,2 $\pm$ 1,8	13,4 $\pm$ 2,4	
Mức chênh lệch sau/trước	10,8 $\pm$ 2,9	9,7 $\pm$ 2,8	
p1 (ngày 30/ngày 1)	< 0,01		

Nhận xét: Đa số BN thay đổi rõ rệt mức độ đau sau điều trị bằng cả hai phương pháp ($p < 0,01$). Tại thời điểm ngày điều trị thứ 30, mức độ cải thiện tình trạng đau của hai nhóm là tương đương nhau ($p > 0,05$).

Bảng 2. Mức độ cải thiện tầm vận động khớp vai.

Tầm vận động khớp vai	Nhóm NC (1)	Nhóm chứng (2)	p2 (2)/(1)
	$\bar{X}$	$\bar{X} \pm SD$	
Ngày 1	20,5 $\pm$ 9,5	19,1 $\pm$ 9,4	< 0,01
Ngày 30	38,6 $\pm$ 3,1	30,1 $\pm$ 3,2	
Mức chênh lệch sau/trước	18,1 $\pm$ 8,1	11,0 $\pm$ 8,0	
p1 (ngày 30/ngày 1)	< 0,01		

Nhận xét: Đa số BN có thay đổi đáng kể tầm vận động khớp vai trước và sau điều trị ở cả hai nhóm ($p < 0,01$). Nhóm nghiên cứu cải thiện tầm vận động khớp vai tốt hơn nhóm chứng ($p < 0,01$).

Bảng 3. Mức độ cải thiện các hoạt động sinh hoạt hàng ngày.

Các hoạt động sinh hoạt hàng ngày	Nhóm NC (1)	Nhóm chứng (2)	p2 (2)/(1)
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
Ngày 1	7,4 $\pm$ 3,7	7,1 $\pm$ 3,4	< 0,01
Ngày 30	18,5 $\pm$ 1,6	14,5 $\pm$ 1,8	
Mức chênh lệch sau/trước	11,0 $\pm$ 3,3	7,4 $\pm$ 3,6	
p1 (ngày 30/ngày 1)	< 0,01		

Nhận xét: Đa số BN có cải thiện các hoạt động sinh hoạt hàng ngày trước và sau điều trị ở cả hai nhóm ($p < 0,01$). Nhóm nghiên cứu cải thiện các hoạt động sinh hoạt hàng ngày tốt hơn nhóm chứng ($p < 0,01$).

Bảng 4. Mức độ cải thiện lực vai.

Lực vai	Nhóm NC (1)	Nhóm chứng (2)	p2 (2)/(1)
	$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$	
Ngày 1	3,3 $\pm$ 3,7	3,0 $\pm$ 2,0	>0,05
Ngày 30	12,0 $\pm$ 3,7	9,5 $\pm$ 3,1	< 0,05
Mức chênh lệch sau /trước	8,7 $\pm$ 4,0	6,5 $\pm$ 2,6	
p1 (ngày 30/ngày 1)	< 0,01		

Nhận xét: Cả hai nhóm BN đều thay đổi đáng kể lực vai trước và sau điều trị ($p < 0,01$). Nhóm nghiên cứu gia tăng lực vai tốt hơn nhóm chứng ($p < 0,05$).

Bảng 5. Mức độ cải thiện kết quả điều trị chung.

Kết quả	Nhóm NC		Nhóm chứng		Tổng		p
	n	%	n	%	n	%	
Rất tốt	4	12,5	2	6,2	6	9,4	< 0,01
Tốt	16	50,0	4	12,5	20	31,2	
Khá	9	28,1	8	25,0	17	26,6	
Trung bình	3	9,4	18	56,2	21	32,8	
Tổng	32	100	32	100	64	100	

Nhận xét: Sau 30 ngày điều trị, nhóm nghiên cứu đạt kết quả tốt hơn nhóm chứng ($p < 0,01$). Nhóm chứng chỉ có 2 BN đạt kết quả rất tốt (6,2%), 4 BN đạt kết quả tốt (12,5%). Nhóm nghiên cứu có 4 BN đạt kết quả rất tốt (12,5%), 16 BN đạt kết quả tốt (50%).

Bàn luận

Thay đổi mức độ đau

Rất nhiều tác giả đánh giá sự phục hồi khớp vai qua mức độ đau, bởi vì sự xuất hiện hoặc mất đi cảm giác đau liên quan chặt chẽ với chức năng của vai. Chúng tôi đánh giá mức độ đau theo bảng điểm chức năng khớp vai của C.R. Constant và A.H.G. Murley (1987), tiêu chí này dựa trên cảm giác chủ quan của BN tại thời điểm nghiên cứu trên cơ sở lượng hóa.

Trong số 64 BN nghiên cứu tại thời điểm lúc vào viện, mức độ đau trung bình của BN giữa hai nhóm là như nhau. Sau quá trình điều trị, hiệu quả giảm đau đều đạt được rõ rệt ở cả hai nhóm BN với mức tăng điểm đau trung bình của nhóm nghiên cứu là 14,2 $\pm$ 1,8 điểm và nhóm chứng là 13,4 $\pm$ 2,4 điểm ($p < 0,01$). Cả paraffin và điện xung đều có tác dụng làm giãn mạch, tăng tuần hoàn tại chỗ, chống co thắt cơ, tăng cường dinh dưỡng và chuyển hóa tại chỗ nên có tác dụng giảm đau, chống viêm.

Lierz và cs cũng đã nhấn mạnh ý nghĩa của việc điều trị giảm đau, BN chỉ tập luyện được khi đỡ đau [6]. Lê Thị Hoài Anh điều trị VQKV bằng phương pháp điện châm, xoa bóp và điện châm, xoa bóp kết hợp vận động trị liệu thì thấy

triệu chứng đau được cải thiện đáng kể ở nhóm BN điều trị bằng điện châm, xoa bóp kết hợp vận động trị liệu [7].

Thay đổi tầm vận động khớp vai

Tầm vận động khớp vai là một trong bốn tiêu chí mà chúng tôi sử dụng để đánh giá hiệu quả của phương pháp điều trị đối với bệnh VQKV. Song song với việc giảm đau, chúng tôi nhận thấy khả năng vận động khớp vai của 64 BN trong nghiên cứu đều được cải thiện một cách rõ rệt tất cả các động tác ở cả hai nhóm BN ($p < 0,01$). Tuy nhiên, hiệu quả cải thiện tầm vận động khớp vai ở nhóm BN được điều trị bằng vật lý trị liệu kết hợp vận động trị liệu là tốt hơn so với các BN điều trị bằng vật lý trị liệu đơn thuần ($p < 0,05$).

Nguyễn Thị Cẩm Châu, Trần Ngọc Ân (1987) điều trị VQKV bằng châm cứu kết hợp vận động khớp vai đạt kết quả tốt với động tác dạng (71,8%), động tác gấp (65,6%) và động tác duỗi (56,2%) [8].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với lý thuyết, rằng các bài tập vận động trị liệu giúp cho tầm vận động khớp vai được cải thiện rõ rệt. Cùng với các phương pháp điều trị khác, vận động trị liệu đối với các BN VQKV thực sự có ý nghĩa. Nếu chúng ta chỉ chú trọng đến điều trị giảm đau mà không tập luyện hay chỉ cho tập luyện nhẹ nhàng trong suốt quá trình điều trị thì hiệu quả giảm đau không cao, khớp vai không được trả lại các tầm vận động bình thường của nó, kéo theo lực của vai giảm và các hoạt động sinh hoạt hàng ngày cũng rất khó khăn.

Thay đổi các hoạt động sinh hoạt hàng ngày

Trước điều trị, điểm trung bình của các hoạt động sinh hoạt hàng ngày của nhóm nghiên cứu và nhóm chứng là không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Ở thời điểm ngày điều trị thứ 30, điểm trung bình hoạt động sinh hoạt hàng ngày của cả hai nhóm tăng lên rõ rệt ($p < 0,01$). Những khó khăn trong việc thực hiện các hoạt động sinh hoạt hàng ngày của BN thường do đau, tầm vận động bị hạn chế và cơ bị teo do bất động lâu. Khi các yếu tố này được cải thiện qua điều trị thì việc thực hiện các hoạt động sinh hoạt hàng ngày cũng tốt hơn. Các hoạt động sinh hoạt hàng ngày là không thể thiếu đối với con người, đặc biệt là đối với BN. Chính vì vậy, đánh giá các hoạt động sinh hoạt hàng ngày của BN sau điều trị cũng có ý nghĩa rất quan trọng.

Thay đổi lực vai

Lực vai trước khi điều trị của nhóm nghiên cứu và nhóm chứng không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Ở thời điểm ngày thứ 30 thì chỉ số này tăng lên rõ rệt ở cả hai nhóm ($p < 0,01$), ở nhóm nghiên cứu có lực vai tăng khác biệt với nhóm chứng ($p < 0,05$).

Cùng với quá trình điều trị bằng vật lý trị liệu, khi tiến hành tập theo tầm vận động của khớp vai, giúp cho tình

trạng đau của khớp vai được giảm bớt, tầm vận động của khớp được gia tăng, các bài tập có kháng trở giúp các cơ và tổ chức phần mềm quanh khớp được tác động nhiều, trở lên dẻo dai, mạnh mẽ hơn, do đó lực của vai được tăng lên.

Đánh giá về lực của vai trong điều trị VQKV là rất cần thiết, vì nếu lực vai yếu thì thời gian phục hồi tầm vận động kéo dài hơn. Nếu chỉ cải thiện đau và tầm vận động khớp vai cho BN thì chức năng của cánh tay vẫn chưa đạt được hiệu quả tối đa. Ngoài ra lực vai còn giúp duy trì kết quả điều trị lâu hơn, giảm khả năng tái phát bệnh.

Sau điều trị, điểm trung bình của lực vai theo nghiên cứu của chúng tôi có thấp hơn so với nghiên cứu trên 100 BN của C.R. Constant, có thể do sự khác nhau về thể chất giữa người Việt Nam so với người nước ngoài, do ứng dụng phương pháp điều trị khác nhau...

Cải thiện kết quả chung

Qua nghiên cứu hiệu quả điều trị của 64 BN VQKV thể đơn thuần bằng vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu, chúng tôi nhận thấy hiệu quả điều trị ở nhóm điều trị bằng vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu cao hơn nhóm điều trị bằng vật lý trị liệu đơn thuần. Điều đó chứng tỏ khi kết hợp với vận động trị liệu, tầm vận động của khớp vai được cải thiện rõ rệt. Khi tầm vận động khớp tăng lên, tình trạng đau cũng được giảm bớt, các hoạt động sinh hoạt hàng ngày của BN dễ dàng hơn.

Theo R. Cailliet [9], bất động mang đến một tình trạng thiếu máu của tổ chức trong sâu, làm chậm chuyển hóa cơ bản và gây ra phù nề. Những tổ chức quan trọng ở quanh khớp vai như cơ có thể co lại, thư giãn, kéo dài ra hoặc đàn hồi rất tốt nếu tình trạng dinh dưỡng bình thường, còn bất động sẽ làm xuất hiện cơ chế khiếm khuyết.

Đối với VQKV thể đơn thuần, nếu không điều trị BN có khả năng tự phục hồi [10]. Tuy nhiên, mức độ và thời gian tự phục hồi ở mỗi BN lại khác nhau, tùy thuộc mức độ tổn thương khớp, các bệnh kèm theo, dinh dưỡng, thể lực, điều kiện công việc, hoạt động hàng ngày... Do vậy, nếu không điều trị, thời gian tự phục hồi sẽ kéo dài hơn, bệnh dễ tái phát hơn, ảnh hưởng đến khả năng lao động, chất lượng cuộc sống hàng ngày của người bệnh và việc điều trị sau đó sẽ khó khăn hơn. Theo Trần Ngọc Ân [1], điều trị vật lý và vận động trị liệu là phương pháp không kém phần quan trọng, nói cách khác là không thể thiếu trong điều trị bệnh khớp nhằm mục đích phục hồi vận động khớp và khả năng lao động của người bệnh, hạn chế tình trạng tàn phế và bế tắc trong cuộc sống.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng không ghi nhận trường hợp nào có những tác dụng không mong muốn của quá trình điều trị. Bệnh nhân ở nhóm kết hợp vận động trị liệu được hướng dẫn chủ động tập luyện tại bệnh viện và được tiếp tục

duy trì các bài tập này thường xuyên tại nhà. Do vậy, các bài tập vận động trị liệu có thể áp dụng rộng rãi tại cộng đồng nhằm giảm chi phí và thời gian điều trị tại bệnh viện.

Kết luận

Qua nghiên cứu nêu trên, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Cải thiện mức độ đau: Hai phương pháp có hiệu quả giảm đau tương đương nhau ($p > 0,05$).
- Cải thiện tầm vận động: Hiệu quả điều trị ở nhóm BN với vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu cao hơn nhóm điều trị bằng vật lý trị liệu ($p < 0,01$).
- Cải thiện các hoạt động sinh hoạt hàng ngày: Hiệu quả điều trị ở nhóm BN với vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu cao hơn đáng kể so với nhóm điều trị bằng vật lý trị liệu ($p < 0,01$).
- Cải thiện lực vai: Hiệu quả điều trị ở nhóm BN với vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu cao hơn nhóm điều trị bằng vật lý trị liệu ($p < 0,05$).
- Mức độ cải thiện kết quả điều trị chung: Sau quá trình điều trị thì nhóm nghiên cứu đạt kết quả tốt hơn nhóm chứng ($p < 0,01$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trần Ngọc Ân (1999), "VQKV", *Bệnh khớp*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr.334-344.
- [2] Trần Ngọc Ân (1993), *Bệnh khớp*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr.227-286.
- [3] Nguyễn Thị Ngọc Lan (2012), "Bệnh lý phần mềm quanh khớp", *Bệnh học cơ xương khớp nội khoa*, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, tr.163-176.
- [4] Đào Hùng Hạnh (1995), *Sử dụng siêu âm để phát hiện các tổn thương trong VQKV*, Luận văn thạc sỹ khoa học y dược, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [5] M.C. Boissier (1992), *Périarthritides Scapulo - Humérales*, Conférence de Rhumatologie de Paris, pp.21-28.
- [6] P. Lierz, P. Hoffmann, P. Felleiter, K. Horauf (1998), "Interscalene plexus block for mobilizing chronic shoulder stiffness", *Wien - Klin - Wochenschr*, **110** (21), pp.766-769.
- [7] Lê Thị Hoài Anh (2001), *Nghiên cứu tác dụng điều trị VQKV bằng điện châm, xoa bóp kết hợp vận động trị liệu*, Luận văn thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [8] Nguyễn Thị Cẩm Châu, Trần Ngọc Ân và cs (1987), "Điều trị VQKV bằng châm cứu", *Tạp chí Nội khoa*, **1**, tr.21-25.
- [9] R. Cailliet (1998), "Pericapsulitis shoulder pain", *Neck and arm pain*, **2**, pp.150-154.
- [10] Nguyễn Xuân Nghiên, Trần Văn Chương, Trần Trọng Hải, Cao Minh Châu, Trần Quang Lung và cs (2002), *Vật lý trị liệu và phục hồi chức năng*, 194 trang, Nhà xuất bản Y học Hà Nội.

Nghiên cứu tạo hệ phân phối thuốc hướng đích chủ động chitosan-mixen-paclitaxel-aptamer ứng dụng điều trị ung thư

Nguyễn Kim Thạch^{1*}, Liêu Mỹ Đông², Lê Đức Vinh³, Lê Quang Huân⁴

¹Bộ môn Hoá - Sinh hoá đại cương, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

²Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm

³Bộ môn Kỹ sinh - Vi nấm học, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

⁴Phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 30/3/2018; ngày chuyển phản biện 3/4/2018; ngày nhận phản biện 2/5/2018; ngày chấp nhận đăng 7/5/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm phát triển phức hệ hạt Chitosan, Pluronic® F127 bằng phương pháp tạo gel ion bao paclitaxel (PTX) và gắn DNA aptamer đích ứng dụng trong điều trị ung thư in vitro. Các mixen polyme tự kết hợp thành các khối đồng polyme với đường kính tương đương 69 nm trong dung dịch. Thuốc chống ung thư (PTX) được bao gói với hiệu quả 83,28±0,13% và mang tải 9,12±0,34%. Các hạt Ap-mixen được chế tạo có dạng hình cầu và đường kính trung bình 86,22 ±1,45 nm. Trong khảo sát sự phóng thích thuốc, hạt Ap-mixen phóng thích thuốc ở giai đoạn đầu đạt 29-35% trong 12 giờ đầu tiên và đạt 85-93% sau 12 ngày trong môi trường pH 7,5. Trong thí nghiệm gây độc tế bào, dùng PTX tự do và các hạt Ap-mixen được khảo sát trên dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3. Các liều IC₅₀ được xác định bằng phương pháp MTT cho thấy, các hạt Ap-mixen chống lại tế bào SK-BR-3 hiệu quả hơn PTX tự do và gây độc diệt tế bào lên đến 89-93% sau 6-48 giờ. Kết quả của nghiên cứu đã chứng minh các hạt mixen kết hợp DNA aptamer có tính tương thích sinh học và có tiềm năng sử dụng như hệ dẫn truyền thuốc chống ung thư.

Từ khóa: Chitosan, DNA aptamer, mixen, paclitaxel, pluronic.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

PTX là nhóm thuốc hóa trị chống ung thư. Chúng làm ức chế sự phân rã mạng lưới vi thể của thoi vô sắc, kích thích quá trình ghép các dimer của vi ống thành mạng lưới vi thể và ổn định mạng lưới vi thể bằng cách ngăn chặn quá trình tháo xoắn của chúng. PTX đã được chứng minh tác dụng trong thử nghiệm lâm sàng điều trị các khối u rắn như ung thư buồng trứng, ung thư vú di căn, ung thư phổi tế bào không nhỏ, AIDS liên quan ung thư trên da Kaposi sarcoma [1, 2]. PTX là một pseudoalkaloid diterpenoid kỵ nước cao với độ hòa tan kém, khoảng 1 µg/ml [3]. Vì vậy, ngoài việc ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư, chúng còn gây nhiều tác dụng phụ không mong muốn trên các tế bào khỏe mạnh. Để khắc phục hạn chế này, các nhà nghiên cứu đã không ngừng tìm kiếm các hệ dẫn truyền thuốc mới có tác dụng ức chế hoặc làm tiêu biến tế bào ung thư nhưng ít có tác dụng phụ. Trong những năm gần đây, các phức hệ mixen phân hủy sinh học được quan tâm nghiên cứu phát triển như những hệ dẫn truyền thuốc mang lại nhiều hiệu quả [4]. Các khối đồng polyme lưỡng tính (amphiphilic block

copolymer) đã được nghiên cứu rộng rãi, được xem như là các tác nhân giúp các loại thuốc kém tan ổn định trong hệ dẫn truyền thuốc [5]. Chúng có thể tự kết hợp thành các mixen polyme trong môi trường dung dịch. Hầu hết các mixen polyme được tạo thành từ một nhân bên trong kỵ nước và một lớp bao thân nước bên ngoài [6]. Một số loại thuốc kém tan có thể được bao vào bên trong lõi kỵ nước của các mixen để tăng độ tan của chúng trong nước. Vô thân nước có khả năng kéo dài thời gian lưu của chúng trong cơ thể, giảm quá trình thực bào và thanh thải qua thận. Các mixen polyme thường có kích thước đường kính trung bình 10-100 nm, chúng dễ tích lũy trong mô sinh ung thư thông qua cơ chế tăng cường tính thấm và tồn lưu (Enhanced Permeation and Retention, EPR) nhiều hơn so với các mô lành bình thường [7]. Một trong các mixen thường được sử dụng nhất trong dẫn truyền thuốc là Pluronic, một tam khối đồng polyme lưỡng tính, gồm poly (ethylene oxide) (PEO) và poly (propylene oxide) (PPO). Khối thân nước (PEO) tạo thành lớp vỏ và khối kỵ nước (PPO) tạo nhân của các mixen. Pluronic® F127 (PF) đã thu hút nhiều sự chú ý bởi chúng không có độc tính với cơ thể và có khả năng đóng gói

*Tác giả liên hệ: Email: nguyengkimthach@pnt.edu.vn

Investigation on preparing an active drug delivery system for a chitosan-micelle-paclitaxel-aptamer to treat cancer

Kim Thach Nguyen^{1*}, My Dong Lieu², Duc Vinh Le³, Quang Huan Le⁴

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Pham Ngoc Thach University of Medicine, Ho Chi Minh city

²Faculty of Food Technology, University of Food Industry, Ho Chi Minh city

³Department of Parasitology and Mycology, Pham Ngoc Thach University of Medicine, Ho Chi Minh city

⁴Laboratory of Animal Cell Technology, Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

Received 30 March 2018; accepted 7 May 2018

Abstract:

Development of paclitaxel-loaded was prepared by an ionic-gelation method using Chitosan, Pluronic® F127, and DNA aptamer conjugate to treat cancer cells in vitro. These polymeric micelles were self-assembled into copolymer blocks of approximately 69 nm diameter in an aqueous media. Anticancer drug (PTX) can be loaded at a high encapsulation efficiency of $83.28 \pm 0.13\%$ and loading capacity of $9.12 \pm 0.34\%$. The prepared Ap-micelles had a spherical shape and a mean diameter ranging at 86.22 ± 1.45 nm. Through an in vitro release study, the Ap-micelle formulation exhibited a biphasic drug release with a moderate initial burst, followed by a sustained release profile of 29-35% in the first 12 hours and 85-93% after 12 days at pH 7.5 receiving media. In vitro cytotoxicity of free PTX and PTX loaded Ap-micelles were evaluated using SK-BR-3 breast cancer cell line. The IC_{50} doses determined by the MTT assay showed the greater activity of PTX loaded Ap-micelles over free PTX, and these Ap-micelles killed cells up to 89-93% after 6-48 hours. These results demonstrated that DNA aptamer incorporated with copolymer micelles are biocompatible and have the potential to be used as anticancer drug carriers.

Keywords: Chitosan, DNA aptamer, micelle, paclitaxel, pluronic.

Classification number: 3.4

được với các loại thuốc kém tan. Tuy nhiên, mặt hạn chế khi sử dụng các mixen polyme này là sự bất ổn định của chúng [7]. Để khắc phục mặt hạn chế này, chúng tôi nghiên cứu kết hợp PF với chitosan (Chi) để tạo thành một đồng polyme. Chi đã được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng y sinh học và dược phẩm vì chúng có khả năng tương thích sinh học và phân hủy sinh học. Mặc dù phức hợp Chi kết hợp PF đã được sử dụng ở nhiều dạng như dịch hydrogel, mixen kết tập và các phân tử hạt mixen, nhưng chúng chưa được sử dụng làm hệ dẫn truyền thuốc chống ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chế tạo phức hệ dẫn truyền hạt mixen bao PTX bằng phương pháp tạo gel ion từ sự kết hợp Chi và PF. Mạch đơn oligonucleotide từ thư viện ban đầu được chọn lọc theo quy trình DNA SELEX thu được các mạch ái lực liên kết cao với các tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2 [8, 9]. Chúng được gắn vào phức hệ hạt mixen, giúp tăng ái lực nhận diện các tế bào SK-BR-3 đặc hiệu [10]. Hiệu quả của phức hệ hạt mixen được đánh giá qua các giá trị kích thước hạt, sự ổn định, khả năng bao thuốc, khả năng phóng thích thuốc in vitro và khả năng gây độc lên dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3.

Vật liệu - phương pháp nghiên cứu

Acid acetic 6%; acid acetic 1 N; chitosan F-MMW 400 kDa (Sigma Aldrich); natri nitrite ($NaNO_2$); acid hydrochloric (HCl, Merck); natri hydroxid (NaOH) 4 N; acetone; natri triphosphat ($Na_3P_3O_{10}$) (TPP, Merck); pluronic® F-127 (PF, Life Technologies); PTX (PTX, Life Technologies); 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT, Life Technologies); dimethylsulfoxid (DMSO, Merck); succinic anhydride (SA, Acros Organics); 4-dimethylaminopyridine (DMAP, Acros Organics); triethylamine (TEA, Acros Organics); N,N dimethylformamide (DMF, Acros Organics); 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC, Acros Organics); N-hydroxysuccinimide (NHS, Acros Organics); 2-mercaptoethanol và diethyl ether (Merck); amicon Ultra-15 (MWCO = 3kD, Merck Milipore); nước cất hai lần.

Dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3 (HTB-30TM, ATCC®); môi trường McCoy's 5A (Life Technologies); huyết thanh bê (FBS, Life Technologies); Trypsin-EDTA (Life Technologies); Ceftriaxon và Vancomycin (Công ty CP dược Bidiphar). Trong quy trình chọn lọc SELEX sử dụng RNeasy Mini Kit của Qiagen (Chatsworth, CA) và Taq Gold DNA polymerase của Promega (Madison, USA).

Chọn lọc DNA aptamer theo quy trình SELEX (Ap)

Các mạch đơn oligonucleotid từ thư viện ban đầu (khoảng 10^{14} - 10^{15} mạch đơn khác nhau, IDT Singapore)

5'-TCA CCG GGA GGA GAC CCT GA-N40-GTG GCT TGG TGG TGG TTC AA -3', mỗi xuôi 5'-TCA CCG GGA GGA GAC CCT GA-3' và mỗi ngược 3'-TTG AAC CAC CAC CAA GCC AC-5'. Các mồi của gen HER-2 (mỗi xuôi 5'-AGC CGC GAG CAC CCA AGT-3', mỗi ngược 5'-TTG GTG GGC AGG TAG GTG AGT T-3') và các mồi của gen Beta-actin (mỗi xuôi 5'-GAT GAG ATT GGC ATG GCT TT-3', mỗi ngược 5'-CTC AAG TTG GGG GAC AAAA-3') được ủ với các tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2. Chọn lọc loại bỏ các oligonucleotide mạch đơn và tế bào không gắn kết với nhau, thu các phức hợp liên kết.

Tiến hành phân tách phức hợp liên kết giữa oligonucleotide mạch đơn và tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2 để thu được các oligonucleotid mạch đơn đích mong muốn. Dùng PCR nhân lượng mạch đơn oligonucleotide đích, tạo nguồn thư viện DNA mới cho lần lặp lại quy trình chọn lọc trên. Quy trình chọn lọc được lặp lại 5-20 lần để thu được các sản phẩm DNA aptamer có số lượng lớn và ái lực liên kết cao. Thực hiện kiểm tra các trình tự DNA aptamer bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger (ABI prism® 3100 genetic analyser).

Tạo hạt nano chitosan phân tử lượng thấp

Pha 1 g chitosan (400 kD) trong 50 ml dung dịch acid acetic 6% (Moghaddam và cộng sự) [1]. Thêm vào dung dịch trên 10 ml dung dịch NaNO₂ (7 mg/ml), sau đó khuấy 1 giờ ở nhiệt độ phòng để hòa tan Chi. Điều chỉnh pH đến 9,0 bằng dung dịch NaOH 4 N. Ly tâm 10.000 vòng/phút, thời gian 5 phút. Loại bỏ dung dịch ly tâm, phần cặn màu trắng vàng được rửa 3 lần với acetone. Sau khi làm bay hơi hoàn toàn acetone, cặn ly tâm được hòa tan trong dung dịch acid acetic 0,1 N, sau đó thẩm tích trong nước với kích thước lỗ màng bán thấm là 12 KDa, thời gian thẩm tích 24 giờ, sau 4-6 giờ thay nước 1 lần. Đông khô dịch sau thẩm tích và bảo quản ở 4°C.

Tạo hạt mixen Chi-TPP-PF

Các hạt mixen Chi được chế tạo bằng phương pháp tạo gel ion (tạo liên kết ion) (S.K. Bong và cộng sự) gắn TPP để tạo hạt mixen Chi kích thước nhỏ [6]. Hòa tan Chi phân tử lượng thấp trong acid acetic 1% (v/v) và lần lượt thêm vào TPP 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025% và 0,03% tạo sản phẩm riêng rẽ theo thể tích Chi:TPP là 2:1. Khuấy từ các sản phẩm trong 1 giờ để hòa tan hoàn toàn, đến khi độ đục ở các sản phẩm xuất hiện. Dùng Chi-TPP 0,025% hòa tan lần lượt với PF ở các nồng độ 10, 15 và 20%.

Carboxyl hoá nhóm COOH của Chi-TPP-Pluronic (CT-Pluronic F127)

Khử nguyên tử hydro của nhóm COOH tận cùng của

chuỗi PEO-PPO-PEO (Pluronic F127, MW 12.500) bằng succinic anhydride (G. Zahra và cộng sự) [8]. Chi-TPP-Pluronic (15 g, 2 mmol), succinic anhydride (0,56 g, 3 mmol), DMAP (0,5 g), và TEA (0,5 ml) được hòa tan trong 30 ml 1,4-dioxane, khuấy liên tục qua đêm ở 30°C. Sau đó làm bay hơi 1,4-dioxane bằng ly tâm chân không 900 vòng/phút, 120 phút. Phần dư lượng cô đặc được hòa tan trong 1 ml chloroform. Thêm 3 ml diethyl ether để thu kết tủa, thực hiện lặp lại vài lần để loại bỏ hoàn toàn succinic anhydride, DMAP và TEA. Ly tâm chân không 900 vòng/phút, 120 phút đúng, để qua đêm thu CT-Pluronic F127.

Gắn CT-Pluronic F127 với Ap và PTX

40 g (7,4 mmol của nhóm -COOH) CT-Pluronic F127 được hòa tan trong 20 ml N, N-dimethylformamide (DMF) ở nhiệt độ phòng. Thêm 1 g EDC và 2 g NHS vào hỗn hợp dung dịch. Sau phản ứng 15 phút, thêm 2,8 ml 2-mercaptoethanol, 10 mg TEA, 50 ng Ap và PTX. Khuấy liên tục qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau đó sản phẩm được ly tâm qua màng lọc Amicon Ultra-15 với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 30 phút.

Xác định hình thái và cấu trúc các hạt mixen bằng kính hiển vi điện tử

Việc xác định hình thái và cấu trúc dưới kính hiển vi điện tử SEM (440, Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK) được thực hiện như sau: Các mẫu bột phức hệ thu được sau đông khô được đặt lên tấm thiết bị chuyên dụng, sau đó phủ với 60% vàng và 40% palladium thời gian 30 giây và đặt trong thiết bị xử lý với dòng điện 45 mA (Desk II, Denton Vacuum, Moorestown, NJ). Sau đó mẫu được quan sát trên hệ thống kính hiển vi điện tử quét SEM.

Các phức hệ đã thu nhận theo quy trình trên được kiểm tra hình thái và kích thước dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) trên hệ thống thiết bị JEM 1230 Electron Microscope (Joel Ltd., Tokyo, Japan). Một giọt dung dịch sản phẩm được nhỏ lên đầu mắt lưới đồng phủ cacbon. Lau sạch phần đầu mẫu dư thừa bằng giấy thấm. Dung dịch ammonium molybdat (1%, w/v) được sử dụng như tác nhân nhuộm âm bản. Sau 2 phút, dung dịch dư cũng được loại bằng giấy thấm. Sau đó mẫu được kiểm tra dưới kính hiển vi điện tử truyền qua TEM.

Xác định thế zeta và kích thước các hạt mixen

Kích thước trung bình và thế zeta của phức hệ được xác định trên máy "size analysis" (Nano Partica SZ-100, Horiba, Japan) với góc quét 90° đến 173°. 0,2 mg mẫu được hòa tan trong 2 ml nước cất hai lần trước khi xác định trên máy.

Khảo sát sự phóng thích thuốc PTX trong in vitro

Theo dõi sự phóng thích PTX của các hạt Ap-mixen-PTX trong dung dịch PBS pH 7,5 ở nhiệt độ phòng, tiến hành đo quang phổ ở bước sóng 280 nm ở các thời điểm trong 12 ngày [5].

$$\text{PTX phóng thích (\%)} = \frac{\text{Lượng PTX phóng thích}}{\text{Lượng PTX ban đầu}} \times 100$$

Khảo sát khả năng bao và tải thuốc PTX của hạt Ap-mixen

Hòa tan 0,5 mg hạt Ap-mixen-PTX trong 5 ml nước cất hai lần và ly tâm 14.000 vòng/phút trong 30 phút ở 15°C. Lượng PTX tự do phân tách từ phức hệ hạt được đo bởi hệ thống UV-Vis bước sóng 247-494 nm. Dùng hạt mixen không bao PTX làm mẫu chứng hiệu chỉnh. Mỗi mẫu thực hiện thí nghiệm 3 lần (n = 3). Khả năng bao và tải thuốc PTX được đánh giá theo công thức [6]:

$$\text{Hiệu quả bao (EE, \%)} = \frac{\text{Tổng phức hệ bao PTX} - \text{PTX phân tách tự do}}{\text{Tổng phức hệ bao PTX}} \times 100$$

$$\text{Hiệu quả tải thuốc (LC, \%)} = \frac{\text{Tổng phức hệ bao PTX} - \text{PTX phân tách tự do}}{\text{Trọng lượng phức hệ}} \times 100$$

Khảo sát khả năng gây độc của phức hệ hạt Ap-mixen-PTX (phương pháp MTT)

Tiến hành khảo sát mật độ sống của dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3 dưới tác động gây độc của PTX bằng phương pháp MTT [7, 10]. Thí nghiệm được thực hiện với các hạt Ap-mixen không mang thuốc, hạt Ap-mixen-PTX và PTX tự do.

Dòng tế bào SK-BR-3 được nuôi trong môi trường Mc'Coy 5A có bổ sung 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% ceftriaxon-vancomycin, ở 37°C trong tủ CO₂ 5%. Điều chỉnh pH các mẫu thử nghiệm về pH 6,5. Phân phối tế bào vào đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ 12.000 tế bào/giếng. Sau 12, 24, 48 giờ môi trường nuôi cấy được thay thế với 100 µl dung dịch các mẫu hạt Ap-mixen không mang thuốc, hạt Ap-mixen-PTX và PTX tự do. Sau đó, thêm 20 µl MTT (5 mg/ml) vào mỗi giếng. Sau 4 giờ, hút bỏ dung dịch trong các giếng và thêm 200 µl DMSO vào mỗi giếng để hòa tan tinh thể MTT.

Đo mật độ hấp thu màu của phản ứng ở mỗi giếng với bước sóng 570 nm dùng hệ thống thiết bị PlateReader AF2200 (Eppendorf, Germany).

Xử lý số liệu và thống kê

Các kết quả hiển thị giá trị trung bình ± độ lệch và độ

lập thực hiện các thí nghiệm ít nhất 3 lần. Các giá trị trung bình được xử lý bằng thuật toán ANOVA một đuôi và các giá trị xác suất P<0,05 mới có ý nghĩa thống kê.

Kết quả và bàn luận

Kết quả tạo hạt nano Chi-TPP

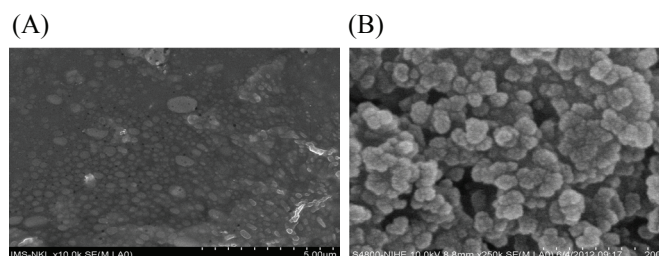
Sử dụng phương pháp tạo gel ion bằng TPP để tạo hạt nano Chi kích thước nhỏ, nhằm tăng khả năng hấp thụ thuốc. Điều kiện thí nghiệm được thực hiện ở nồng độ Chi phân tử lượng thấp 1% (v/v) trong acid acetic và TPP 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025%; 0,03% (bảng 1).

Bảng 1. Nồng độ TPP ảnh hưởng đến kích thước và thế zeta của hạt Chi 1%.

Nồng độ TPP (%w/v)	Kích thước trung bình (nm)	Thế zeta (mV)
0,01	26,24±4,37	49,18±1,14
0,015	29,43±1,23	43,22±0,58
0,02	37,11±5,42	40,31±1,52
0,025	53,26±3,21	38,31±0,92
0,03	82,51±7,46	35,82±0,34

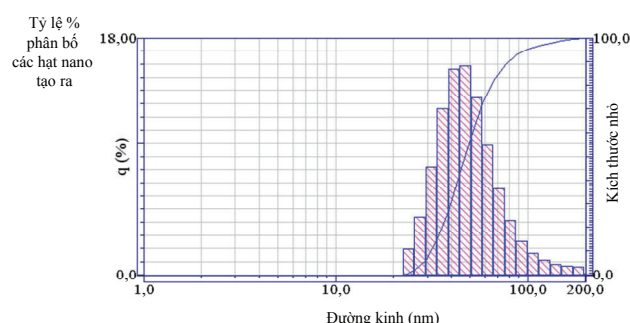
Do bản chất phân cực, TPP phân cực trong nước và giải phóng ion OH⁻, do đó trong dung dịch TPP đồng thời tồn tại cả ion OH⁻ và ion P₃O₁₀⁵⁻ có thể cạnh tranh phản ứng với nhóm NH₃⁺ của Chi. Những mảnh Chi phân tử lượng thấp sẽ tham gia vào phản ứng tạo gel ion với phân tử TPP, kết hợp với quá trình khuấy trộn để hình thành các hạt nano Chi kích thước nhỏ. Hạt nano Chi không bị tách lớp sau khi tạo ra qua 4 ngày bảo quản ở 4°C chứng tỏ hạt nano có kích thước nhỏ, nếu hạt nano có kích thước lớn sẽ gây ra sự lắng cặn và tách pha trong quá trình bảo quản.

Ảnh SEM của Chi cho thấy hình dạng nguyên liệu Chi ban đầu từng mảng polyme kích thước hạt lớn. Hạt nano Chi tạo ra bằng phương pháp tạo gel ion dùng TPP có kích thước hạt nhỏ, tương đối đồng đều (hình 1).



Hình 1. Ảnh SEM của Chi. (A) Chi ban đầu chưa tạo nối; (B) Hạt mixen Chi sau khi chế tạo, tỷ lệ Chi:TPP là 2:1.

Kết quả đo cho thấy, kích thước trung bình của hạt nano tạo ra là 53,2 nm. Trong đó có 81% hạt kích thước 55,6 nm, 9% hạt có kích thước 38 nm, còn lại là các hạt có kích thước lớn hơn 100 nm (hình 2).



Hình 2. Kết quả phân bố kích thước của hạt mixen Chi.

Kết quả tạo hạt mixen Chi-TPP-PF

Dùng Chi 1%-TPP 0,025% thực hiện tiếp các thí nghiệm với PF 10%, 15% và 20%. Khi kết hợp với PF nồng độ cao nhưng kích thước phức hệ hạt mixen giảm có thể là do sự hình thành cấu trúc gel đặc ở bên trong dẫn đến sự hấp thụ nước thấp nên đường kính trung bình của các hạt trong dung dịch giảm (bảng 2). Ngoài ra, không có sự thay đổi rõ rệt của thể zeta khi gia tăng nồng độ của PF ($P < 0,028$). Có thể kết luận rằng, PF được kết hợp chủ yếu vào bên trong các hạt mixen.

Bảng 2. Nồng độ PF ảnh hưởng đến kích thước và thể zeta của hạt mixen Chi 1%-TPP 0,025%.

Nồng độ PF (%w/v)	Kích thước trung bình (nm)	Thể zeta (mV)
10	61,24±3,17	32,14±0,36
15	69,11±6,42	28,47±1,42
20	64,53±1,42	28,14±0,91

Kết quả chọn lọc DNA aptamer theo quy trình SELEX (Ap)

Qua quy trình chọn lọc SELEX thu được các oligonucleotide mạch đơn ái lực liên kết cao với các tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2. Dùng PCR nhân lượng mạch đơn oligonucleotide đích mong muốn. Kiểm tra các trình tự mạch đơn oligonucleotide bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger được thể hiện ở bảng 3. Với sự tuân thủ nghiêm ngặt về thao tác kỹ thuật trong suốt các vòng chọn lọc SELEX, nghiên cứu này đã thu được một lượng aptamer có ái lực cao với dòng tế bào biểu hiện mạnh HER-2. Trên thực tế, trong các chu kỳ chọn lọc, nghiên cứu này tìm thấy được sự phong phú đa dạng đáng kể của các chuỗi đơn DNA, trong đó có loại có ái lực cao với dòng tế bào SK-BR3 biểu hiện

mạnh HER-2 và có loại có ái lực rất thấp. Sau 18 vòng chọn lọc, xuất hiện các aptamer có ái lực cao gần đạt tối ưu, cho thấy sự chọn lọc làm tăng dần ái lực của aptamer với các tế bào đích. Không có sự thay đổi đáng kể khi quan sát trong hai vòng chọn lọc tiếp theo. Do đó, quy trình chọn lọc được dừng ở giai đoạn này. Chúng tôi đã kiểm chứng sự biểu hiện HER-2 của dòng tế bào SK-BR3 ở mức độ mRNA. Phân tích các kết quả phiên mã ngược RT-PCR xác định sự biểu hiện mạnh HER-2 có ở dòng tế bào SK-BR3.

Bảng 3. Các oligonucleotide sử dụng chọn lọc DNA aptamer theo quy trình SELEX.

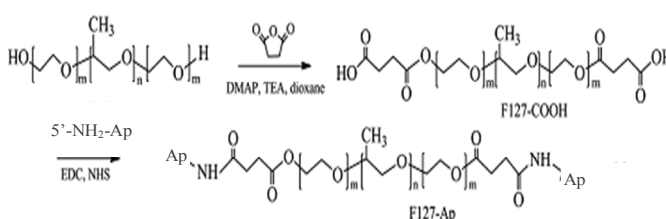
Tên các oligonucleotide	Trình tự nucleotide
Thư viện ban đầu	5'-NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN-3'
Ap sau chọn lọc	5'-AAC TTG GTG GTG GTT CGG TGG CTG TTC AGG GTC TCC TCC CGG TGA-3'

*N là 1 trong 4 loại nucleotide A, T, C, G.

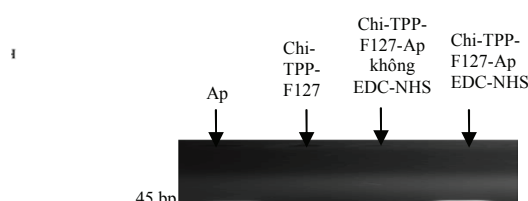
Tạo liên kết polymer Pluronic F127 và aptamer

Sử dụng phức hệ hạt mixen Chi 1%-TPP 0,025%-PF 15% để tiến hành thí nghiệm tạo liên kết polymer với aptamer. Liên kết Pluronic F127 và aptamer được tạo ra bởi nhóm 5'-NH₂-Ap và nhóm Pluronic F127-COOH bị carboxyl hoá (hình 3). Từ hình ảnh điện di Novex® gel (hình 4), có thể thấy rằng các Ap tự do hiện diện vạch rõ nét đặc trưng của Ap.

Ngược lại, Chi-TPP-F127 tự do không hiện diện trên gel. Khi tạo liên kết polymer không sử dụng EDC và NHS thì liên kết cũng không hình thành, không có sản phẩm hiện diện trên gel. Mặt khác, khi tạo liên kết polymer có sử dụng EDC và NHS thì liên kết được tạo thành, khi điện di trên gel xuất hiện vạch rõ nét đặc trưng của Ap.



Hình 3. Phương trình phản ứng tạo liên kết polymer Pluronic F127-Ap.



Hình 4. Kiểm tra liên kết polymer Pluronic F127 với Ap bằng điện di Novex® 12% Tris-Glycine mini gel.

Gắn CT-Pluronic F127 với PTX

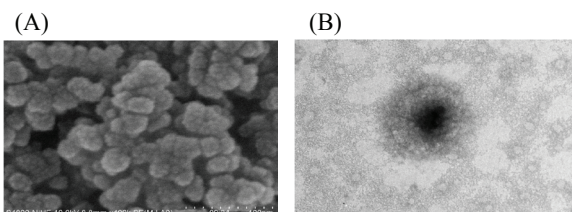
Thực hiện thí nghiệm dùng CT-Pluronic F127-Ap (Chi 1%-TPP 0,025%-PF 15%-Ap) với các nồng độ PTX khác nhau (hạt Ap-mixen-PTX). Bảng 4 cho thấy, nồng độ PTX không ảnh hưởng đến thể zeta của các hạt mixen PTX ($P < 0,02$). Ảnh hưởng của nồng độ PTX đến kích thước hạt Ap-mixen rõ hơn khi nồng độ tăng lên 0,2-0,4 mg/ml ($P < 0,015$). Kích thước hạt Ap-mixen-PTX tăng đều nhau ở nồng độ PTX 0,6-1 mg/ml. Hiệu quả bao và mang tải thuốc ở nồng độ PTX 0,4 mg/ml là cao nhất (EE: $83,28 \pm 0,13\%$; LC: $9,12 \pm 0,34\%$) với kích thước trung bình $86,22 \pm 1,45$ nm.

Bảng 4. Đặc điểm của phức hệ hạt Ap-mixen ở các nồng độ PTX.

Nồng độ PTX (mg/ml)	Kích thước trung bình (nm)	Thế zeta (mV)	EE (%)	LC (%)
0,2	$65,11 \pm 3,81$	$23,22 \pm 1,56$	$67,31 \pm 0,51$	$3,94 \pm 1,19$
0,4	$86,22 \pm 1,45$	$60,12 \pm 0,55$	$83,28 \pm 0,13$	$9,12 \pm 0,34$
0,6	$89,55 \pm 2,05$	$48,35 \pm 0,24$	$68,01 \pm 3,77$	$8,15 \pm 3,63$
0,8	$99,32 \pm 7,14$	$40,21 \pm 1,43$	$80,62 \pm 1,28$	$6,41 \pm 1,23$
1	$110,46 \pm 4,32$	$38,33 \pm 1,12$	$59,36 \pm 1,53$	$5,85 \pm 1,57$

Hình thái và cấu trúc hạt Ap-mixen-PTX

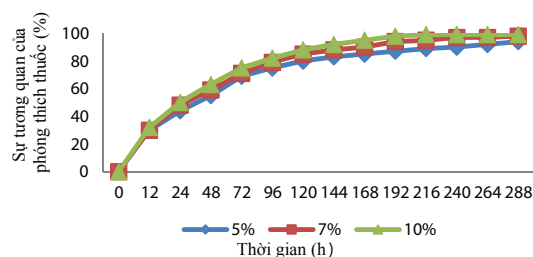
Ảnh SEM và TEM hạt Ap-mixen-PTX với nồng độ PTX 0,4 mg/ml đều cho thấy hạt có dạng hình cầu, khá đồng nhất với kích thước trung bình xấp xỉ 86,2 nm, phù hợp với kết quả ở phần trên (hình 5). Đặc biệt từ ảnh TEM cho thấy PTX được đóng gói chặt bên trong hình cầu (hình 5B). Đó là nhờ khả năng tương tác kỵ nước của PTX xếp vào bên trong lõi khi quá trình tự lắp ráp của mixen xảy ra, vì thế cấu trúc của các mixen được ổn định.



Hình 5. Ảnh SEM (A) và TEM (B) của hạt Ap-mixen-PTX.

Sự phóng thích thuốc của phức hệ hạt Ap-mixen-PTX trong in vitro

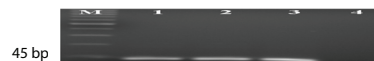
Dung dịch hạt Ap-mixen-PTX được sử dụng làm thí nghiệm có nồng độ 5, 7 và 10%. Sau 12 giờ làm thí nghiệm, các hạt Ap-mixen-PTX phóng thích PTX đạt từ 29 đến 35%, đến ngày thứ 12 (288 giờ) đạt 85-93% ở pH 7,5. 12 giờ đầu tiên ghi nhận sự phóng thích nhanh lượng lớn PTX do sự rạn vỡ cấu trúc. Sau đó sự phóng thích PTX tăng lũy tiến theo thời gian tiếp xúc với PBS, pH 7,5. Sự phóng thích bình nguyên xảy ra ở ngày thứ 6, sự phóng thích PTX tương đối ổn định, gần đạt mức cực đại (hình 6).



Hình 6. Sự phóng thích PTX trong PBS, pH 7,5.

Sự phóng thích Ap của phức hệ hạt Ap-mixen-PTX trong in vitro

Đây là thí nghiệm đánh giá khả năng gắn của Ap trên phức hệ hạt Chi-TPP-PF. Ap gắn vào phức hệ hạt mixen được ủ trong dung dịch heparin, là dung dịch cạnh tranh anion. Nhìn chung, các kết quả cho thấy Ap gắn chặt chẽ và hiệu quả trên phức hệ hạt. Tuy nhiên, nó không phải là liên kết bền mà có thể bị phá vỡ khi mạng lưới cấu trúc polymer của phức hệ hạt bị tác động.

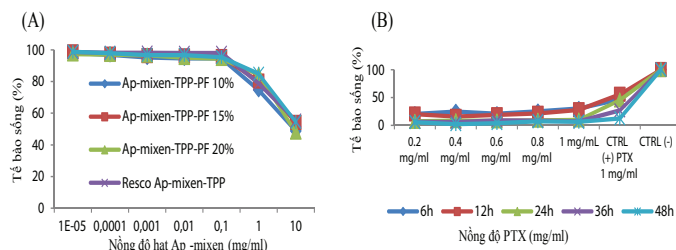


Hình 7. Điện di gel agarose sản phẩm khi ủ phức hệ Ap-mixen trong dung dịch heparin cạnh tranh ion. Giếng M: Thang đo DNA 100 bp; giếng 1: Ủ trong 1h; giếng 2: Ủ trong 4h; giếng 3: Ap tự do; giếng 4: Nước cất.

Kết quả phân tích điện di ở hình 7, Ap dễ dàng bị phá vỡ liên kết với phức hệ hạt khi có sự hiện diện của heparin. Ap tự do được sử dụng làm chứng dương trong thí nghiệm. Có sự cạnh tranh với Ap trong sự gắn kết PF, làm cho cấu trúc không ổn định. Kết quả này đã chứng minh rằng, Ap gắn với các phức hệ không chỉ đơn giản là qua quá trình trung gian tương tác ion, mà đúng hơn là Ap nổi kẹt trong mạng lưới polyme được hình thành bởi liên kết ngang. Như vậy, từ kết quả chụp TEM (hình 5B) và thí nghiệm cạnh tranh anion trong dung dịch heparin cho thấy rằng, trong phức hệ hạt cấu trúc TPP-PF làm Ap vướng mắc vào trong phức hệ.

Khả năng gây độc tế bào của phức hệ Ap-mixen-PTX

Khảo sát khả năng gây độc tế bào của các hạt Ap-mixen không bao và bao PTX 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml, dung dịch PTX 1 mg/ml tự do bằng phương pháp MTT trên tế bào ung thư vú SK-BR-3 (hình 8).



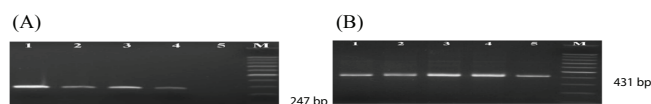
Hình 8. Sự ảnh hưởng của hạt Ap-mixen không mang thuốc (A) và bao thuốc PTX (B) lên sự sống của tế bào SK-BR-3 (n = 4).

Với các loại hạt Ap-mixen khác nhau không mang thuốc, chúng không có sự khác biệt nhiều trong quá trình gây độc chết tế bào sau 6, 12, 24, 36 và 48 giờ. Tế bào vẫn sống bám đáy và tăng sinh tốt. Có thể kết luận, các hạt Ap-mixen liên kết gắn TP-PF không có khả năng gây độc chết tế bào. Các hạt Ap-mixen không mang PTX đã được chứng minh là có tác dụng gây độc tối thiểu và chúng không phá vỡ tế bào (IC₅₀: 7,3-9,5 mg/ml). Các liều IC₅₀ của PTX tự do chống lại tế bào SK-BR-3 là 0,73 µg/ml, cao hơn phức hệ Ap-mixen bao PTX (0,05-0,11 µg/ml) 7 lần. Mặt khác, hạt Ap-mixen không mang thuốc xử lý đông khô lưu trữ (Resco Ap-mixen-TPP, Resco Ap-mixen-TPP-PF), khi hoàn nguyên trong nước cất vô trùng, chúng vẫn không gây độc với tế bào (hình 8A).

Với hạt Ap-mixen bao PTX 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1 mg/ml, tỷ lệ tế bào SK-BR-3 chết tương ứng là 75-88%; 89-93%; 78-88%; 74-86% và 69-84% sau 6-48 giờ. Vách bị phá hủy dẫn đến tế bào bị vỡ hàng loạt sau 6 giờ (hình 8B).

PTX là thuốc kháng ung thư kỵ nước, vì vậy chúng cần được vận chuyển qua màng tế bào để vào tế bào. Các tế bào có thể hấp thụ các phức hệ mixen qua đường xâm nhập xuyên màng. Do đó, các phức hệ Ap-mixen hoạt động như hệ thống phân phối thuốc tạo điều kiện đưa thuốc vào và tích lũy chúng bên trong tế bào. Với dung dịch thuốc PTX 1 mg/ml tự do, tỷ lệ tế bào chết chiếm 13-14%. Các phân tử thuốc PTX tự do xâm nhập vào tế bào không hiệu quả.

Tiến hành thí nghiệm về tác động của hạt Ap-mixen bao PTX 0,4 mg/ml đến mức độ biểu hiện gen HER-2 (247 bp) và Beta-actin (431 bp) từ mRNA trên dòng tế bào SK-BR-3 sau 6-48 giờ. Sau 6 giờ, mức độ biểu hiện gen HER-2 mạnh và giảm dần theo thời gian tiếp xúc 48 giờ ($P < 0,01$) (hình 9A). Ở thời gian tiếp xúc 6-48 giờ đều có sự biểu hiện gen Beta-actin mạnh ($P < 0,05$) (hình 9B). Với kết quả này, có thể khẳng định khả năng hiệu quả đặc hiệu của phức hệ hạt đối với các mức độ biểu hiện thụ thể HER-2 trên dòng tế bào SK-BR-3, không có sự biểu hiện protein nào khác trên bề mặt các tế bào.



Hình 9. Sự biểu hiện gene HER2 và Beta-actin ở dòng tế bào SK-BR-3 khi tiếp xúc hạt Ap-mixen bao PTX 0,4 mg/ml sau 6-48h. RNA tổng số từ các tế bào SK-BR-3 được chuyển mã thành cDNA. Gen HER2 và Beta-actin được nhân lượng bằng PCR. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%. Giếng M là thang đo DNA 100 bp. Phân đoạn gen HER2- 247 bp (A) được nhân lượng từ giếng 1: 6h, giếng 2: 12h, giếng 3: 24h, giếng 4: 36h và giếng 5: 48h. Phân đoạn gen Beta-actin 431 bp (B) được nhân lượng từ giếng 1: 6h, giếng 2: 12h, giếng 3: 24h, giếng 4: 36h và giếng 5: 48h.

Kết quả của các thí nghiệm về khả năng gây độc của phức hệ hạt chế tạo được ở trên cho thấy, phức hệ hạt có khả năng tương thích sinh học cao và được dùng như hệ dẫn truyền thuốc chống ung thư.

Kết luận

Bước đầu chúng tôi đã nghiên cứu thành công quy trình chế tạo các hạt mixen bằng phương pháp tạo gel ion sử dụng Chi, TPP và PF. Kết quả đã tạo được hạt Ap-mixen-PTX có dạng hình cầu, khá đồng nhất, kích thước trung bình 86,22 nm và thế zeta 60,12 mV. Khả năng đóng gói 83% và khả năng mang tải thuốc 9%. Chọn lọc được Ap đích theo quy trình SELEX, có số lượng phong phú và ái lực liên kết đặc hiệu với các tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2. Ap đích có chiều dài 45 nucleotide và tỷ lệ C-G chiếm ~ 82%. Nghiên cứu thành công quy trình gắn chúng vào hệ hạt mixen đã tạo ra. Bước đầu đánh giá khả năng dẫn truyền thuốc của hạt Ap-mixen-PTX lên dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3 cho thấy, chúng có khả năng gây độc tế bào khoảng 89-93% và đạt hiệu quả hơn gấp 7 lần so với dung dịch thuốc PTX tự do.

Những kết quả trong nghiên cứu đã chứng minh các hạt Ap-mixen-PTX khối đồng polymer có tính tương thích sinh học và có tiềm năng sử dụng làm hệ dẫn truyền thuốc chống ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F.A. Moghaddam, F. Atyabi, R. Dinarvand (2009), "Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesion and permeation enhancement of thiolated chitosan-pHEMA core-shell nanoparticles", *Nanomedicine*, **5**(2), pp.208-215.
- [2] W. Yanrong, S. Kwame, L. Haipeng, W. Rouwen, T. Weihong (2010), "DNA aptamer-micelle as an efficient detection/delivery vehicle toward cancer cells", *PNAS*, **107**, pp.5-10.
- [3] A.K. Singla, A. Garg, D. Aggarwal (2002), "PTX and its formulations", *Int. J. Pharm.*, **235**(1-2), pp.179-192.
- [4] A.L. Samah, M.A.E.D. Hanaa, H.E. Mostafa, G.A. Nanis, M.T.M. Hasanin, M.A. Ahmed (2016), "Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model", *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, **7**(3), 035008.
- [5] S.C. Kim, D.W. Kim, Y.H. Shim, J.S. Bang, H.S. Oh, S. Wan Kim, M.H. Seo (2001), "In vivo evaluation of polymeric micellar PTX formulation: toxicity and efficacy", *J. Control Release*, **72**(1-3), pp.191-202.
- [6] S.K. Bong, E.L. Sang, L.N. Choon, K.K. Jin, S.P. Jeong (2015), "Exploring the preparation of albendazole loaded chitosan tripolyphosphate nanoparticles", *Materials*, **8**, pp.486-498.
- [7] H. Hosniyeh, A. Fatemeh, D. Rassoul, N.O. Seyed (2012), "Chitosan pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and in vitro study", *International Journal of Nanomedicine*, **7**, pp.1851-1863.
- [8] G. Zahra, D. Rassoul, M. Fatemeh, E.M. Mehdi, S. Elmira, A. Fatemeh (2014), "Aptamer decorated hyaluronan/chitosan nanoparticles for targeted delivery of 5-fluorouracil to MUC1 overexpressing adeno carcinomas", *Carbohydrate Polymers*, **121**, pp.190-198.
- [9] Pooja Dua, Soyoun Kim, Dong Ki Lee (2008), "Patents on SELEX and therapeutic aptamers", *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, **2**, pp.172-186.
- [10] Kim Thach Nguyen, Duc Vinh Le, Dinh Ho Do, Quang Huan Le (2016), "Development of chitosan graft pluronic®F127 copolymer nanoparticles containing DNA aptamer for PTX delivery to treat breast cancer cells", *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. and Nanotechnol.*, **7**(2), 025018.

Nghiên cứu tổng hợp thuốc generic letrozole quy mô 100 g/mẻ đạt tiêu chuẩn dược điển USP38

Nguyễn Cửu Khoa^{1,2}, Nguyễn Đại Hải^{1,2*}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 28/2/2018; ngày chuyển phản biện 2/3/2018; ngày nhận phản biện 3/4/2018; ngày chấp nhận đăng 9/4/2018

Tóm tắt:

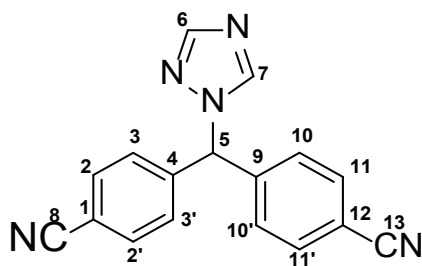
Trong nghiên cứu này, letrozole (quy mô 100 g/mẻ) được tổng hợp thành công từ phản ứng giữa 4-[1-(1,2,4-triazolyl)methyl]benzonitrile (TMB) và p-fluorobenzonitrile với sự có mặt của tác nhân deproton hóa potassium tert-butoxide (t-BuOK) trong dung môi tetrahydrofuran (THF). Letrozole thô sau phản ứng được kết tinh lại hai lần trong hỗn hợp n-hexane:ethyl acetate với tỷ lệ 3:1. Sản phẩm được xác định cấu trúc và tính chất bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR và ¹³C-NMR), khối phổ (MS). Các chỉ tiêu về định tính [phổ hồng ngoại (FTIR), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)], định lượng (HPLC), cân sau nung, tạp chất liên quan A và hàm lượng nước theo quy định của dược điển USP38. Kết quả cho thấy, letrozole có độ tinh khiết đạt 99,79%, các chỉ tiêu khác đều đạt tiêu chuẩn của dược điển USP38. Kết quả đánh giá độ ổn định cho thấy: Sản phẩm có hạn sử dụng trên 24 tháng.

Từ khóa: Letrozole, thuốc generic, TMB, ung thư vú.

Chỉ số phân loại: 3.4

Giới thiệu

Nghiên cứu tổng hợp và sản xuất các loại thuốc generic (thuốc đã đăng ký nhưng hết hạn bảo hộ bản quyền và đã được sử dụng) được hầu hết các quốc gia quan tâm, trong đó có Việt Nam. Tuy nhiên, các loại thuốc generic do Việt Nam sản xuất chủ yếu chỉ thực hiện phần bào chế với các hoạt chất nhập khẩu từ nước ngoài [1]. Để có thể chủ động nguồn nguyên liệu thuốc generic, việc nghiên cứu tổng hợp, tiến tới sản xuất các dược chất tại Việt Nam là hết sức cần thiết.

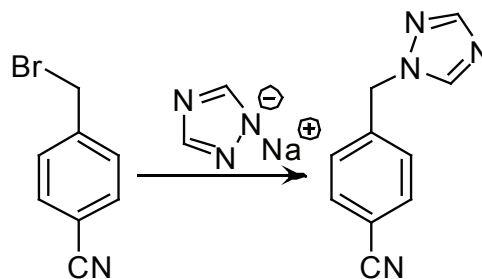


Hình 1. Cấu trúc hóa học letrozole.

Letrozole là một dược chất ức chế enzyme aromatase non-steroid có chọn lọc (hình 1). Enzyme này đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hormone androgen thành hormone estrogen ở phụ nữ sau mãn kinh. Thuốc ức chế enzyme aromatase bằng cách gắn kết cạnh tranh với thành phần heme của thành phần sắc tố tế bào P450 ở enzyme này, làm giảm quá trình sinh tổng hợp estrogen ở tất cả các mô.

Thuốc làm giảm nồng độ estrogen ở phụ nữ sau mãn kinh và giúp làm chậm lại hoặc đảo ngược sự phát triển của một số khối u vú cần estrogen để phát triển. Thuốc được chỉ định cho điều trị ung thư vú sau phẫu thuật. Letrozole giúp cải thiện tình trạng bệnh nhân ung thư vú đã điều trị bằng việc uống tamoxifen 5 năm sau phẫu thuật, cải thiện khả năng sống nhờ ngăn chặn sự tái phát và di căn của ung thư [2, 3]. Trên thế giới, đã có rất nhiều nghiên cứu đề cập đến quá trình tổng hợp letrozole. Tuy nhiên, các nghiên cứu này hầu hết đều tập trung vào khả năng chọn lọc vị trí của phản ứng alkyl hóa vòng 1,2,4-triazole [4-6].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tổng hợp letrozole qua hai giai đoạn: (1) Tổng hợp TMB và (2) Tổng hợp letrozole. Ở giai đoạn 1, tiền chất TMB được tổng hợp thành công từ 4-bromomethylbenzonitrile và 1,2,4-triazole sodium, sử dụng dung môi acetone ở nhiệt độ sôi (hình 2).



Hình 2. Phản ứng tổng hợp TMB.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyendaihai0511@gmail.com

Research on the synthesis of generic drug - letrozole on a scale of 100 g per batch conforming to the United State Pharmacopeia (USP38)

Cuu Khoa Nguyen^{1,2}, Dai Hai Nguyen^{1,2*}

¹Graduate University of Science and Technology, VAST

²Institute of Applied Materials Science, VAST

Received 28 February 2018; accepted 9 April 2018

Abstract:

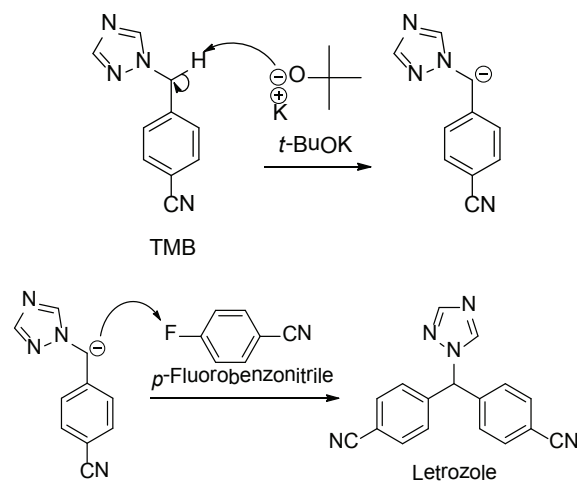
In this research, letrozole, on a scale of 100 g/batch, was successfully synthesized via the reaction between 4-[1-(1,2,4-triazolyl)methyl] benzonitrile (TMB) and *p*-fluorobenzonitrile, with the aid of deprotonated agent called potassium tert-butoxide (*t*-BuOK) dissolved in tetrahydrofuran (THF). The crude letrozole was recrystallized twice using the mixture of *n*-hexane:ethyl acetate (the ratio 3:1). The chemical structure and properties of the obtained product were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR and ¹³C-NMR) and mass spectroscopy (MS). Standards of detection (Fourier transform infrared (FTIR), high performance liquid chromatography (HPLC)) and quantification (HPLC), impurities, and the standard amount of water conformed in the United State Pharmacopeia (USP 38) were also examined. According to the results, the purity of letrozole was 99.79%; besides, other criterions also met the quality standard of USP 38. Both stability test and accelerated aging test showed that the synthesized letrozole had the shelf life of more than 2 years.

Keywords: Breast cancer, generic drug, letrozole, TMB.

Classification number: 3.4

Ở giai đoạn 2, letrozole được tổng hợp từ hai tiền chất chính là chất trung gian TMB và *p*-fluoro-benzonitrile, với tác nhân deproton hóa *t*-BuOK. Về mặt cơ chế, đầu tiên, dẫn xuất triazole bị deproton hóa ở carbon methylene bởi tác nhân *t*-BuOK. Carbanion hình thành sẽ đóng vai trò như một tác nhân thân hạch tác kích vào chất nền *p*-fluorobenzonitrile theo cơ chế cộng - khử và loại bỏ F theo cơ chế thế thân hạch trên nhân thơm (S_NAr) (hình 3). Chất trung gian và sản phẩm được tinh chế để đạt được độ tinh khiết theo yêu cầu. Letrozole sau tinh chế được phân tích cấu trúc bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR và ¹³C-NMR), khối

phổ (MS). Các chỉ tiêu về định tính [phổ hồng ngoại (FTIR), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)], định lượng (HPLC), cân sau nung, tạp chất liên quan A và hàm lượng nước theo quy định của dược điển USP38. Độ ổn định của sản phẩm được xác định ở điều kiện lão hóa cấp tốc (nhiệt độ 40±2°C, độ ẩm tương đối 75±5%) và điều kiện thường (nhiệt độ 30±2°C, độ ẩm tương đối 75±5%). Ngoài ra, độc tính cấp và độc tính bán trường diễn cũng được thực hiện nhằm đánh giá độc tính của sản phẩm.



Hình 3. Phản ứng tổng hợp letrozole.

Thực nghiệm

Hóa chất

4-fluorobenzonitrile 99%, *t*-BuOK 98% (Acros); ammonium acetate, ethyl acetate, sodium hydrogen carbonate, acetic acid glacial extra pure; acetonitrile HPLC grade (Fisher); magnesium sulfate anhydrous, *n*-hexane 99,5%, tetrahydrofuran, water HPLC grade ACS reagent grade (Fisher); 4-[1-(1,2,4-triazolyl)-methyl]benzonitrile (Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng, TCCS).

Tổng hợp letrozole thô

Quy trình tổng hợp letrozole thô được thực hiện qua 6 bước: (1) Cho *t*-BuOK (174,1 g; 2,8 eq.)/THF khan (1:1) vào bình phản ứng dung tích 20 l đã được làm lạnh -10°C, khuấy và thổi khí nitơ liên tục. (2) Sau khi *t*-BuOK tan hoàn toàn, nhỏ dung dịch TMB (100 g; 1,0 eq.)/THF (1:1) vào bình phản ứng trong 1 giờ. Tiếp tục khuấy hỗn hợp thêm 2 giờ, giữ ở nhiệt độ -10°C. (3) Thêm từng giọt *p*-fluorobenzonitrile (99,5 g; 1,5 eq.)/THF khan vào bình phản ứng trong 30 phút. Khuấy và giữ nhiệt độ bình phản ứng thêm 2 giờ. Phản ứng được theo dõi bằng TLC với hệ dung môi giải ly ethyl acetate:*n*-hexane. (4) Sau khi phản ứng kết thúc, pha loãng hỗn hợp với ethyl acetate khan và lọc nhanh qua cột (flask chromatography). (5) Cô quay chân không, acid hóa hỗn hợp bằng dung dịch acid acetic/nước

đến pH=2. Sau đó, trung hòa lại dung dịch bằng NaHCO_3 đến pH 7. (6) Chiết dung dịch bằng ethyl acetate, làm khan bằng MgSO_4 để thu sản phẩm letrozole thô.

Tiến hành lặp lại 5 lần thí nghiệm như trên để đánh giá độ ổn định của quy trình. Độ tinh khiết của sản phẩm được xác định bằng phương pháp HPLC theo quy định của dược điển USP38.

Tinh chế letrozole

Letrozole thô được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại 2 lần trong hỗn hợp n-hexane:ethyl acetate (tỷ lệ 3:1). Quy trình tinh chế được thực hiện như sau: Cân 120 g sản phẩm letrozole thô cho vào bình phản ứng dung tích 20 l. Thêm dần 8 l hỗn hợp dung môi n-hexane:ethyl acetate tỷ lệ 3:1, khuấy và gia nhiệt hỗn hợp trong bình đến điểm sôi. Lọc hỗn hợp dung dịch rồi cho vào thiết bị làm lạnh ở 0-5°C qua đêm. Lọc lấy sản phẩm kết tinh bằng phễu Buchner. Làm khô bằng bơm chân không trong 1 giờ. Quá trình kết tinh lại được tiến hành 2 lần liên tục để thu được letrozole tinh chế.

Tiến hành lặp lại 5 lần thí nghiệm để đánh giá độ ổn định của quy trình. Độ tinh khiết của sản phẩm được xác định bằng phương pháp HPLC theo quy định của dược điển USP38, cụ thể:

Điều kiện sắc ký: Hệ thống UHPLC Plexar (PerkinElmer, Mỹ), cột C_{18} (4,6 x 150 mm) ở nhiệt độ 25°C, đầu dò Plexar PDA Plus tại bước sóng 230 nm; thể tích tiêm mẫu: 20 μl ; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; nồng độ mẫu đo: 10 $\mu\text{g/ml}$; pha động: Chạy chế độ gradient (bảng 1).

Bảng 1. Chương trình chạy HPLC.

Thời gian (phút)	Nước (%)	Acetonitrile (%)
0	70	30
25	30	70

Đánh giá độ ổn định và thời gian bảo quản

Thời gian bảo quản của letrozole sau tinh chế được thực hiện ở điều kiện lão hóa cấp tốc với 3 mẫu từ 3 mẻ letrozole tinh chế, tương ứng với Let-01, Let-02 và Let-03. Mẫu được đặt trong chai thủy tinh nâu có nắp đậy và được bảo vệ trong túi nhôm. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ $40 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$ trong thời gian 6 tháng. Đánh giá tính chất và hàm lượng ở thời điểm 0, 1, 3 và 6 tháng. Từ đó đề xuất hạn sử dụng cho sản phẩm [7]. Ngoài ra, độ ổn định ở điều kiện thường của letrozole được đánh giá dựa trên hướng dẫn của ICH ở điều kiện nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$ trong vòng 24 tháng. Mẫu thử là 3 mẻ letrozole tinh chế, tương ứng với mẫu Let-01-RT, Let-02-RT và Let-03-RT. Các mẫu được theo dõi về tính chất và hàm lượng ở thời điểm 0, 3, 6, 12 và 24 tháng.

Đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn

Độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của letrozole được thực hiện tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Thử độc tính cấp: Tiến hành trên 70 con chuột nhắt trắng giống Swiss albino, chia làm 6 nhóm với 6 liều lượng khác nhau (0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 g/kg chuột). Cho chuột nhịn ăn 3-4 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Cho chuột uống hỗn dịch letrozole. Theo dõi biểu hiện ngộ độc của chuột sau khi uống hỗn dịch với tần suất khoảng 15 phút/1 lần trong vòng 1 giờ đầu và giãn dần tần suất trong vòng 24 giờ đầu.

- Thử độc tính bán trường diễn: Tiến hành trên 40 thỏ cái Newzealand, chia làm 4 nhóm (1 nhóm chứng và 3 nhóm uống thuốc với liều 0,078; 0,155; 0,31 mg/kg thỏ) trong vòng 90 ngày. Theo dõi thỏ hàng ngày về mức độ tiêu thụ thức ăn, nước uống, thể trạng và vận động, tình trạng phân, nước tiểu, các biểu hiện bất thường của thỏ. Xét nghiệm các chỉ số huyết học và sinh hóa. Sau thử nghiệm, thỏ được mổ để quan sát đại thể các tổ chức tim, gan, thận, phổi, dạ dày, ruột, tuyến thượng thận và buồng trứng.

Kết quả và thảo luận

Tổng hợp letrozole thô

Kết quả tổng hợp letrozole thô ở quy mô 100 g/mẻ cho hiệu suất phản ứng đạt $74,2 \pm 0,6\%$. Độ tinh khiết sản phẩm (5 lần lặp lại) đạt $92,47 \pm 0,9\%$. Tuy nhiên, sản phẩm cần được tinh chế để độ tinh khiết đạt tiêu chuẩn dược dụng (tối thiểu 98,5%). Độ lệch chuẩn tương đối về hiệu suất và độ tinh khiết sản phẩm lần lượt là 0,81% và 0,97%. Giá trị này nhỏ hơn 2%, nên quy trình đạt được độ ổn định.

Tinh chế letrozole

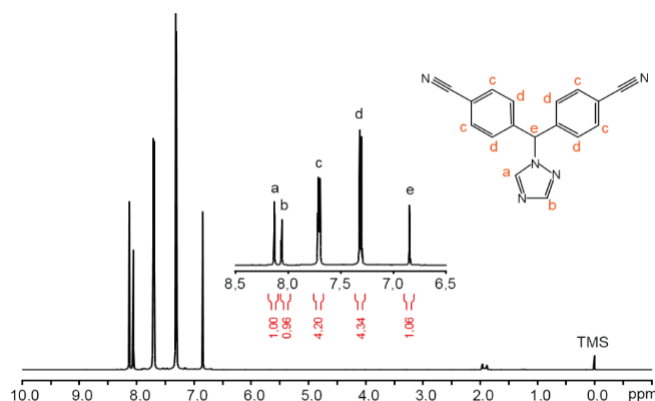
Kết quả lặp lại 5 lần quy trình tinh chế letrozole ở quy mô 100 g/mẻ cho hiệu suất tinh chế và độ tinh khiết đạt lần lượt là $82,3 \pm 1,9\%$ và $99,79 \pm 0,05\%$. Độ tinh khiết của sản phẩm sau tinh chế đạt yêu cầu về dược dụng.

Độ lệch chuẩn tương đối về hiệu suất và độ tinh khiết của quy trình tinh chế lần lượt đạt 1,7% và 0,05%. Giá trị này nhỏ hơn 2%, nên quy trình tinh chế letrozole đạt được độ ổn định [8].

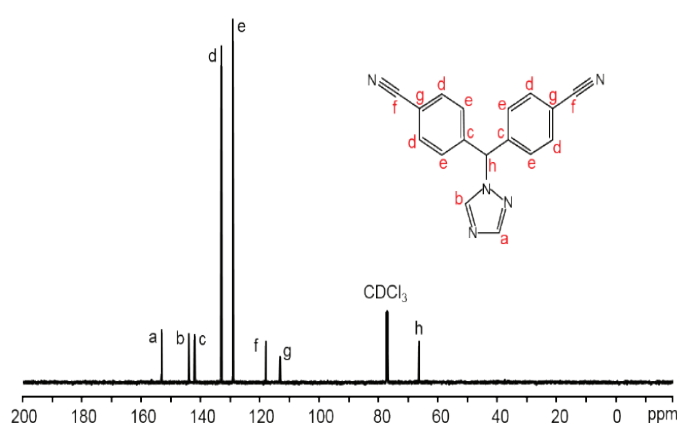
Kết quả phân tích cấu trúc sản phẩm cho thấy: Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) xuất hiện 2 tín hiệu của 2 proton gắn trên vòng triazole [δ_{H} 8,13 ppm; H_a], [δ_{H} 8,06 ppm; H_b]; 2 mũi chẻ đôi của các proton trên vòng thơm [δ_{H} 7,70 ppm; (4H; d; $J=8,5$ Hz; H_c)], [δ_{H} 7,30 ppm; (4H; d; $J=8,5$ Hz; H_d)]; 1 proton ở carbon tam cấp nằm gần nhóm triazole [δ_{H} 6,84 ppm; H_e] tương ứng với cấu trúc của letrozole chuẩn [9, 10] (hình 4).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) xuất hiện 2 tín hiệu của

2 carbon tam cấp của vòng triazole [δ_c 153,0 ppm; C_a], [δ_c 143,8 ppm; C_b]; 2 tín hiệu của carbon thơm tứ cấp [δ_c 141,9 ppm; C_c], [δ_c 113,2 ppm; C_g]; 2 tín hiệu của carbon thơm tam cấp [δ_c 132,9 ppm; C_d], [δ_c 128,9 ppm; C_e]; 1 tín hiệu của 2 carbon nhóm nitrile [δ_c 117,9 ppm; C_f]. Ở vùng trường cao, xuất hiện 1 tín hiệu carbon tam cấp [δ_c 66,3 ppm; C_h] tương ứng với cấu trúc của letrozole [9, 10] (hình 5).

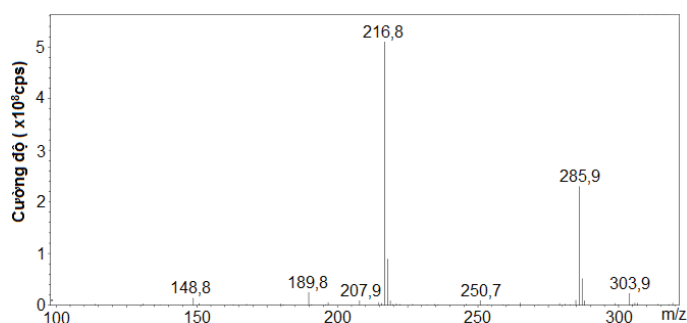


Hình 4. Phổ ^1H -NMR của sản phẩm letrozole.



Hình 5. Phổ ^{13}C -NMR của sản phẩm letrozole.

Khối phổ của sản phẩm được xác định bằng kỹ thuật ion hóa electron ESI-MS cho tín hiệu của peak ion giả phân tử $m/z = 285,9$ [$M-H$] $^+$ tương ứng với công thức phân tử của letrozole: $C_{17}H_{11}N_5$ (hình 6).



Hình 6. Phổ MS của sản phẩm letrozole.

Kết quả kiểm nghiệm cho thấy sản phẩm đạt các tiêu chuẩn của dược điển USP38 [11], trong đó:

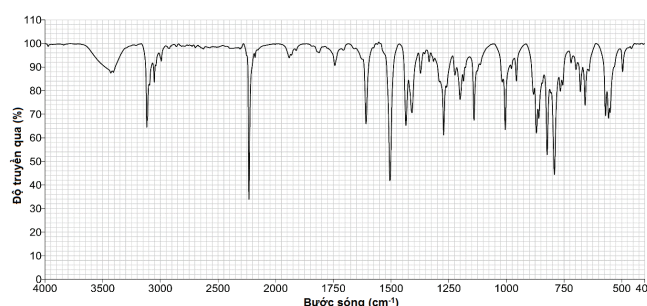
Định tính: phổ IR và HPLC cho kết quả đúng với chất chuẩn USP Letrozole RS (hình 7 và 8).

Định lượng đạt: $99,73 \pm 0,33\%$ (yêu cầu: 98-102%).

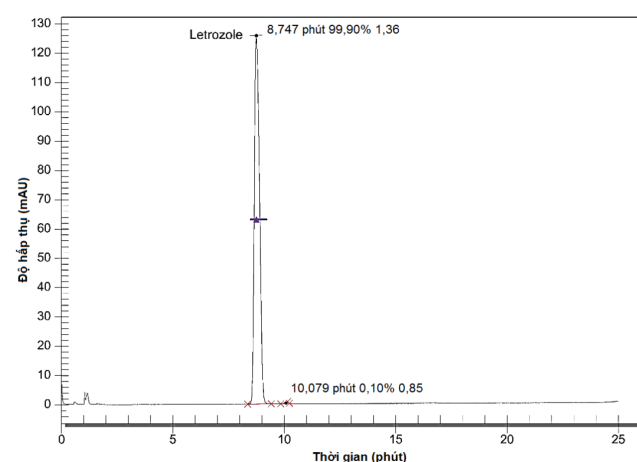
Cẩn sau nung tối đa đạt: 0,024% (yêu cầu: <0,1%).

Tạp chất liên quan A tối đa đạt: 0,04% (yêu cầu: 0,3%).

Hàm lượng nước tối đa đạt: 0,26% (yêu cầu: <0,3%).



Hình 7. Phổ IR của sản phẩm letrozole.



Hình 8. Sắc ký đồ HPLC của sản phẩm letrozole.

Đánh giá độ ổn định và thời gian bảo quản

Tại thời điểm 24 tháng, kết quả hàm lượng thấp nhất ở các mẻ là 96,29% tính theo sản phẩm khan. Theo hướng dẫn “Đánh giá dữ liệu về độ ổn định” (Evaluation of Stability Data Q1E) của FDA năm 2004, khảo sát độ ổn định của một dược chất là tìm thời điểm mà ở đó hàm lượng dược chất bị phân hủy còn lại 90% [12]. Do đó, sản phẩm letrozole đạt được độ ổn định sau 24 tháng.

Dự đoán tuổi thọ thuốc của mẫu Let-01 là 40,5 tháng, mẫu Let-02 là 56,9 tháng và mẫu Let-03 là 54 tháng. Chọn kết quả thấp nhất từ ba kết quả trên là tuổi thọ của thuốc. Dự đoán tuổi thọ thuốc theo điều kiện lão hóa cấp tốc là 40,5 tháng.

Thử độc tính cấp

Trong thử nghiệm này, chúng tôi đã tìm được liều không gây chết chuột là 0,25 g mẫu thử/kg chuột. Liều gây chết 100% số chuột thử nghiệm là 1,5 g mẫu thử/kg chuột. Dựa trên số liệu thực nghiệm, chúng tôi đã tìm được liều LD_{50} là 0,825 (0,688; 0,962) g mẫu thử/kg chuột. Sau khi uống hỗn dịch thử, chuột có các biểu hiện ngộ độc như sau: Ở mức liều thấp (0,25 g mẫu thử/kg chuột) không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc; ở mức liều trong khoảng từ 0,5 g đến 1,5 g mẫu thử/kg chuột, một số chuột có biểu hiện bị kích động, sau đó nằm mê và co giật trước khi chết. Chuột bị chết trong khoảng thời gian 48 giờ và tỷ lệ chết tùy theo mức liều uống.

Thử độc tính bán trường diễn

Sau khi cho thỏ uống hỗn dịch letrozole liên tục mỗi ngày một lần trong 90 ngày với 3 mức liều khác nhau, thuốc không ảnh hưởng đến thể trạng, hoạt động của thỏ thử nghiệm. Thỏ khỏe mạnh, tăng cân. Các chỉ số sinh hóa và huyết học (thời gian đông máu, chỉ số glucose, các chỉ số calci toàn phần và ion calci huyết tương) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở trước, giữa và sau thử nghiệm so với nhóm chứng ($P_{\text{trước TN (T-C)}} > 0,05$; $P_{\text{sau 30 ngày (T-C)}} > 0,05$; $P_{\text{sau 60 ngày (T-C)}} > 0,05$; $P_{\text{sau TN (T-C)}} > 0,05$).

Không nhận thấy sự bất thường và khác nhau về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi, buồng trứng, tuyến thượng thận và hệ tiêu hóa khi quan sát đại thể cũng như cấu trúc của gan, thận, buồng trứng, tuyến thượng thận khi quan sát vi thể của thỏ giữa nhóm chứng và 3 nhóm thử.

Kết luận

Đã xây dựng được quy trình tổng hợp và tinh chế sản phẩm letrozole ở quy mô 100 g/mẻ. Cấu trúc sản phẩm được chứng minh bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân (1H -NMR và ^{13}C -NMR), khối phổ (ESI-MS). Độ tinh khiết của sản phẩm đạt $99,79 \pm 0,05\%$. Các chỉ tiêu khác đều đạt yêu cầu quy định của dược điển Hoa Kỳ USP38. Sản phẩm letrozole còn được tiến hành đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn. Kết quả kiểm nghiệm cho thấy letrozole thuộc cấp độ độc IV trong thang GHS. Thời hạn sử dụng của letrozole là

trên 24 tháng.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài nghiên cứu được hỗ trợ bởi Chương trình Hóa dược, Bộ Công thương, mã số đề tài CNHD.ĐT.051/14-16. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Research and Markets (2017), *Generic Oncology Drug Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2017-2022*, p.82.
- [2] Joint Formulary Committee, BNF 70: September 2015-March 2016 (2015), *BMA and Pharmaceutical Society*.
- [3] S.C. Sweetman, Martindale (2009), *The Complete Drug Reference*, Pharmaceutical Press.
- [4] Raja Jyotir Jani, Hetalkumar Virendrabhai Patel, and Rajamannar Thennati (2004), *WO Patent 2004076409 A3*.
- [5] Hasson, et al. (2007), *US 2007/0112203 A1*.
- [6] Jeremie Doiron, Ryan Richard, Mamadou Mansour Touré, Nadia Picot, Rémi Richard, Miroslava Čuperlović-Culf, Gilles A Robichaud, and Mohamed Touaibia (2011), "Synthesis and structure-activity relationship of 1-and 2-substituted-1, 2, 3-triazole letrozole-based analogues as aromatase inhibitors", *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46**(9), pp.4010-4024.
- [7] S. Ahuja and K.M. Alsante (2003), *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals*, Elsevier Science, pp.102-115.
- [8] B. Davani (2017), *Pharmaceutical Analysis for Small Molecules*, Wiley. p.72.
- [9] http://bdg.co.nz/coa/coa_110096_6116.1_20091010_V1_Letrozole.pdf.
- [10] Dr. Sabine Schroder - Lgc (2015), *Certificate of Analysis*, https://hybris-static-assets-production.s3-eu-west-1.amazonaws.com/sys-master/pdfs/h3e/hcd/9434872578078/en_ST-WB-CERT-2052116-1-1-1.PDF.
- [11] The United States Pharmacopeia and National Formulary (2014), *USP 38 - NF 33 The United States Pharmacopeia and National Formulary 2015: Main Edition Plus Supplements 1 and 2*, Deutscher Apotheker Verlag.
- [12] *Ich Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in new drug substances Q3A (R2)*, in Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 2006.

Phân tích vi học và thành phần hoá học của lan một lá *Nervilia aragoana* Gaudich - họ lan Orchidaceae thu hái ở Kon Tum

Trần Thị Ngọc Mai^{1*}, Trần Công Luận²

¹Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Tây Đô

Ngày nhận bài 3/1/2018; ngày chuyển phản biện 11/1/2018; ngày nhận phản biện 21/2/2018; ngày chấp nhận đăng 27/2/2018

Tóm tắt:

Cây lan một lá thu tại tỉnh Kon Tum có tên khoa học *Nervilia aragoana* Gaudich. Mẫu cây này được khảo sát vi phẫu lá, cuống lá và thân rễ để xác định cấu tạo của lớp tế bào biểu bì, đặc điểm bó libe-gỗ. Xác định đặc điểm của bột lá, bột thân rễ; soi bột để xác định cấu trúc của các mảnh mô, hình dạng, kích thước của hạt tinh bột và tinh thể canxi oxalat. Phân tích sơ bộ thành phần hoá học của mẫu bột lá và bột thân rễ theo phương pháp Ciuley cải tiến để định tính các thành phần hoá học có trong các phân đoạn chiết khác nhau, từ đó định hướng quá trình chiết tách và phân lập các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Từ khoá: *Nervilia*, phân tích hoá thực vật, phân tích vi học.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Lan một lá là cây ưa bóng và đặc biệt ưa ẩm. Cây thường mọc trong các hốc đá hoặc trên lớp đất có nhiều thảm mục dưới tán rừng kín, hoặc rừng cây lá rộng núi đá vôi. Độ cao phân bố của cây từ 600-1500 m. Hàng năm, từ thân ngầm mọc lên một lá vào cuối mùa xuân hoặc đầu mùa hè. Đến giữa mùa thu, phần trên mặt đất tàn lụi. Hoa thường xuất hiện trước khi cây ra lá. Trên mỗi cây thường có 1-5 quả. Mỗi quả có nhiều hạt nhỏ, tự mở thành 3 mảnh khi quả già để hạt rơi vãi ra xung quanh. Cây mọc từ hạt vào tháng 6 và tập trung thành những đám nhỏ. Mùa ra hoa vào tháng 9 đến tháng 12 [1].

Lan một lá là cây thuốc quý hiếm được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam và Trung Quốc từ năm 1996 [2]. Theo Đỗ Huy Bích, lá hoặc toàn cây lan một lá được dùng làm thuốc giải độc, nhất là ngộ độc nấm, làm mát phổi, chữa ho lao, ho lâu năm, viêm phế quản. Nhai rễ củ tươi làm giảm khát, bồi dưỡng cơ thể. Ở Trung Quốc, cây này còn được dùng chữa viêm miệng, viêm họng cấp tính, rối loạn kinh nguyệt hoặc tổn thương do ngã, đau nhức, viêm mủ da, lở loét, mụn nhọt, tràng nhạc [1].

Ở phía Bắc nước ta, lan một lá phân bố chủ yếu ở các tỉnh miền núi. Ở phía Nam gặp ở Kon Tum, Lâm Đồng, Bình Dương, An Giang. Trong vài năm gần đây do lợi nhuận kinh tế cao, lan một lá bị khai thác quá mức để bán

qua biên giới, khiến tăng nguy cơ tuyệt chủng. Do đó, việc nghiên cứu định danh và phân tích sơ bộ thành phần hoá học của cây này là bước đầu định hướng cho các nghiên cứu xác định thành phần hoá học và tác dụng dược lý nhằm khẳng định giá trị thực của cây thuốc quý hiếm này để có biện pháp bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu của quốc gia.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu cây lan một lá được thu vào khoảng từ tháng 6 đến tháng 10 hàng năm, địa điểm thu mẫu tại Kon Tum. Dược liệu được làm sạch, phơi khô, xay mịn thành bột (bột lá và bột thân rễ).

Phương pháp nghiên cứu

Phân tích đặc điểm hình thái và định tên khoa học: Quan sát và mô tả đặc điểm hình thái thực vật về dạng sống, thân, lá, hoa, quả và hạt. Dụng cụ sử dụng gồm kính lúp soi nổi, máy ảnh kỹ thuật số, thước kẻ. Định tên khoa học của loài nghiên cứu dựa trên tài liệu tham khảo [3, 4], tại Bộ môn Tài nguyên - Dược liệu thuộc Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh.

Phân tích đặc điểm vi phẫu: Tiêu bản vi phẫu thân được cắt ngang ở đoạn lá và thân rễ. Sau đó, các mảnh cắt được nhuộm và làm tiêu bản vi phẫu. Quan sát, mô tả và chụp ảnh

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

Microscopic examination and chemical composition analysis of one-leaf orchid *Nervilia aragoana* Gaudich - Orchidaceae family harvested at KonTum

Thi Ngoc Mai Tran^{1*}, Cong Luan Tran²

¹Ho Chi Minh city University of Technology

²Tay Do University

Received 3 January 2018; accepted 27 February 2018

Abstract:

One-leaf orchid in Kon Tum province is named *Nervilia aragoana* Gaudich. This plant was examined for microscopy of leaves, petioles and rhizomes to determine the structure of epidermal cell layers and the characteristics of xylem phloem. We also conducted characterization of leaf and rhizome powder, microscopic examination of the powder to determine the structure of the tissue fragment, the shape and size of starch granules and calcium oxalate crystals. Chemical composition analysis of the leaf and rhizome by the improved Ciuley method to identify and characterize the chemical constituents present in the various extracting fractions, thereby orienting the extraction and isolation processes with biological activity compounds.

Keywords: Chemical composition analysis, microscopic examination, *Nervilia*.

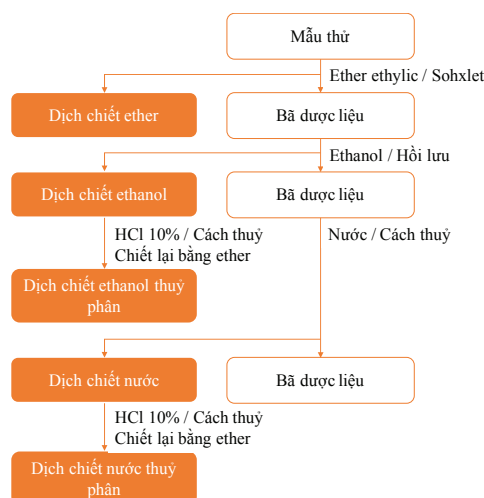
Classification number: 3.4

các đặc điểm vi phẫu qua kính hiển vi [5-7].

Phân tích đặc điểm vi học: Phần trên mặt đất và phần dưới mặt đất được sấy khô, nghiền mịn và làm tiêu bản bột. Quan sát, mô tả và chụp ảnh các đặc điểm qua kính hiển vi [5-7].

Phân tích sơ bộ thành phần hoá học theo quy trình phân tích Ciuley cải tiến [7].

Chuẩn bị dịch chiết: Mẫu bột lá và bột thân rễ được chiết theo quy trình ở hình 1 để thu các phân đoạn dịch chiết trong ether, trong ethanol, trong nước; dịch chiết ethanol và dịch chiết nước thủy phân trong HCl 10%.



Hình 1. Sơ đồ chiết mẫu để thu dịch chiết.

Phân tích các hợp chất có trong dịch chiết: Các phân đoạn của dịch chiết ether, ethanol, nước và các dịch thủy phân trong HCl 10% của bột lá và bột thân rễ được tiến hành phân tích định tính theo bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp phân tích các nhóm hợp chất có trong dịch chiết.

Nhóm hợp chất	Thuốc thử/Cách thực hiện	Phản ứng dương tính
Chất béo	Nhỏ dung dịch lên giấy	Vết trong mờ
Carotenoid	Carr-Price	Xanh chuyển sang đỏ
	H ₂ SO ₄	Xanh dương hay xanh lục ngả sang xanh dương
Tinh dầu	Bốc hơi tới cạn	Có mùi thơm
Triterpenoid tự do	Liebermann-Burchard	Đỏ nâu - tím, lớp trên có màu xanh lục
Alkaloid	Thuốc thử chung alkaloid	Kết tủa
Coumarin	Phát quang trong kiềm	Phát quang mạnh hơn
Antraglycosid	KOH 10%	Dung dịch kiềm có màu hồng tới đỏ
Flavonoid	Mg/HCl đậm đặc	Dung dịch có màu hồng tới đỏ
Glycosid tim	Thuốc thử vòng lacton	Tím
	Thuốc thử đường 2-desoxy	Đỏ mặn
Anthocyanosid	HCl	Đỏ
	KOH	Xanh
Proanthocyanidin	HCl/t°	Đỏ
Tanin	FeCl ₃	Xanh rêu hay xanh đen (polyphenol)
	Dung dịch gelatin muối	Tủa bông trắng (tanin)
Triterpenoid thủy phân	Liebermann-Burchard	Đỏ nâu - tím, lớp trên có màu xanh lục
Saponin	Thuốc thử Liebermann	Có vòng tím nâu
	Lắc mạnh dung dịch nước	Sủi bọt
Acid hữu cơ	Bột Na ₂ CO ₃	Sủi bọt
Chất khử	Thuốc thử Fehling	Tủa đỏ gạch
Polyuronic	Pha loãng với cồn 90%	Tủa bông trắng - vàng nâu

Đánh giá kết quả phân tích theo các mức sau: (-) không có, (±) nghi ngờ, (+) có ít, (++) có, (+++) có nhiều, (+++++) có rất nhiều.

Kết quả nghiên cứu

Đặc điểm hình thái và định tên khoa học của lan một lá thu tại Kon Tum

Phân tích đặc điểm hình thái cho thấy: Lan một lá là cây thân thảo. Lá và hoa không đồng trưởng, lá màu xanh, đôi khi có chấm màu tím sẫm, không có lông, dài khoảng 12 cm, rộng khoảng 16 cm, hình tim rất rộng, mép hơi lượn sóng, thùy gốc ít nhiều phủ lên nhau. Cuống lá cao khoảng 10-15 cm, màu xanh, đôi khi có chấm màu tím. Củ chìm dưới mặt đất, đường kính khoảng 1-2 cm, có màu trắng. Củ đâm rễ tạo dải con phát triển thành cây mới.



Hình 2. Lan một lá *Nervilia aragoana* Gaudich.

Dựa vào quan sát đặc điểm hình thái (hình 2), tham khảo tài liệu trên trang theplantlist và eol [3, 4], và kết quả giám định của Bộ môn Tài nguyên - Dược liệu thuộc Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh, cây lan một lá thu tại tỉnh Kon Tum được định tên khoa học là *Nervilia aragoana* Gaudich, tên đồng nghĩa là *Nervilia concolor* (Blume) Schltr., tên tiếng Việt là Chân trâu xanh, Trăn châu xanh, Thanh thiên quỳ xanh, Lan cờ thuộc họ Lan - Orchidaceae. Phân hạng: VU.A1c,d.

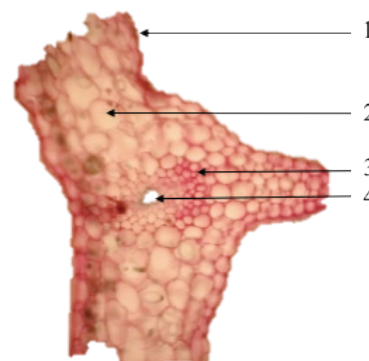
Phân tích vi phẫu

Cấu tạo giải phẫu của các cơ quan thực vật là một đặc điểm quan trọng trong kiểm nghiệm dược liệu. Phân tích cấu tạo bên trong của cây giúp xác định các đặc điểm điển hình của đối tượng nghiên cứu, nói lên sự khác biệt của các cơ quan của các loại dược liệu khác nhau.

Đặc điểm vi phẫu lá (hình 3): Ngoài cùng là lớp biểu bì (1) có cấu tạo là một lớp tế bào xếp đều đặn, bên trong lớp biểu bì là mô mềm (2) gồm những tế bào to, hình lục giác, cạnh hơi tròn, kích thước không đồng đều, vách mỏng. Chính giữa gân lá là bó libe-gỗ (4) với phần libe nằm phía dưới, phần gỗ nằm phía trên gồm những tế bào có vách dày hoá gỗ. Bao quanh bó libe-gỗ là đám mô dày (3) có hình tròn, vách dày.

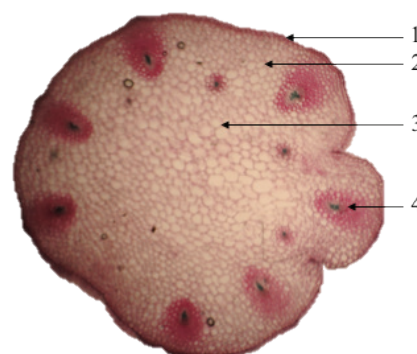
Đặc điểm vi phẫu cuống lá (hình 4): Biểu bì (1) gồm lớp tế bào ngoài cùng xếp đều đặn. Mô mềm vỏ (2) nằm ngay dưới lớp biểu bì gồm các tế bào hình lục giác có cạnh tương

đối tròn, sắp xếp đều đặn. Bên trong là đám mô mềm tủy (3) gồm các tế bào tương đối tròn, kích thước lớn hơn các tế bào mô mềm vỏ. Các bó libe-gỗ (4) xếp thành vòng tròn gần mép ngoài cuống lá, mỗi bó có phần gỗ nằm phía trong, phần libe nằm phía ngoài.



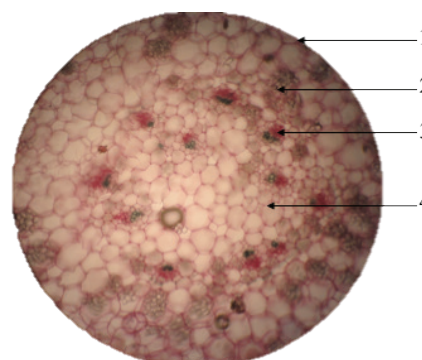
Hình 3. Vi phẫu lá.

1. Biểu bì, 2. Mô mềm, 3. Đám mô dày bao quanh bó libe-gỗ, 4. Bó libe-gỗ.



Hình 4. Vi phẫu cuống lá.

1. Biểu bì, 2. Mô mềm vỏ, 3. Mô mềm tủy, 4. Bó libe-gỗ.



Hình 5. Vi phẫu thân rễ.

1. Biểu bì, 2. Các tế bào mô mềm chứa tinh bột, 3. Bó libe-gỗ, 4. Mô mềm tủy.

Đặc điểm vi phẫu thân rễ (dạng củ) (hình 5): Ngoài cùng là biểu bì (1) gồm một lớp tế bào xếp đều đặn. Bên trong là các tế bào mô mềm vỏ (2) có hình lục giác, kích thước không đồng đều, vách mỏng, có chứa nhiều hạt tinh bột hình xoan hay gần tròn tập trung thành từng đám bên trong. Các bó libe-gỗ (3) xếp thành vòng, mỗi bó có phần gỗ hướng vào trong, phần libe hướng ra ngoài. Mô mềm tủy (4) có hình dạng và kích thước giống với mô mềm vỏ.

Phân tích vi học

Mỗi loại dược liệu đều có những đặc điểm mô học đặc trưng, chúng được thể hiện một phần qua đặc điểm bột dược liệu. Khảo sát bột dược liệu bằng kính hiển vi nhằm mục đích tìm ra những đặc điểm vi học đặc trưng của bột dược liệu, giúp cho việc định danh, xác định độ tinh khiết của dược liệu, phân biệt với dược liệu dễ nhầm lẫn và phát hiện sự giả mạo nếu có.

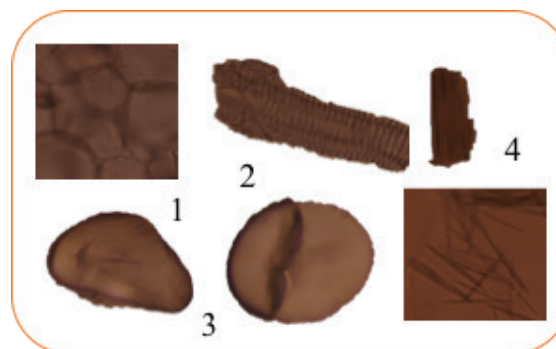
Đặc điểm của bột lá (hình 6): Bột lá có màu lục, không mùi, vị hơi đắng. Soi dưới kính hiển vi cho thấy: Mảnh mô mềm (1) gồm các tế bào hình lục giác vách mỏng. Các mảnh mạch (2) gồm mạch vạch và mạch xoắn. Sợi (3) dài, vách mỏng, khoang rộng. Tinh thể canxi oxalat (4) hình kim xếp thành từng búi, dài khoảng 65 µm.



Hình 6. Vi học bột lá.

1. Mảnh mô mềm, 2. Các mảnh mạch, 3. Sợi, 4. Tinh thể canxi oxalat.

Đặc điểm của bột thân rễ (dạng củ) (hình 7): Bột thân rễ có màu trắng xám, mùi thơm, vị ngọt nhẹ. Soi dưới kính hiển vi cho thấy: Mảnh mô mềm (1) với các tế bào mô mềm hình lục giác, vách mỏng, kích thước không đồng đều. Mảnh mạch (2) gồm mạch vạch và mạch xoắn. Hạt tinh bột (3) hình xoan có chiều dài khoảng 60-75 µm, rộng 40-50 µm, hình gần tròn đường kính 25-65 µm. Tinh thể canxi oxalat (4) hình kim xếp thành từng búi hay nằm rải rác, dài khoảng 65 µm.



Hình 7. Vi học bột thân rễ.

1. Mảnh mô mềm, 2. Mảnh mạch, 3. Hạt tinh bột, 4. Tinh thể canxi oxalat

Phân tích sơ bộ thành phần hoá học

Quá trình phân tích định tính thành phần hoá học của lan một lá được thực hiện theo sơ đồ hình 1 và bảng 1 thu được kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hoá học *Nervilia aragana* Gaudich.

Nhóm hợp chất	Dịch chiết bột lá trong dung môi					Dịch chiết bột thân rễ trong dung môi					Kết luận	
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	Lá	Thân rễ
Chất béo	-					-					-	-
Carotenoid	+					-					+	-
Tinh dầu	-					-					-	-
Triterpenoid tự do	-					+					-	+
Alkaloid	-	±		±		-	-		-		±	-
Coumarin	-	+	+			-	-	-			+	-
Antraglycosid	-		-			-		-			-	-
Flavonoid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycosid tim		-	-	-	-		-	-	+	-	-	+
Anthocyanosid	-		-			-			-		-	-
Proanthocyanidin	+		-			-			-		+	-
Tanin		±	-			-			-		±	-
Khung Triterpenoid		-		-				+		-	-	+
Saponin	+		+			-			-		+	-
Acid hữu cơ	-		-			-			-		-	-
Chất khử	+		+			+			-		+	+
Polyuronic			-						+		-	+

Ghi chú: (1) ether, (2) ethanol, (3) thủy phân dịch chiết ethanol trong HCl 10%, (4) nước, (5) thủy phân dịch chiết nước trong HCl 10%, (-) không có, (±) nghi ngờ, (+) có.

Mẫu bột lá cây *Nervilia aragoana* Gaudich trong dịch chiết ether có carotenoid, bột thân rễ có triterpenoid tự do. Dịch chiết ethanol bột lá có coumarin, anthraquinon, saponin và chất khử; nghi ngờ có alkaloid và tanin; bột thân rễ có khung triterpenoid và chất khử. Dịch chiết nước mẫu bột lá có saponin và chất khử, nghi ngờ có alkaloid; bột thân rễ có glycosid tim và polyuronic.

Kết luận

Cây lan một lá thu tại tỉnh Kon Tum có tên khoa học *Nervilia aragoana* Gaudich có đặc điểm vi phẫu và mô học đặc trưng của lá và thân củ. Phân tích thành phần hoá học của bột lá có các hợp chất carotenoid, coumarin, proanthocyanidin, saponin, và chất khử, nghi ngờ có alkaloid và tanin; bột thân rễ có triterpenoid tự do, glycosid tim, khung triterpenoid, chất khử và polyuronic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Huy Bích và cs (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1*, NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
- [2] Nguyễn Tập (2004), *Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam*, Viện Dược liệu, Hà Nội.
- [3] <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-135256>
- [4] <http://www.eol.org/pages/1137657/overview>
- [5] Lê Đình Bích, Trần Văn Ôn (2007), *Thực vật học*, NXB Y học, Hà Nội.
- [6] Nguyễn Viết Thân (2003), *Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi*, NXB. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
- [7] Trần Hùng và cs (2013), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, NXB Đại học Y dược, TP Hồ Chí Minh.

Phương pháp đo các đặc tính quang học của mẫu y sinh học bằng hệ thống phân cực ánh sáng trong chẩn đoán và theo dõi bệnh tiểu đường

Bùi Thị Ngọc Phượng¹, Nguyễn Lê Trang Anh¹, Nguyễn Minh Kim²,
Trịnh Thị Diệu Thường³, Phạm Thị Thu Hiền^{1*}

¹Bộ môn Kỹ thuật y sinh, Trường Đại học quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Khoa nội 3, Bệnh viện Ung bướu, Sở Y tế TP Hồ Chí Minh

³Khoa Y học cổ truyền, Trường Đại học y dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 5/3/2018; ngày gửi phản biện 13/3/2018; ngày nhận phản biện 16/4/2018; ngày chấp nhận đăng 19/4/2018

Tóm tắt:

Gần đây, ngày càng có nhiều sự quan tâm trong việc nghiên cứu đo các thông số quang học trên các mẫu y sinh học vì tiềm năng to lớn trong ứng dụng thực tiễn không xâm lấn. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật phân tích dựa trên phương pháp đo phân cực Stokes và phương pháp phân tách ma trận Mueller được sử dụng cho việc đo các tính chất quang học ánh sáng [lưỡng chiết thẳng (LB), lưỡng sắc thẳng (LD), lưỡng chiết tròn (CB), lưỡng sắc tròn (CD), khử cực thẳng (L-Dep), và khử cực tròn (C-Dep)] của huyết tương người. Một hệ thống phân cực quang học được thiết lập nhằm đo đạc và phân tích các thông số quang học của mẫu huyết tương ở người có pha D-glucose với dãy nồng độ 0 ~ 1 M. Kết quả đo cho thấy, tính chất CB tăng tuyến tính với nồng độ D-glucose trong huyết tương. Trong khi đó, chỉ số khử cực giảm nhẹ khi nồng độ D-glucose tăng lên. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, có sự tương quan giữa biến thiên của CB với nồng độ D-glucose trong các mẫu huyết tương của người và trong các mẫu mô giả (phantom) chứa dung dịch huyền phù (polystyrene microsphere 1,4 μ m). Phương pháp đo quang học được đề xuất có lợi thế không chỉ trong việc trích xuất các thông số quang học của mẫu đo mà còn trong việc duy trì độ chính xác bằng phương pháp tính toán độc lập (decouple) thông số quang học của mẫu, từ đó làm giảm sai số ảnh hưởng lên kết quả đo. Vì thế, phương pháp này có những ứng dụng đầy hứa hẹn trong chẩn đoán và theo dõi bệnh tiểu đường không xâm lấn.

Từ khóa: Ma trận Mueller, mẫu huyết tương, mẫu mô sinh học, phân cực Stokes, tính chất quang học.

Chỉ số phân loại: 3.5

Giới thiệu

Các tính chất phân cực của ánh sáng được tán xạ từ môi trường mờ đục như là mô sinh học, cơ bắp của con người và động vật, và một số chất dẻo đã nhận được sự chú ý đáng kể do tiềm năng to lớn trong việc kiểm tra, phát hiện và chẩn đoán bệnh. Nhiều phương pháp khác nhau đã được đề xuất để xác định các tính chất quang học của môi trường mờ đục. Cameron và cs, Liu và cs [1-3] đã đề xuất một phương pháp dựa trên phương pháp tiếp cận hình ảnh ma trận Mueller để ước lượng các hệ số tán xạ của môi trường mờ đục như là mô chuột, khối u ác tính. Deng và nhóm nghiên cứu của ông [4, 5] đã sử dụng ma trận Mueller để mô tả những kiểu tán xạ ngược của ánh sáng trong các môi trường tán xạ cao dựa trên giả định rằng quỹ đạo của photon chỉ bao gồm 3 giai đoạn tán xạ. Một số nghiên cứu tương tự đã sử dụng phương pháp trên và thuật toán mô phỏng Monte Carlo để quan sát các mô hình tán xạ ngược của thể polystyrene hình cầu. Wang và cs [6, 7] đã so sánh mô hình tán xạ ngược

của tính chất lưỡng chiết không định hướng của môi trường mờ đục sử dụng mô hình tán xạ đơn, mô hình tán xạ kép và mô hình Monte Carlo. Ghosh và cs [8-11] đã đề xuất một phương pháp dựa trên phương pháp ma trận phân hủy Mueller [12] để trích xuất các thuộc tính phân cực (LB, CB, LD, hệ số khử cực của môi trường mờ đục phức tạp như là polyacrylamide phantoms, thể vân vi cầu polystyrene và đường mía. Ngoài ra, phương pháp trên cũng đã được chứng minh bằng mô phỏng Monte Carlo).

Mặc dù những phương pháp được trình bày ở trên cung cấp một cái nhìn sâu sắc, hữu ích về trạng thái tán xạ của môi trường mờ đục nhưng cũng có một số nhược điểm. Ví dụ, các phương pháp đề xuất trên [1-7] không thể xác định đầy đủ các tính chất của môi trường tán xạ. Tương tự, phương pháp được trình bày trong [8-11] không áp dụng được khi tính chất lưỡng sắc của ma trận Mueller có dạng ma trận đơn (singularity matrix). Trong nghiên cứu gần đây, chúng tôi đã đề xuất kỹ thuật phân tích độc lập để trích

*Tác giả liên hệ: Email: pthien@hcmiu.edu.vn

Method for measuring the optical properties of bio-materials utilizing the polarized light system for diagnosis and monitoring of diabetes

Thi Ngoc Phuong Bui¹, Le Trang Anh Nguyen¹,
Minh Kim Nguyen², Thi Dieu Thuong Trinh³,
Thi Thu Hien Pham^{1*}

¹Biomedical Engineering Department, International University, Vietnam
National University HCMC

²Internal Medicine 3, Oncology Hospital, HCMC Department of Health

³Faculty of Traditional Medicine, Ho Chi Minh City University of Medicine
and Pharmacy

Received 5 March 2018; accepted 19 April 2018

Abstract:

Recently, the study of optical parameters on biological samples has attracted more and more attention from researchers because of the great potential in non-invasive practical applications. In this study, an analytical technique based on the Stokes polarization and the Mueller matrix decomposition method was used to extract the optical properties of human plasma samples (i.e. linear birefringence (LB), linear dichroism (LD), circular birefringence (CB), circular dichroism (CD), linear depolarization (LDep), and circular depolarization (CDep)). The optical experimental system was set up to measure and analyze the optical parameters of human blood plasma samples containing dissolved D-glucose with concentrations ranging from 0~1 M. The results showed that there was a good agreement between CB property and D-glucose concentration in human blood plasma samples and in phantom tissue samples containing a 1.4 μm polystyrene microsphere. For the human blood plasma, CB property increased linearly with the concentration of D-glucose whereas the depolarization index decreased slightly as the concentration of D-glucose increased. The proposed optical method has the advantages of not only extracting the optical parameters of the biological samples but also maintaining the accuracy by decoupling method for the optical parameters of the samples, thereby reducing the effect on measurement results. Therefore, this approach has promising applications in non-invasive diabetic diagnosis and monitoring by the optical method.

Keywords: Biological sample, human blood plasma, Muller matrix, optical properties, Stokes polarization.

Classification number: 3.5

xuất các thông số hiệu quả của vật liệu quang học không định hướng (LB, CB, LD, CD, L-Dep và C-Dep) [13]. Bằng phương pháp tính toán phân tích độc lập các thông số trong nghiên cứu này, hệ thống đo đã nâng cao độ chính xác của các thông số quang học trên mẫu huyết tương với nồng độ đường D-glucose khác nhau.

Phương pháp đo

Lý thuyết

Phần này giới thiệu các mô hình phân tích để xác định đặc tính quang học LB, LD, CB, CD, L-Dep và C-Dep của mẫu sinh học. 9 thông số được trích xuất từ một mẫu sinh học với tính chất quang học lưỡng tính gồm góc định hướng của LB (α), tính chất LB (β), góc quay quang học của tính CB (γ), góc định hướng của LD (θ_d), tính chất LD (D), tính chất CD (R), hai mức độ L-Dep (e_1 và e_2) và mức độ C-Dep (e_3). Bảng 1 trình bày các ký hiệu, phạm vi đo, định nghĩa của các thông số đo và chỉ số khử cực tương ứng.

Bảng 1. Ký hiệu, phạm vi đo, định nghĩa của các tính chất quang học phân cực của môi trường mờ đục với tính lưỡng tính [13].

Tên gọi	Ký hiệu	Phạm vi đo	Định nghĩa(*)
Góc định hướng của LB	α	0 ~ 180°	
LB	β	0 ~ 360°	$2\pi(n_s - n_p)/\lambda_0$
Góc quay quang học của CB	γ	0 ~ 180°	$2\pi(n_- - n_+)/\lambda_0$
Góc định hướng của LD	θ_d	0 ~ 180°	
LD	D	0 ~ 1	$2\pi(\mu_s - \mu_p)/\lambda_0$
CD	R	-1 ~ 1	$2\pi(\mu_- - \mu_+)/\lambda_0$
L-Dep	e_1 và e_2	-1 ~ 1	
C-Dep	e_3	-1 ~ 1	
Chỉ số khử cực	Δ	0 ~ 1	

(*) n là chiết suất, μ là hệ số hấp thụ, l là chiều dài đường dẫn đi qua môi trường (độ dày của vật liệu), λ_0 là bước sóng trong chân không. Ngoài ra, các ký hiệu f và s đại diện cho trục nhanh và chậm của sóng phân cực thẳng khi bỏ qua các hiệu ứng sóng tròn. Cuối cùng, $+$ và $-$ đại diện cho sóng phân cực phải và trái khi bỏ qua những phân cực thẳng.

Một vector Stokes đầu ra (output) có thể được tính như sau:

$$\begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} = [M_\Delta][M_{\beta}][M_{\gamma}][M_{\theta_d}][M_{CD}]\hat{S}_c = \begin{pmatrix} m_{11} & m_{12} & m_{13} & m_{14} \\ m_{21} & m_{22} & m_{23} & m_{24} \\ m_{31} & m_{32} & m_{33} & m_{34} \\ m_{41} & m_{42} & m_{43} & m_{44} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{S}_0 \\ \hat{S}_1 \\ \hat{S}_2 \\ \hat{S}_3 \end{pmatrix} \quad (1)$$

Với $[M_\Delta]$, $[M_{\beta}]$, $[M_{\gamma}]$, $[M_{\theta_d}]$ và $[M_{CD}]$ là các ma trận Mueller diễn tả sự khử cực của các tính chất LB, CB, LD, CD của mẫu y sinh tương ứng; $\hat{S}_c$ là vector Stokes đầu vào (input). Trong phương pháp này, mẫu được chiếu bởi ánh sáng phân cực, cụ thể là 2 loại phân cực tròn và 4 loại phân cực thẳng. Các vector Stokes đầu ra tương ứng được tính toán và rút ra từ phương trình (1) như sau:

$$S_{0^0} = [m_{11} + m_{12}, m_{21} + m_{22}, m_{31} + m_{32}, m_{41} + m_{42}]^T \quad (2)$$

$$S_{45^0} = [m_{11} + m_{13}, m_{21} + m_{23}, m_{31} + m_{33}, m_{41} + m_{43}]^T \quad (3)$$

$$S_{90^0} = [m_{11} - m_{12}, m_{21} - m_{22}, m_{31} - m_{32}, m_{41} - m_{42}]^T \quad (4)$$

$$S_{135^0} = [m_{11} - m_{13}, m_{21} - m_{23}, m_{31} - m_{33}, m_{41} - m_{43}]^T \quad (5)$$

$$S_{RHC} = [m_{11} + m_{14}, m_{21} + m_{24}, m_{31} + m_{34}, m_{41} + m_{44}]^T \quad (6)$$

$$S_{LHC} = [m_{11} - m_{14}, m_{21} - m_{24}, m_{31} - m_{34}, m_{41} - m_{44}]^T \quad (7)$$

Phương trình từ (2) đến (7) là các giá trị của tích số ma trận Mueller và vector Stokes đầu vào được đưa ra trong phương trình (1). Tính chất LD và CD của mẫu được tính toán bằng cách chỉ sử dụng các giá trị m_{11} , m_{12} , m_{13} và m_{14} trong phương trình (1). Cụ thể hơn, góc định hướng của LD (θ_d) và LD (D) được tính theo phương trình sau:

$$2\theta_d = \tan^{-1} \left(\frac{S_{45^0}(S_0) - S_{135^0}(S_0)}{S_{0^0}(S_0) - S_{90^0}(S_0)} \right) \quad (8)$$

$$D = \frac{\sqrt{(S_{0^0}(S_0) - S_{90^0}(S_0))^2 + (S_{45^0}(S_0) - S_{135^0}(S_0))^2}}{\sqrt{(S_{0^0}(S_0) + S_{90^0}(S_0))^2 - (S_{RHC}(S_0) - S_{LHC}(S_0))^2}} \quad (9)$$

Giá trị của CB (R) được tính như sau:

$$R = \frac{[S_{0^0}(S_0) + S_{90^0}(S_0)] - \sqrt{[(S_{0^0}(S_0) + S_{90^0}(S_0))^2 - (S_{RHC}(S_0) - S_{LHC}(S_0))^2]}}{[S_{RHC}(S_0) - S_{LHC}(S_0)]} \quad (10)$$

Góc định hướng của LB (α), tính chất LB (β), góc quay quang học CB (γ) được rút ra bằng cách sử dụng từ các phần tử đã biết n_{ij} trong ma trận $[M_{\Delta R}]$. Tính chất LB (β) được tính theo công thức sau:

$$\beta = \cos^{-1} \left(\frac{-(n_{22}n_{42} + n_{23}n_{43})(n_{32}n_{42} + n_{33}n_{43})}{(n_{22}n_{43} - n_{23}n_{42})(n_{32}n_{43} - n_{33}n_{42})} \right) \quad (11)$$

Góc định hướng LB được tính như sau:

$$\alpha = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{-(n_{22}n_{42} + n_{23}n_{43})}{\cos(\beta)(n_{22}n_{43} - n_{23}n_{42})} \right) \quad (12)$$

Góc quay quang học CB được tính theo công thức:

$$\gamma = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{-C_2n_{22} + C_1n_{23}}{C_1n_{22} + C_2n_{23}} \right) \quad (13)$$

Với:

$$C_1 = \cos^2(2\alpha) + \cos(\beta)\sin^2(2\alpha) \quad (14)$$

$$C_2 = \cos(2\alpha)(1 - \cos(\beta))\sin(2\alpha) \quad (15)$$

n_{ij} là các phần tử trong ma trận $[M_{\Delta R}] = [M_{\Delta}] \cdot [M_{lb}] \cdot [M_{cb}]$.

Mức độ tuyến tính và C-Dep được tính như sau:

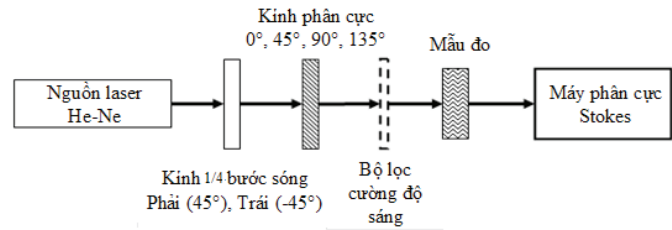
$$e_1 = \frac{n_{22}}{A_{22}} \quad (16)$$

$$e_2 = \frac{n_{33}}{A_{33}} \quad (17)$$

$$e_3 = \frac{n_{44}}{A_{44}} \quad (18)$$

Tóm lại, các kết quả tính toán các tính chất quang học trên không yêu cầu trực lượng chiết chính và phụ phải được liên kết và đồng thời phân tách giữa các thông số. Từ đó, 9 thông số là những hàm số độc lập, nghĩa là sai số của giá trị tính toán thông số này sẽ không ảnh hưởng đến những kết quả tính toán của thông số khác, và như vậy phương pháp tính toán trên sẽ làm tăng độ chính xác của kết quả đo.

Thiết lập thí nghiệm



Hình 1. Sơ đồ minh họa hệ thống đo dùng trong thí nghiệm.

Hình 1 trình bày sơ đồ minh họa của hệ thống đo dùng trong nghiên cứu này để đo các tính chất LB, LD, CB, CD, L-Dep và C-Dep của mẫu mô y sinh học dùng trong xét nghiệm, chẩn đoán bệnh. Trong thí nghiệm này, ánh sáng đầu vào được cung cấp bởi một laser Helium-Neon (JDSU - Model 1125P) với bước sóng 632,8 nm. Ngoài ra, một kính phân cực (GTH5M, Thorlabs Co.) và kính 1/4 bước sóng (QWP0-633-04-4-R10, CVI Co.) được sử dụng để tạo ra 4 chùm tia sáng phân cực thẳng (0, 45, 90 và 135°) và 2 chùm tia sáng phân cực tròn (phải và trái). Cuối cùng là một bộ lọc cường độ trung lập (NDC-100-2, ONSET Co.) được sử dụng để nhằm đảm bảo mỗi ánh sáng phân cực đầu vào có một cường độ đồng nhất như nhau. Các thông số đầu ra Stokes được tính từ các phép đo cường độ bằng cách sử dụng máy đo phân cực Stokes (PAX5710, Thorlabs Co.) với tốc độ lấy mẫu là 33,33 mẫu/giây. Tại mỗi thời điểm đo có 1.024 kết quả đo được lấy cho mỗi mẫu đo. Sau đó, một chương trình tính toán được Phạm [13] viết bằng ngôn ngữ MATLAB sẽ đọc giá trị của 100 điểm dữ liệu đo chọn lọc và tính ra giá trị trung bình kèm sai số kết quả đo (standard deviation) của từng tính chất quang học.

Quá trình chuẩn bị

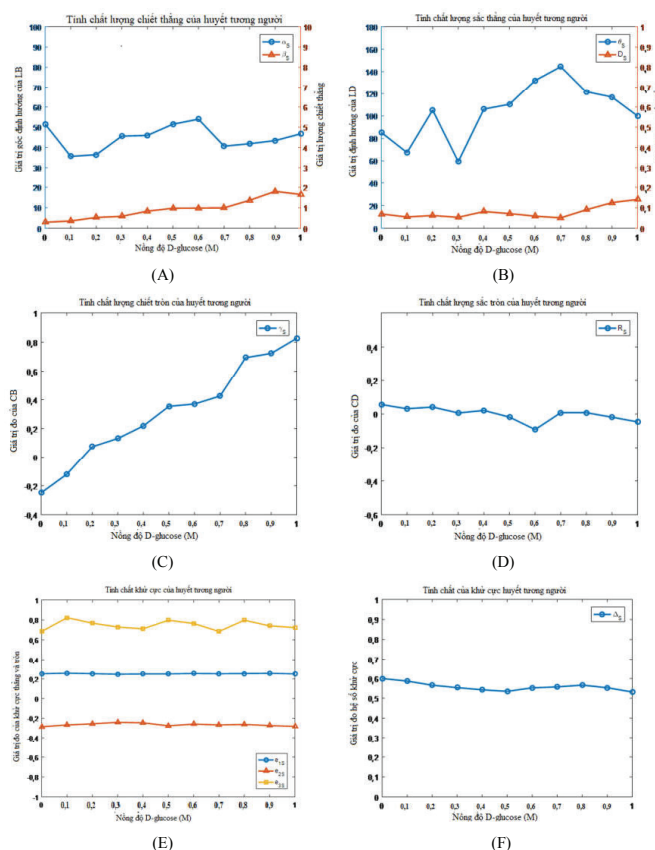
Quá trình hiệu chỉnh máy gồm việc điều chỉnh các trạng thái phân cực của ánh sáng đầu vào và góc quay của ánh sáng. Để đảm bảo ánh sáng truyền qua các thành phần quang học được chính xác thì một dụng cụ hiệu chỉnh quang học (có lỗ kim) được đặt trước các thiết bị quang học. Ánh sáng được phản chiếu bởi các thiết bị quang học trên sẽ được điều chỉnh qua lỗ kim nhằm đảm bảo một hệ đo quang học thẳng hàng. Cũng theo quy trình trên, mẫu được đặt vào hệ quang được điều chỉnh với ánh sáng đầu vào và tiếp đó là góc tới của ánh sáng đầu vào bằng một bộ động cơ xoay điều khiển các góc quay chính xác trên máy tính. Sau đó, các trạng thái của ánh sáng đầu vào tiếp tục được hiệu chỉnh bởi bộ phận điều khiển và mô hình hình cầu Poincare trong phân cực kế của máy đo phân cực Stokes. Tất cả các quá trình hiệu chỉnh trên nhằm đảm bảo một hệ đo quang học đồng nhất và chính xác khi tiến hành quá trình đo trên nhiều mẫu y sinh học.

Mẫu đo y sinh học trong nghiên cứu này là huyết tương người được lấy từ Bệnh viện Truyền máu huyết học TP Hồ Chí Minh. Huyết tương được bảo quản ở -20°C . Trong thí nghiệm, các mẫu được làm tan ra ở 37°C và được sử dụng trong vòng 24 giờ. Huyết tương pha thêm đường (D-glucose) được sử dụng trong vòng 2 giờ để tránh làm giảm nồng độ đường. Mẫu được sử dụng cho thí nghiệm có nồng độ đường trong khoảng từ 3 mM (54 mg/dl) đến 1 M (18 g/dl). 3 ml mỗi mẫu huyết tương được đặt trong ống thủy tinh vuông (cuvette) làm từ thạch anh (quartz) có đường kính 10 mm cho mỗi thí nghiệm đo mẫu. Thí nghiệm được tiến hành để nghiên cứu mối tương quan giữa nồng độ đường trong nước, thể mờ đục (polystyrene microsphere) và góc quay quang học.

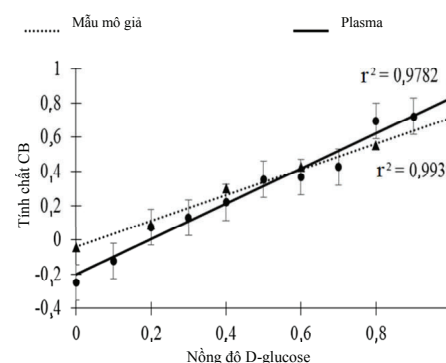
Kết quả và thảo luận

Hình 2 trình bày kết quả thí nghiệm của mẫu gồm huyết tương có hòa tan D-glucose. Các giá trị thông số quang học được biểu diễn theo sự gia tăng nồng độ D-glucose trong phạm vi 0 ~ 1 M với lượng tăng 0,1 M tại mỗi điểm đo.

Hình 2(A) và 2(B) cho thấy tính chất LB (β) và LD (D) đều gần bằng không cho tất cả các giá trị đo của nồng độ D-glucose. Từ đó dẫn đến các giá trị của các góc định hướng LB và LD (α và θ_d tương ứng) sẽ thay đổi ngẫu nhiên khi β và D gần bằng 0. Trong hình 2(C), giá trị đo của góc quay quang học CB tăng gần như tuyến tính với nồng độ D-glucose trong phạm vi đo, điều này cho thấy có mối tương quan giữa tính chất CB và nồng độ đường. Ngược lại, chỉ số khử cực (Δ) giảm nhẹ khi nồng độ D-glucose tăng (hình 2(F)). Những tính chất còn lại [CD (R), độ L-Dep và C-Dep (e_1 , e_2 và e_3)] không nhạy với nồng độ D-glucose.



Hình 2. Các tính chất quang học đo được của mẫu huyết tương với sự thay đổi nồng độ D-glucose.



Hình 3. Sự thay đổi góc quay quang học CB với nồng độ D-glucose trong mẫu huyết tương và mẫu mô giả.

Hình 3 trình bày các kết quả thực nghiệm thu được trong sự biến thiên của góc quay quang học CB (γ) với nồng độ D-glucose trong huyết tương người và mẫu mô giả có chứa các hạt huyền phù (polystyrene microspheres có đường kính 1,4 μm). Với cả hai mẫu đo, có sự tuyến tính xuất hiện giữa góc quay quang học CB và nồng độ D-glucose. Tuy nhiên, tỷ lệ tăng góc quay quang học của mẫu huyết tương ($1,07^{\circ}$ cho 1 M D-glucose) cao hơn so với mẫu mô giả ($0,75^{\circ}$ cho 1 M D-glucose). Kết quả này là hợp lý vì huyết tương là dung dịch pha lỏng tinh khiết, trong khi đó, mẫu

mô giả có chứa các hạt cầu nhỏ polystyrene.

Kết luận

Nghiên cứu này đã đề xuất kỹ thuật phân tích độc lập dựa trên phương pháp đo phân cực Stokes và phương pháp ma trận Mueller để trích xuất ra các tính chất phân cực ánh sáng (LB, CB, LD, CD, L-Dep, C-Dep) của mẫu quang học y sinh. Kết quả thí nghiệm cho thấy có mối tương quan có ý nghĩa giữa góc quay quang học CB và nồng độ D-glucose trong mẫu huyết tương và mẫu mô giả. Qua kết quả đo này có thể cho thấy một tiềm năng cho việc ứng dụng tính chất phân cực ánh sáng trong việc phát hiện bệnh tiểu đường (cụ thể là dựa trên số đo của CB).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh trong khuôn khổ Đề tài mã số C2016-28-10. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B.D. Cameron, et al. (1998), "Measurement and calculation of the two-dimensional backscattering Mueller matrix of a turbid medium", *Opt. Lett.*, **23**(7), pp.485-487.
- [2] B.D. Cameron, Y. Li, A. Nezhuvungal (2006), "Determination of optical scattering properties in turbid media using Mueller matrix imaging", *J. Biomed. Opt.*, **11**(5), pp.1-8, doi: 10.1117/1.2363347.

- [3] G.L. Liu, et al. (2002), "Polarization-based optical imaging and processing techniques with application to the cancer diagnostics", *Proc. SPIE*, **4617**, pp.208-220.
- [4] Y. Deng, et al. (2007), "Characterization of backscattering Mueller matrix patterns of highly scattering media with triple scattering assumption", *Opt. Exp.*, **15**(15), pp.9672-9680.
- [5] Y. Deng, et al. (2008), "Numerical study of the effects of scatterer sizes and distributions on multiple backscattered intensity patterns of polarized light", *Opt. Lett.*, **33**(1), pp.77-79.
- [6] X. Wang, L.V. Wang (2002), "Propagation of polarized light in birefringent turbid media: a Monte Carlo study", *J. Biomed. Opt.*, **7**(3), pp.279-290.
- [7] X. Wang, G. Yao, L.V. Wang (2002), "Monte Carlo model and single-scattering approximation of the propagation of polarized Light in turbid media containing glucose", *Appl. Opt.*, **41**(4), pp.792-801.
- [8] N. Ghosh, et al. (2009), "Mueller matrix decomposition for polarized light assessment of biological tissues", *J. Bioph.*, **2**(3), pp.145-156.
- [9] N. Ghosh, M.F.G. Wood, I.A. Vitkin (2009), "Polarimetry in turbid, birefringent, optically active media: a Monte Carlo study of Mueller matrix decomposition in the backscattering geometry", *J. Appl. Phys.*, **105**(10), pp.1-8.
- [10] X. Ghosh, et al. (2010), "Depolarization of light in turbid media: a scattering event resolved Monte Carlo study", *Appl. Opt.*, **49**(2), pp.153-162.
- [11] N. Ghosh, I.A. Vitkin (2011), "Tissue polarimetry: Concepts, challenges, applications, and outlook", *J. Biomed. Opt.*, **16**(11), pp.1-29.
- [12] S.Y. Lu, R.A. Chipman (1996), "Interpretation of Mueller matrices based on polar decomposition", *J. Opt. Soc. Am. A*, **13**(5), pp.1106-1113.
- [13] Thi Thu Hien Pham, Yu Lung Lo (2012), "Extraction of effective parameters of anisotropic optical materials using decoupled analytical method", *J. Biomed. Opt.*, **17**(2), pp.1-17.

Công nghệ nhân giống dịch thể, ứng dụng trong nuôi trồng nấm sò vàng (*Pleurotus citrinopileatus*)

Phạm Thị Thu*, Lê Văn Vẽ, Trần Thu Hà, Nguyễn Duy Trinh

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

Ngày nhận bài 25/12/2017; ngày chuyển phản biện 29/12/2017; ngày nhận phản biện 30/1/2018; ngày chấp nhận đăng 8/2/2018

Tóm tắt:

Nấm sò vàng (*Pleurotus citrinopileatus*) chứa nhiều hợp chất polysaccharide, axit amin thiết yếu, do vậy có giá trị dinh dưỡng và dược liệu cao. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm thiết lập quy trình nhân giống và sử dụng giống dịch thể trong nuôi trồng nấm sò vàng. Môi trường và điều kiện tối ưu để nhân giống nấm sò vàng là: 20 g/l fructose + 5 g/l pepton + 1,0 g/l KH_2PO_4 + 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH = 7,0 trong 96 h với chế độ sục khí 0,7 V/V/M. Sử dụng giống dịch thể giúp rút ngắn thời gian sinh trưởng hệ sợi (4-5 ngày), tỷ lệ nhiễm giảm (1,5%) và có thời gian hình thành quả thể ngắn hơn (3-4 ngày).

Từ khóa: Giống dịch thể, hệ sợi nấm, nấm ăn, nấm sò vàng, *Pleurotus citrinopileatus*.

Chỉ số phân loại: 4.1

Liquid fermentation technology, its applications in cultivation of golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*)

Thi Thu Pham*, Van Ve Le, Thu Ha Tran, Duy Trinh Nguyen

Center for mushroom research and development, Agricultural Genetics Institute

Received 27 December 2017; accepted 8 February 2018.

Abstract:

Due to containing several polysaccharides, essential amino acids, golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*) has high nutritional values as well as medical values. The aim of this study is to investigate optimal culture conditions for mycelium growth under liquid fermentation and using spawn produced from liquid fermentation in cultivation of golden oyster mushroom. The experiment results showed that the optimal culture conditions for mycelial biomass was 20 g/l fructose + 5 g/l pepton + 1.0 g/l KH_2PO_4 + 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH = 7.0 for 96 hours with the oxygen mode 0.7 V/V/M. The use of liquid spawn for mushroom cultivation can reduce the spawn running (4-5 days), the percentage of contamination (1.5%), and the fruit body formation time (3-4 days) as compared to the traditionally used grain spawn.

Keywords: Edible mushroom, golden oyster mushroom, liquid spawn, mycelium, *Pleurotus citrinopileatus*.

Classification number: 4.1

Đặt vấn đề

Nấm sò vàng (*Pleurotus citrinopileatus*) thuộc chi *Pleurotus*, họ Pleurotaceae, bộ Agaricales, lớp Agaricomycetes, ngành Basidiomycota, có giá trị dinh dưỡng và dược liệu cao [1]. Quả thể và sợi nấm sò vàng chứa nhiều hợp chất polysaccharide với tác dụng ức chế sự phát triển của khối u, tăng cường hệ miễn dịch, giảm quá trình lão hóa, bài trừ độc tố [2]. Nấm sò vàng là một trong các sản phẩm tự nhiên tốt cho sức khỏe do thành phần chứa hoạt tính trị tiểu đường cao [3], hàm lượng protein, lipid thô, chất xơ, kali lần lượt là 22,1, 1,32, 20,78 và 2,28%. Tám loại axit amin thiết yếu cũng đã được tìm thấy (leucine, valine, threonine, lysine, phenylalanine, isoleucine, methionine, triptophan) ở nấm sò vàng [4]. Ngoài ra, nấm sò vàng còn chứa axit glutamic với hàm lượng khá cao (3,07%), tạo hương vị thơm ngon độc đáo. Với giá trị dinh dưỡng và dược liệu cao, nấm sò vàng được xem là đối tượng tiềm năng, thu hút sự quan tâm của các nhóm nghiên cứu về thực phẩm và y học.

Nuôi trồng nấm ăn và nấm dược liệu sử dụng công nghệ nhân giống dịch thể có nhiều ưu điểm hơn so với công nghệ nhân giống truyền thống, như rút ngắn thời gian nuôi trồng, giảm tỷ lệ nhiễm và sinh lực giống tốt hơn. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy, môi trường dịch thể có ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sinh trưởng của sợi nấm, quá trình tổng hợp các hoạt chất sinh học [5]. Những nhân tố chính ảnh hưởng đến chất lượng giống dịch thể gồm nguồn carbon, nitrogen và pH môi trường... Việc ứng dụng công nghệ nhân giống dịch thể trong nuôi trồng nấm ăn và nấm dược liệu đã có từ lâu trên thế giới, tuy nhiên vẫn còn khá mới mẻ ở Việt Nam.

*Tác giả liên hệ: Email: pttthu6988@gmail.com

Trong những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu về công nghệ nhân giống dịch thể nấm sò vàng. Theo Qian và cs (2002) [6], trong môi trường dịch thể, bột ngô và đường glucose là nguồn cung cấp carbon tối ưu, cao nấm men và bột đậu tương là nguồn dinh dưỡng nitrogen tối ưu cho sự phát triển của sợi nấm sò vàng. Thời gian để hệ sợi nấm thích ứng với môi trường nhân giống là 48 h, từ 48 đến 96 h là thời kỳ tăng trưởng nhanh hệ sợi và sau đó trở về trạng thái ổn định. Sinh khối sợi nấm tươi đạt 35 mg/100 ml sau 120 h nuôi giống. Tác giả Wu và cs (2008) [7] nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon, nitrogen đến khả năng tổng hợp polysaccharide của nấm sò vàng cho thấy, nguồn carbon và nitrogen thích hợp nhất tạo sinh khối và tổng hợp polysaccharide ngoại bào của nấm sò vàng là fructose và peptone.

Với mục tiêu phát triển một số giống nấm mới, chất lượng cao nhằm tạo sự đa dạng về chủng loại phục vụ cho công tác chọn tạo và nuôi trồng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu quy trình nhân giống dịch thể nấm sò vàng, ứng dụng giống dịch thể trong nuôi trồng, so sánh tiềm năng sử dụng công nghệ nhân giống mới so với công nghệ truyền thống trước đây.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm sò vàng (*P. citrinopileatus*) ký hiệu C_{TM} nhập nội đang được lưu giữ và bảo quản tại Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm, Viện Di truyền nông nghiệp.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon và hàm lượng carbon đến sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể: Môi trường cơ bản gồm nguồn carbon + 5 g/l cao nấm men + 1,0 g/l KH_2PO_4 + 0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [8]. Nguồn carbon sử dụng là fructose, galactose, glucose, lactose và sucrose với hàm lượng 20 g/l. Thí nghiệm ảnh hưởng của hàm lượng carbon đến sinh trưởng nấm sò vàng được tiến hành với các hàm lượng đường khác nhau gồm: 5, 10, 15, 20 và 25 g/l.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể: Sử dụng công thức môi trường gồm 20 g/l đường + 5 g/l nguồn nitơ + 1,0 g/l KH_2PO_4 + 0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [8]. Các nguồn nitơ sử dụng trong thí nghiệm là: Peptone, cao nấm men, $NaNO_3$ và $(NH_4)_2SO_4$. Loại đường được sử dụng dựa trên kết quả thí nghiệm nguồn carbon.

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh

trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể: Trên cơ sở kết quả của thí nghiệm nguồn carbon, hàm lượng carbon, nitơ tiến hành nghiên cứu sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng ở môi trường có giá trị pH khác nhau là 3, 4, 5, 6, 7 và 8.

Ảnh hưởng của chế độ sục khí đến sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể: Nuôi giống nấm sò vàng với các chế độ sục khí khác nhau: 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 và 0,8 V/V/M. Môi trường nhân giống dịch thể dựa trên kết quả của các thí nghiệm đã tiến hành.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể: Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng ở 24, 48, 72, 96 và 120 h. Môi trường nhân giống dịch thể dựa trên kết quả của các thí nghiệm đã tiến hành.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn giống tới sinh trưởng và phát triển của giống nấm sò vàng trong giai đoạn nuôi trồng: Hai nguồn giống sử dụng gồm giống dịch thể và giống truyền thống (giống được sinh trưởng trên môi trường 99% thóc hạt + 1% bột nhẹ). Giá thể được sử dụng để nuôi trồng nấm sò vàng là 47% mùn cưa + 47% rơm băm + 3% cám gạo + 2% cám ngô + 1% $CaCO_3$.

Theo dõi đặc điểm sinh trưởng phát triển hệ sợi trong môi trường nhân giống dịch thể:

- Khuẩn lạc cầu (KLC): Là một dạng của sản phẩm lên men hệ sợi nấm trong môi trường dịch thể. Là kết quả của sự xoắn cuộn, liên kết hệ sợi lại với nhau tạo thành hạt có dạng hình cầu [9]. Mật độ KLC là số KLC có trong 10 ml dịch giống.

- Đường kính KLC: Sử dụng kính hiển vi Optika để xác định đường kính KLC. Đơn vị tính là mm.

- Sinh khối sợi: Xác định sinh khối theo phương pháp của Park và cs (2001) [10], mẫu được ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 15 phút, lọc bằng màng milipore 0,45 μm . Mẫu được rửa 4 lần với ethanol bão hòa, bảo quản qua đêm ở 4°C. Khối lượng sợi khô được xác định sau khi rửa KLC với nước cất và sấy ở 70°C qua đêm đến khối lượng không đổi. Kết thúc quá trình nuôi sợi, ly tâm dịch giống, cân khối lượng hệ sợi thu được. Đơn vị tính: g/l dịch giống.

Theo dõi đặc điểm sinh trưởng phát triển quả thể trong giai đoạn nhân nuôi trồng:

- Tốc độ phát triển của hệ sợi: Được tính trong thời gian hệ sợi phát triển kín toàn bộ cơ chất nuôi trồng. Đơn vị tính: mm/ngày.

- Mật độ hệ sợi: Quan sát và đánh giá mật độ hệ sợi nấm trên cơ chất nuôi trồng theo Kadiri và cs (1998) [11].

- Thời gian hình thành quả thể: Là thời gian được tính từ khi cấy giống đến khi nấm quả thể nấm bắt đầu xuất hiện. Đơn vị tính là ngày.

- Khối lượng quả thể: Là khối lượng trung bình của quả thể nấm tươi thu được trên một đơn vị nguyên liệu đầu vào. Đơn vị tính là gram.

- Năng suất nấm tươi: Là khối lượng nấm tươi thu được khi nuôi trồng trên 1 tấn nguyên liệu khô. Đơn vị tính là kg/tấn nguyên liệu khô.

Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê Excel 2010 và IRRISTAT 5.0, Graphpad Prism 5.0.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của nguồn carbon và hàm lượng carbon đến sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể

Sinh trưởng hệ sợi nấm trong môi trường dịch thể yêu cầu các điều kiện về dinh dưỡng, nhiệt độ, ánh sáng và nồng độ oxy. Trong đó, dinh dưỡng luôn là yếu tố được quan tâm đầu tiên, đặc biệt là nguồn dinh dưỡng carbon và nitơ. Theo Vladimir (2012) [5], carbon là thành phần chủ yếu trong môi trường dinh dưỡng, đảm bảo sự sinh trưởng và tổng hợp các hoạt chất sinh học của vi sinh vật.

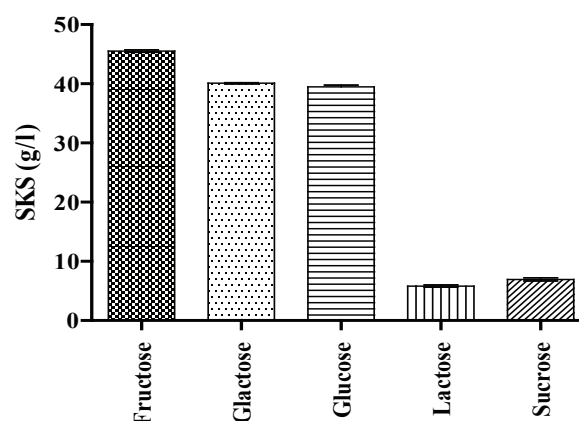
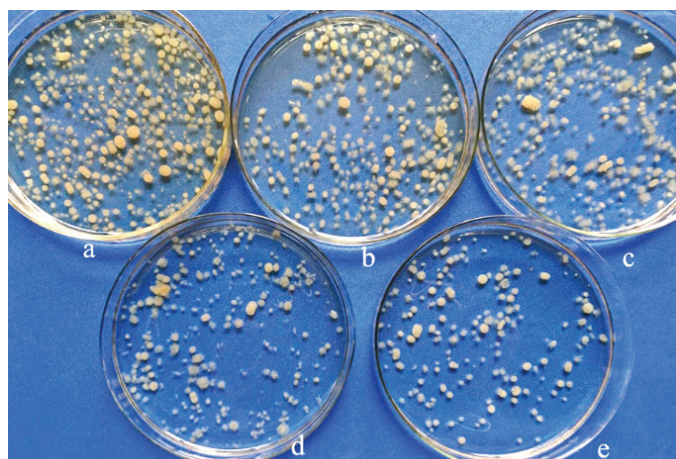
Với 5 nguồn carbon khảo sát, nấm sò vàng sinh trưởng mạnh nhất trong môi trường có sử dụng fructose (hình 1). Mật độ KLC đạt > 90 KLC/10 ml, sinh khối sợi nấm đạt 45,52 g/l dịch giống. Sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng chậm nhất ở môi trường sử dụng lactose và sucrose. Sinh khối

sợi nấm chỉ đạt 5,83-6,95 g/l dịch giống, mật độ KLC < 60 KLC/10 ml. Không có sự khác biệt rõ rệt về kích thước KLC ở các công thức thí nghiệm. Do đó, nguồn cung cấp carbon tối ưu cho nhân giống nấm sò vàng dịch thể là fructose. Đã có nhiều công bố khoa học về nguồn carbon tối ưu cho sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể. Theo Wang và cs (2005), Qian và cs (2002) [2, 6], nguồn carbon phù hợp nhất là glucose. Kết quả nghiên cứu của Wu và cs (2008) [7] cho thấy, fructose là nguồn carbon tốt nhất để nấm sò vàng cho sinh khối cao. Sự khác biệt về nguồn carbon tối ưu giữa các nghiên cứu có thể giải thích do sự khác nhau về đối tượng nghiên cứu, điều kiện thí nghiệm.

Ở một giới hạn nào đó, sinh khối sợi nấm sò vàng sẽ tăng dần khi tăng hàm lượng đường bổ sung. Sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường dịch thể tăng dần khi tăng hàm lượng đường fructose từ 5 đến 20 g/l. Hàm lượng fructose tối ưu là 20 g/l với sinh khối sợi nấm đạt 44,98 g/l dịch giống, số lượng KLC nhiều. Sinh khối sợi nấm có xu hướng giảm xuống khi hàm lượng đường trong môi trường dịch thể là 25 g/l (hình 2). Nguyên nhân có thể là hàm lượng đường tăng làm mất cân đối giữa tỷ C/N trong môi trường dịch [5].

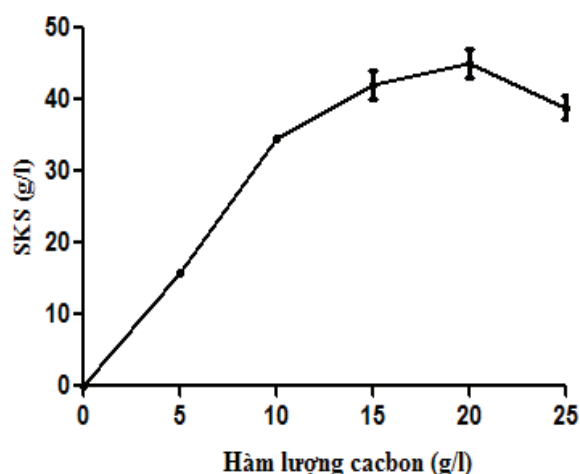
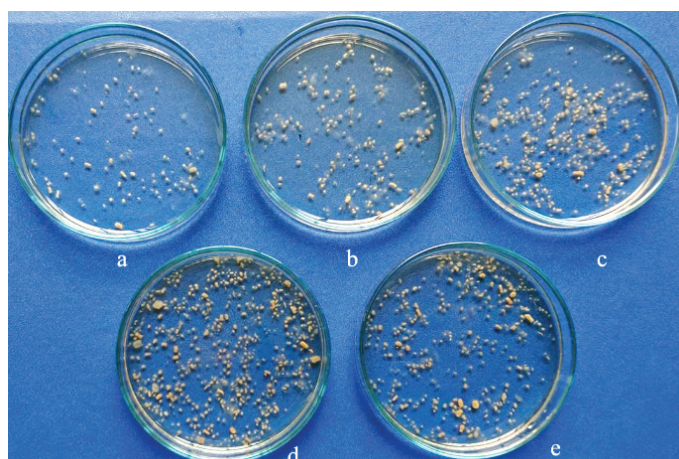
Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể

Nitơ là nhân tố thiết yếu trong sinh tổng hợp enzyme [12], protein, nucleic acid, purine, pyrimidine và polysaccharide [13, 14]. Trong nhân giống dịch thể, nitơ có thể được bổ sung vào môi trường nhân giống dưới dạng ammonium, nitrate ion hoặc hữu cơ (như amino acid, protein). Cao nấm men và peptone thường được sử dụng để làm nguồn cung cấp nitrogen với nồng độ từ 1 đến 5 g/l [5]. Mục tiêu của



Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể.

a: Fructose; b: Glactose; c: Glucose; d: Lactose; e: Sucrose.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ carbon đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể.
a: 5 g/l; b: 10 g/l; c: 15 g/l; d: 20 g/l; e: 25 g/l.

thí nghiệm nhằm tìm ra nguồn nitơ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể.

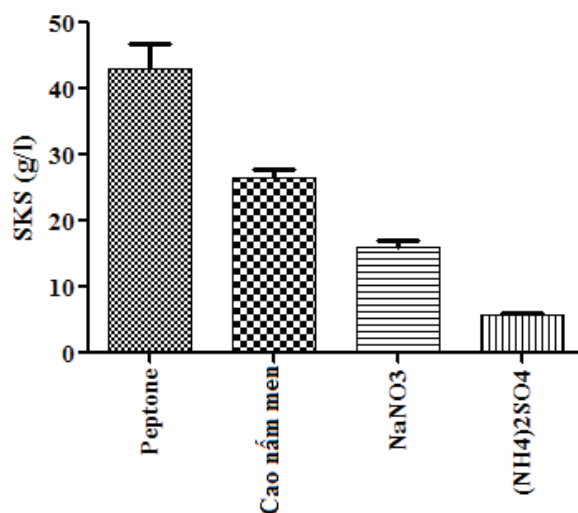
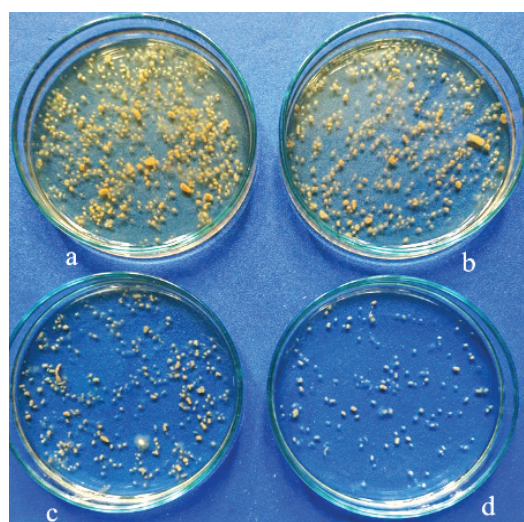
Trong 4 nguồn nitơ khảo sát, sinh khối sợi nấm đạt cao nhất ở môi trường dinh dưỡng sử dụng peptone (45,28 g/l dịch giống). Các nguồn dinh dưỡng nitơ từ hợp chất vô cơ không có hiệu quả trong nhân giống dịch thể nấm sò vàng (hình 3). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Wang và cs (2005) [2].

Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể

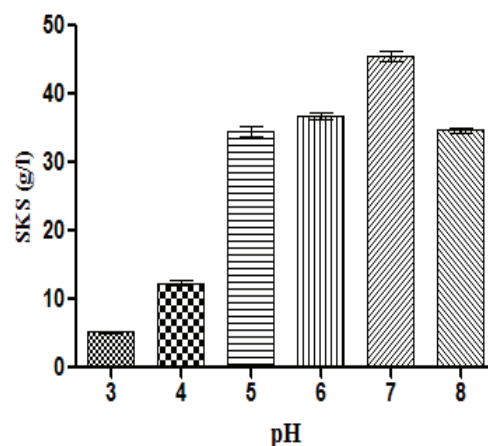
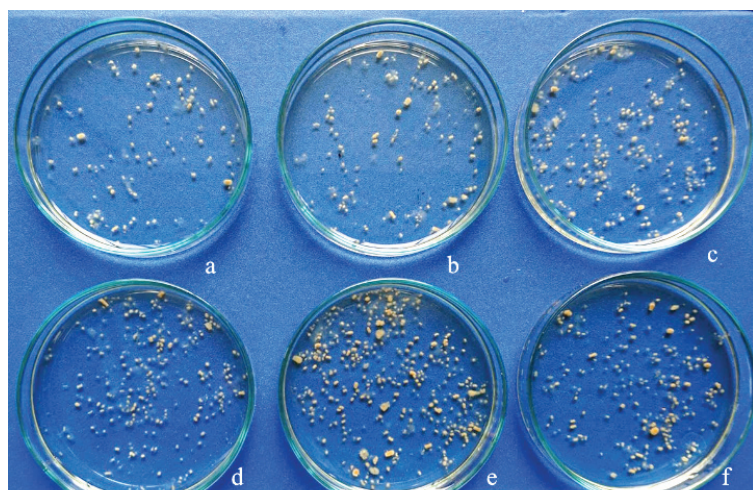
Một trong những nhân tố chính ảnh hưởng đến quá trình

sinh tổng hợp của nấm trong nhân giống dịch thể là pH. pH liên quan trực tiếp đến chức năng của màng tế bào, khả năng hấp phụ dinh dưỡng, hình thái và cấu trúc tế bào, độ tan chất khoáng, hoạt tính enzyme và sản phẩm sinh tổng hợp [5]. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường nhân giống nhằm tìm ra giá trị pH thích hợp nhất cho sự sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường dịch thể.

Theo Cooke và Whipps (1993) [15], do có khả năng duy trì và cân bằng pH nội bào, ion nên nấm có thể sinh trưởng trong khoảng giá trị pH dao động lớn. Nghiên cứu của Yang và Liao (1998) [16] cho thấy, phần lớn nấm ăn và nấm dược liệu phát triển được ở môi trường pH khởi đầu từ 5 đến 8. Ở giá trị pH thấp có thể giúp môi trường nhân giống dịch



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể.
a: Peptone; b: Cao nấm men; c: NaNO₃; d: (NH₄)₂SO₄.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể.

a: pH = 3; b: pH = 4; c: pH = 5; d: pH = 6; e: pH = 7; f: pH = 8.

thể giảm tỷ lệ nhiễm. Với 6 giá trị pH nghiên cứu cho thấy, nấm sò vàng có thể sinh trưởng thuận lợi ở khoảng pH từ 5 đến 8, sinh khối sợi nấm đạt > 30 g/l dịch giống. Giá trị pH thích hợp nhất là 7,0, khi đó hệ sợi sinh trưởng khỏe, KLC hình thành nhiều, sinh khối sợi nấm lớn nhất 45,54 g/l. Như vậy, giá trị pH tối ưu nhất để nhân giống dịch thể nấm sò vàng là 7,0 (hình 4).

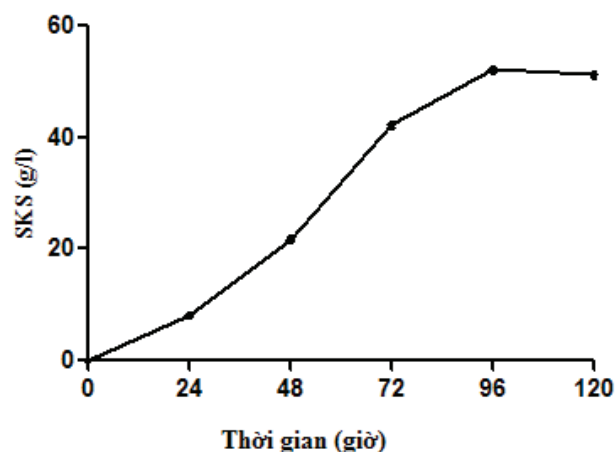
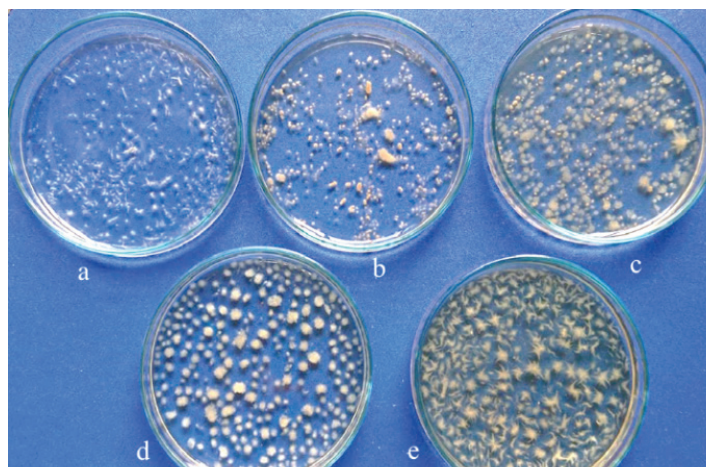
Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể

Trong môi trường nhân giống dịch thể, chu kỳ phát triển của giống nấm trải qua 4 giai đoạn cơ bản, gồm giai đoạn thích nghi (giống thích ứng với môi trường), giai đoạn tăng sinh (mật độ tế bào tăng theo cấp số nhân), giai đoạn ổn

định và giai đoạn suy thoái [17]. Mục tiêu của thí nghiệm nhằm xác định thời gian nuôi giống tối ưu, cho hoạt lực và sinh khối giống tốt nhất. Kết quả cho thấy, thời gian nuôi giống tối ưu nấm sò vàng trong môi trường dịch thể là 96 h với sinh khối sợi đạt 52,23 g/l, mật độ khuẩn lạc dày > 90 KLC/10 ml, sợi liên kết tốt, KLC to. Sau 120 h nuôi cấy, do thiếu hụt nguồn dinh dưỡng, tỷ lệ carbon/nitơ không phù hợp trong môi trường nhân giống, nên sinh khối sợi giảm xuống 51,21 g/l (hình 5).

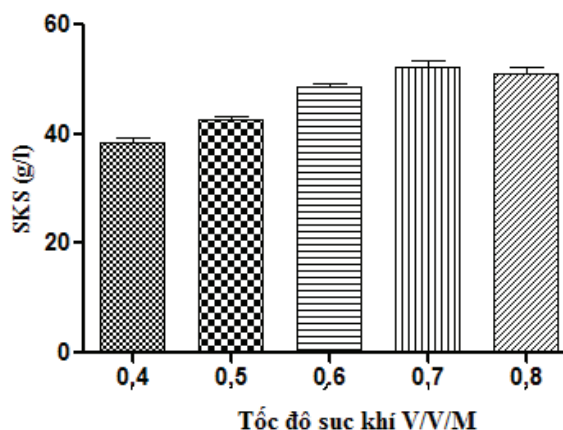
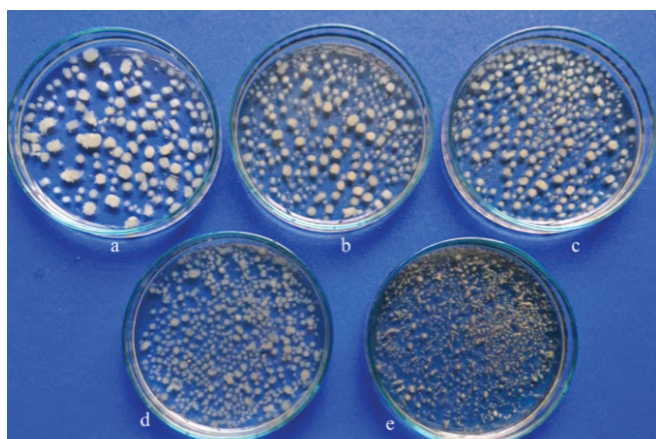
Ảnh hưởng của chế độ sục khí đến sinh trưởng hệ sợi nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể

Để thu được tối đa sinh khối hệ sợi và hoạt lực giống tốt, chế độ sục khí là một trong những nhân tố quan trọng,



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể.

a: 24 h; b: 48 h; c: 72 h; d: 96 h; e: 120 h.



Hình 6. Ảnh hưởng của tốc độ sục khí đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể.

a: 0,4 V/V/M; b: 0,5 V/V/M; c: 0,6 V/V/M; d: 0,7 V/V/M; e: 0,8 V/V/M.

cần được tối ưu hóa. Nếu chế độ sục khí được tối ưu, môi trường có thể cung cấp đầy đủ nồng độ oxy hòa tan cho nấm phát triển, duy trì được nồng độ gradient nội bào và ngoại bào. Trong trường hợp, chế độ sục khí quá mạnh có thể gây hư hại đến sự phát triển của hệ sợi, ảnh hưởng đến hoạt lực và sinh khối giống. Chế độ sục khí tối ưu cần đảm bảo cân bằng giữa nồng độ oxy được hòa tan trong môi trường và mức độ dịch chuyển của sợi nấm trong môi trường nhân giống [5]. Trong thí nghiệm này, 5 mức độ cấp khí được chúng tôi đánh giá gồm: 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 và 0,8 V/V/M. Ở mức độ cấp khí 0,7 V/V/M sinh khối hệ sợi đạt cao nhất với 52,28 g/l; mật độ KLC dày (hình 6).

Ảnh hưởng của nguồn giống tới sinh trưởng và phát triển của giống nấm sò vàng trong giai đoạn nuôi trồng

Đã có nhiều nghiên cứu so sánh ưu nhược điểm giữa công nghệ nhân giống dịch thể và công nghệ nhân giống thể rắn truyền thống. Theo Kawai và cs (1995) [18], ứng dụng nhân giống dịch thể trong nuôi trồng nấm hương *Lentinula edodes* giúp giảm thời gian ủ sợi 30 ngày. Giống dịch thể có tốc độ sinh trưởng nhanh hơn, rút ngắn giai đoạn

sinh trưởng sinh dưỡng hệ sợi [19]. Công nghệ nhân giống truyền thống thường dùng dạng hạt (lúa hoặc kê) làm cơ chất. Một trong những nhược điểm của công nghệ nhân giống truyền thống là thời gian ương sợi kéo dài, tỷ lệ nhiễm cao do hạt (lúa hoặc kê) dễ bị nhiễm nấm bệnh, khó có thể khử trùng bào tử nấm bệnh bằng phương pháp hấp thụ công thông thường [20].

Trong thí nghiệm này, chúng tôi so sánh việc sử dụng giống thể rắn và giống dịch thể trong nuôi trồng nấm sò vàng. Kết quả thu được cho thấy, sử dụng giống dịch thể mang lại hiệu quả cao hơn do rút ngắn thời gian sinh trưởng hệ sợi (4-5 ngày), tỷ lệ nhiễm giảm (1,5%). Hệ sợi phát triển đồng đều, màu trắng đồng nhất trên cơ chất nuôi trồng. Kết thúc giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng, hệ sợi nấm chuyển sang giai đoạn hình thành và phát triển quả thể. Các chỉ tiêu như thời gian hình thành quả thể, khối lượng quả thể nấm và năng suất nấm, là các chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng sinh trưởng của nấm sò vàng. Kết quả cho thấy, thời gian hình thành quả thể nấm ngắn hơn. Tuy nhiên, năng suất nấm ở hai công thức thí nghiệm không có sự khác biệt rõ rệt về mặt thống kê (bảng 1 và hình 7).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nguồn giống đến sinh trưởng, khả năng hình thành và phát triển quả thể của giống nấm sò vàng.

Nguồn giống	Mật độ hệ sợi	Thời gian hệ sợi mọc kín giá thể (ngày)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Thời gian hình thành quả thể (ngày)	Số cụm nấm/ bịch giá thể (cụm)	Khối lượng cụm nấm (g)	Năng suất nấm (kg)
Giống thể rắn	+++++	22,5	5,5	37,8	9,8	36,7	360,1
Giống dịch thể	+++++	18,5	4,0	33,1	9,2	40,5	372,6
<i>LSD</i> _{0,05}		1,1				1,89	53,59
<i>CV%</i>		3,2				3,1	10,5

+++++: Hệ sợi phát triển kín giá thể, có màu trắng đồng nhất.



(a)



(b)

Hình 7. Nuôi trồng nấm sò vàng bằng giống dịch thể (a) và giống dạng hạt (b).

Kết luận

Các nhân tố nguồn carbon, hàm lượng carbon, nguồn nitơ, pH, chế độ sục khí có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng của nấm sò vàng trong môi trường nhân giống dịch thể. Môi trường tối ưu để nhân giống nấm sò vàng là: 20 g/l fructose + 5 g/l pepton + 1,0 g/l KH_2PO_4 + 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH = 7,0 trong 96 h với tốc độ sục khí 0,7 V/V/M. Sử dụng giống dịch thể có ý nghĩa trong nuôi trồng, giúp giảm thời gian sinh trưởng hệ sợi (4-5 ngày), tỷ lệ nhiễm giảm (1,5%), thời gian hình thành quả thể ngắn hơn (3-4 ngày) nhưng không có sự khác biệt rõ rệt về năng suất so với công nghệ nhân giống truyền thống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trịnh Tam Kiệt (2012), *Nấm lớn ở Việt Nam*, tập 2, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và công nghệ, Hà Nội.
- [2] J. Wang, S. Hu, Z. Liang, Ch. Yeh (2005), "Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, pp.759-766.
- [3] S. Rushita, et al. (2013), "Effect of *Pleurotus citrinopileatus* on blood glucose, insulin and catalase of streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus rats", *Journal of Animal and Plant Sciences*, **23(6)**, pp.1566-1571.
- [4] F. Musieba, et al. (2013), "Proximate composition, amino acids and vitamins profile of *Pleurotus citrinopileatus* Singer: An indigenous Mushroom in Kenya", *American Journal of Food Technology*, **8(3)**, pp.200-206.
- [5] Vladimir Elisashvili (2012), "Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **14(3)**, pp.211-239.
- [6] W. Qian, Y. Leilei, W. Yongli, Z. Yongjian (2002), "Submerged culture and related nutrient solution determination of *Pleurotus citrinopileatus*", *Europe PMC*, **21(1)**, pp.102-106.
- [7] C.Y. Wu, Z.C. Liang, C.P. Lu, S.H. Wu (2008), "Effect of carbon and nitrogen sources on the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of *Pleurotus citrinopileatus*", *Journal of Food and Drug Analysis*, **16(2)**, pp.62-67.
- [8] Z.C. Liang, C.Y. Wu, J.C. Wang (2005), "The evaluation of using mushroom sawdust wastes for cultivation of *Pleurotus citrinopileatus*", *Fung. Sci.*, **20(1-2)**, pp.27-34.
- [9] Nguyễn Thị Bích Thùy (2014), *Nghiên cứu một số đặc tính sinh học và công nghệ thích hợp để nhân giống và nuôi trồng một số loại nấm ăn và nấm dược liệu ở Việt Nam*, Luận án tiến sĩ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- [10] J.P. Park, S. Kim, H.J. Hwang, J.W. Yun (2001), "Optimization of submerged culture conditions for the mycelia growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*", *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, **33**, pp.76-81.
- [11] M. Kadiri (1998), "Spawn and fruit body production of *Pleurotus sajor-caju* in Abeokuta Nigeria", *Nigerian Journal of Botany*, **11**, pp.125-131.
- [12] M.P. Singh, V.K. Pandey, A.K. Pandey, A.K. Srivastava, N.K. Vishwakarm, V.K. Singh (2008), "Production of xylanase by white rot fungi on wheat straw", *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.*, **4**, pp.859-862.
- [13] N. Abdullah, C.C. Lau, S.M. Ismail (2015), "Potential use of *Lentinus squarrosulus* mushroom as fermenting agent and source of natural antioxidant additive in livestock feed", *J. Sci. Food Agric.*, **96(5)**, pp.1459-1466.
- [14] L.A. Drozdowski, et al. (2010), "β-Glucan extracts inhibit the in vitro intestinal uptake of long-chain fatty acids and cholesterol and down-regulate genes involved in lipogenesis and lipid transport in rats", *J. Nutr. Biochem.*, **21**, pp.695-701.
- [15] R.C. Cooke, J.M. Whipps (1993), *Ecophysiology of Fungi*, Blackwell Scientific Publications.
- [16] F.C. Yang, C.B. Liao (1998), "Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures", *Bioprocess Eng.*, **19**, pp.233-236.
- [17] Ngô Xuân Nghiễn, Nguyễn Thị Bích Thùy (2016), "Nghiên cứu nhân giống nấm chân dài *Clitocybe maxima* (Gartn. ex Mey.:Fr.) Quél. dạng dịch thể", *Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt Nam*, **14(11)**, tr.1817-1824.
- [18] G. Kawai, H. Kobayashi, Y. Fukushima (1995), "Liquid cultures induce early fruiting in shiitake (*Lentinus edodes*)", *Mushroom Sci.*, **14**, pp.825-832.
- [19] H. Yang, G. He (2008), "Influence of nutritional conditions on exopolysaccharide production by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiiraia bambusicola*", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, pp.2903-2909.
- [20] N. Abdullah, R. Ismail, N. Johari, M. Annuar (2013), "Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust", *Scientia Horticulturae*, **161**, pp.65-69.

Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên

Nguyễn Thị Thanh Mai¹, Chu Đức Hà², Phạm Phương Thu³, Nguyễn Văn Giang^{1*}

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

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

³Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

Ngày nhận bài 24/11/2017; ngày chuyển phản biện 30/11/2017; ngày nhận phản biện 17/1/2018; ngày chấp nhận đăng 9/2/2018

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu này là tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân giải lân (P) và kali (K) khó tan trong đất trồng cây công nghiệp. Từ đất vùng rễ cây cà phê trồng tại khu vực Tây Nguyên, 16 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải P và K khó tan đã được phân lập, trong đó, đã xác định được chủng vi khuẩn CF19 có hoạt tính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cao nhất, đạt 145,55 mg/l PO_4^{3-} . Chủng vi khuẩn CF19 đồng thời có khả năng hòa tan AlPO_4 và $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Khuẩn lạc của chủng CF19 có dạng tròn, bề mặt lồi, trơn, bóng ướt, màu trắng ngà, tế bào dạng que (trực khuẩn), Gram dương và có khả năng di động. Chủng CF19 sinh enzyme catalase, siderophore và biểu hiện hoạt tính phân giải P mạnh nhất khi môi trường nuôi cấy được bổ sung đường glucose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và cao nấm men. Trong môi trường phân giải P chứa 10% NaCl, chủng CF19 vẫn thể hiện được hoạt tính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Chủng CF19 có khả năng tổng hợp IAA kích thích sinh trưởng thực vật. Hàm lượng IAA sau 4 ngày nuôi cấy CF19 trong môi trường NBRIP có bổ sung L-Tryptophan đạt 68,79 $\mu\text{g/ml}$. Chủng CF19 có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh héo vàng *Fusarium oxysporum*.

Từ khóa: Chất kích thích sinh trưởng thực vật, đất trồng cà phê, phân giải kali, phân giải lân, phân lập, vi khuẩn.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Hiện nay, đất trồng cây công nghiệp lâu năm ở Việt Nam đang gặp phải hiện tượng thoái hóa và bạc màu. Để tăng độ phì nhiêu của đất, người nông dân thường bón phân N-P-K. Tuy nhiên, hầu hết phân bón thường bị rửa trôi hoặc tồn tại trong đất ở dạng khó tiêu do liên kết với ion kim loại (Ca^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3}). Các nghiên cứu trước đây đã ghi nhận nhiều nhóm vi sinh vật, như nấm *Aspergillus* và *Penicillium* [1], vi khuẩn *Bacillus* và *Pseudomonas* [2, 3], có khả năng tiết một số enzym hay axit hữu cơ, từ đó phân giải và chuyển hóa P và K thành dạng dễ tan, giúp rễ cây hấp thụ. Bên cạnh đó, một số nhóm vi khuẩn còn có khả năng sinh tổng hợp các chất kích thích sinh trưởng thực vật, như Indole-3-acetic acid (IAA). Vì thế, bổ sung nguồn vi sinh vật phân giải P và K khó tan trong đất được xem là một giải pháp hữu hiệu và thân thiện với môi trường, đồng thời làm tăng hiệu quả sử dụng phân bón.

Hiện nay, đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên được ghi nhận chủ yếu là dạng đất đỏ, tích sét và đất đỏ, kết vón ít. Nhìn chung, đây là loại đất giàu P tổng số nhưng ít P dễ tiêu, K tổng số nghèo và nghèo bazơ, có độ chua nhất định (pH 4,5-5,3) [4]. Nhằm phát triển cà phê và các cây công

nghiệp lâu năm nói chung một cách lâu dài và bền vững, cần thiết phải tìm kiếm và phân lập các chủng vi sinh vật phân giải P và K khó tan để cung cấp vào đất trồng song song với việc sử dụng phân bón [5-7]. Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích phân lập, tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng phân giải P và K khó tan từ đất vùng rễ cây cà phê trồng tại một số vùng thuộc khu vực Tây Nguyên. Kết quả của nghiên cứu này nhằm xem xét khả năng thích ứng của chủng vi khuẩn phân lập với đất trồng cà phê tại Tây Nguyên, qua đó đề xuất làm chủng giống vi sinh vật hữu ích trong sản xuất phân bón vi sinh, góp phần cải thiện đất trồng cà phê.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu đất ở độ sâu 10-20 cm xung quanh rễ cây cà phê Arabica được thu thập tại huyện Cư Kuin, Krông Buk, Krông Năng và TP Buôn Mê Thuột vào tháng 4-5/2016 (mùa khô). Các địa điểm này nằm trong khu vực tọa độ 12°42'57"B-108°00'46"E.

Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu đất thu tại vùng rễ trồng cà phê được pha loãng

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

Isolation, selection of phosphate and potassium solubilising rhizosphere bacteria from coffee cultivated soil of the Central Highlands

Thi Thanh Mai Nguyen¹, Duc Ha Chu²,
Phuong Thu Pham³, Van Giang Nguyen^{1*}

¹Vietnam National University of Agriculture

²Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

³Hanoi Pedagogical University 2

Received 24 November 2017; accepted 9 February 2018

Abstract:

In this study, 16 phosphate (P) and potassium (K) solubilising bacterial strains were isolated from the rhizosphere of coffee trees cultivated in the Central Highlands. Among them, 'CF19' strain was determined to exhibit the highest phosphate solubilisation (145.55 mg/l PO_4^{3-}). This strain also showed an ability to solubilise two phosphate types, AlPO_4 and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. The typical colonies of 'CF19' strain were recorded to have circular, concave, sleek and wet surface with white colour. This strain has the ability to produce catalase enzyme and siderophore. 'CF19' strain showed the highest phosphate solubilisation on the medium with glucose (C resource), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and yeast extract (N resources). This strain could grow in the medium pH 4-5, and salt resistance up to 10%. CF19 could synthesise plant regulator IAA. After 4 days of culture on NBRIP medium containing L-Tryptophan, the maximum amount of IAA approximately reached 68.79 $\mu\text{g/ml}$. This strain also showed the antagonistic activity against *Fusarium oxysporum*.

Keywords: bacteria, coffee cultivated soil, isolation, phosphate solubilization, plant regulator, potassium solubilization.

Classification number: 4.1

ở nồng độ 10^{-5} , sau đó nuôi cấy trên môi trường NBRIP chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và Aleksandrov chứa KAlSi_2O_6 khó tan [8, 9]. Khuẩn lạc có hoạt tính được lựa chọn sau 5 ngày nuôi cấy ở 30°C bằng cách xác định vòng phân giải (vòng sáng quanh khuẩn lạc).

Hình thái và một số đặc tính cơ bản, bao gồm phản ứng với catalase, đồ methyl, khả năng biến dưỡng citrate và khả năng di động của vi khuẩn được tiến hành phân tích theo các phương pháp của Vũ Thị Minh Đức (2001) [10]. Khả năng sinh siderophore của vi khuẩn được tiến hành dựa theo phương pháp O-CAS trên môi trường có bổ sung CAS [11].

Hoạt tính phân giải P khó tan được xác định dựa trên nồng độ PO_4^{3-} có trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp so màu xanh molybdate [10]. Chủng vi khuẩn được nuôi trong bình tam giác chứa 25 ml môi trường NBRIP lỏng ($t^\circ = 30^\circ\text{C}$, $t = 4$ ngày, lắc 150 rpm). Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 10.000 rpm, $t = 10$ phút, $t^\circ = 4^\circ\text{C}$. Hút 1 ml dịch nổi bổ sung 0,2 ml $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 2,5% và SnCl_2 2,5% đem xử lý và so màu ở bước sóng $\lambda = 820$ nm.

Nuôi cấy vi khuẩn tuyển chọn trong môi trường phân giải P lỏng, trong đó nguồn C được sử dụng lần lượt là glucose, fructose, xylose, maltose, manitose, lactose, sucrose và dextrin, nguồn N được sử dụng lần lượt là $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , KNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , pepton, cao nấm men, pH được thay đổi từ 4÷10, nồng độ muối được bổ sung ở dải nồng độ 0÷10% trên máy lắc với tốc độ lắc 150 rpm, xác định hàm lượng P tan trong môi trường sau 4 ngày theo phương pháp của Vũ Thị Minh Đức nêu trên [10].

Sự có mặt của IAA được phát hiện bằng thuốc thử Salkowski [10]. Định lượng tương đối IAA được xác định và phân tích bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang ở bước sóng $\lambda = 530$ nm trên máy quang phổ với thuốc thử Salkowski (FeCl_3 0,5M, H_2SO_4 98%, H_2O) [10].

Khả năng đối kháng nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng được thực hiện bằng phương pháp đồng nuôi cấy [10]. Trong đó, chủng *F. oxysporum* được thu thập từ Trung tâm Nghiên cứu bệnh cây nhiệt đới thuộc Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Nấm bệnh cùng chủng vi khuẩn được cấy trên môi trường PDA. Đĩa nuôi cấy được nuôi trong điều kiện 30°C. Quan sát khả năng đối kháng sau 7 ngày nuôi cấy [10].

Kết quả và thảo luận

Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phân giải P, K khó tan

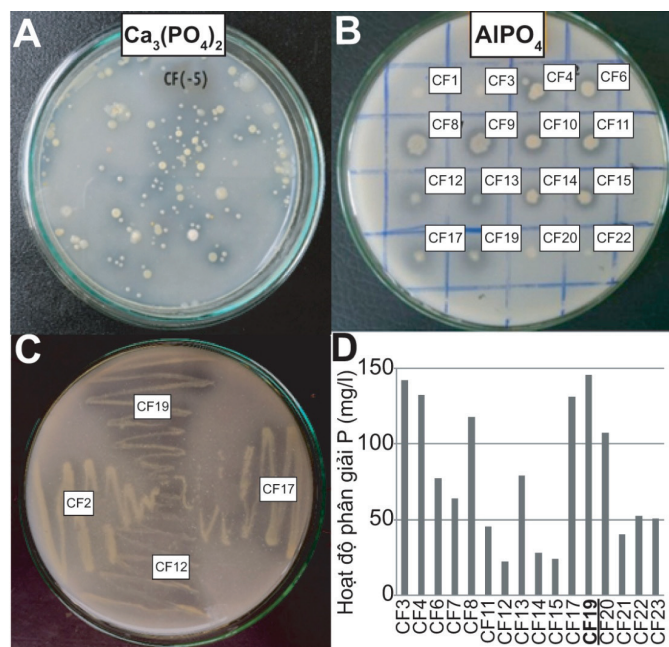
Kết quả đã phân lập được 25 chủng vi sinh vật, đặt tên từ CF1 đến CF25 có khả năng tạo các vòng phân giải P trên môi trường NBRIP chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ khó tan, trong đó 16 chủng có đường kính vòng phân giải lớn nhất. Hiện

tượng này được giải thích do các chủng này có khả năng tiết một số dạng axit hữu cơ, như axit citric, axit lactic hay axit succinic, phân giải gốc PO_4^{3-} khó tan [1].

Theo ghi nhận gần đây, đất đỏ bazan trồng cà phê chứa nhiều muối Al^{3+} và Fe^{3+} [4]. Để tăng hiệu quả phân giải các nhóm P khó tan, 16 chủng vi sinh vật có vòng phân giải P lớn nhất được tiếp tục đánh giá khả năng phân giải photphat nhôm, sắt trên môi trường NBRIP được bổ sung AlPO_4 và FePO_4 . Kết quả cho thấy, ngoài 4 chủng ký hiệu CF1, CF3, CF20 và CF22 không tạo vòng phân giải trên môi trường chứa AlPO_4 , các chủng còn lại đều có khả năng tạo vòng phân giải trên môi trường chứa AlPO_4 và FePO_4 , trong đó 4 chủng CF12, CF13, CF17 và CF19 được ghi nhận có vòng phân giải lớn nhất.

Kết quả định lượng PO_4^{3-} bằng phương pháp xanh molybdate [12] cho thấy, 6 chủng có khả năng phân giải P cao nhất là CF19 (145,55 mg/l), CF3 (142,55 mg/l), CF4 (132,6 mg/l), CF17 (131,23 mg/l), CF8 (117,85 mg/l) và CF20 (107,25 mg/l) (hình 1D). Năm 2017, Trần Bảo Trâm và cộng sự [13] đã phân lập được 7 chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải P khó tan từ đất trồng sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam với hoạt tính dao động từ 57,81 đến 118,40 mg/l PO_4^{3-} . Hoạt tính phân giải P khó tan của các chủng vi khuẩn được phân lập từ đất trồng cà phê tương đương và cao hơn.

Trên môi trường Aleksandrov chứa KAlSi_2O_6 sau 5 ngày nuôi cấy, 16 trong tổng số 25 (chiếm 64%) chủng vi sinh vật phân lập đã tạo được vòng phân giải K, trong đó chủng CF19 cũng có khả năng phân giải K khá mạnh (hình 1C).

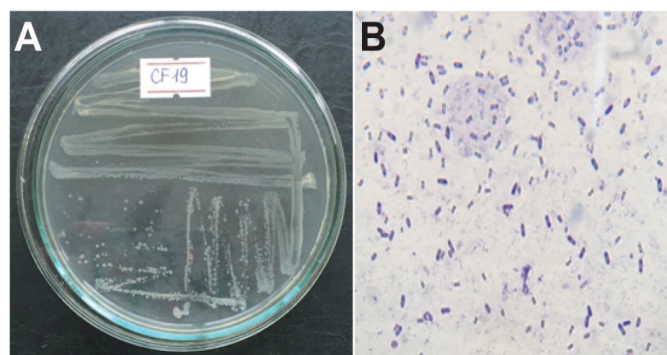


Hình 1. Khả năng phân giải P và K khó tan của một số chủng vi sinh vật trên môi trường chứa (A) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (B) AlPO_4 , (C) KAlSi_2O_6 . (D) Hoạt độ phân giải P của các chủng vi sinh vật.

Từ các kết quả nghiên cứu nêu trên, chủng CF19 có hoạt tính phân giải P, K mạnh nhất được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào và đặc tính sinh học của chủng CF19

Hình thái khuẩn lạc và hình dạng tế bào của chủng CF19 được quan sát theo các phương pháp của Vũ Thị Minh Đức (2001) [10]. Kết quả cho thấy, khuẩn lạc của CF19 tròn đều, bề mặt lõm, trơn, bóng ướt, màu trắng ngà. Một số báo cáo cũng đã ghi nhận về hình dạng khuẩn lạc của các vi khuẩn hòa tan P và K tương tự như trong nghiên cứu này [6, 7]. Quan sát dưới kính hiển vi, CF19 có dạng hình que ngắn (trực khuẩn), kích thước khoảng $0,5 \times 1,5 \mu\text{m}$, là vi khuẩn Gram dương (hình 2B).

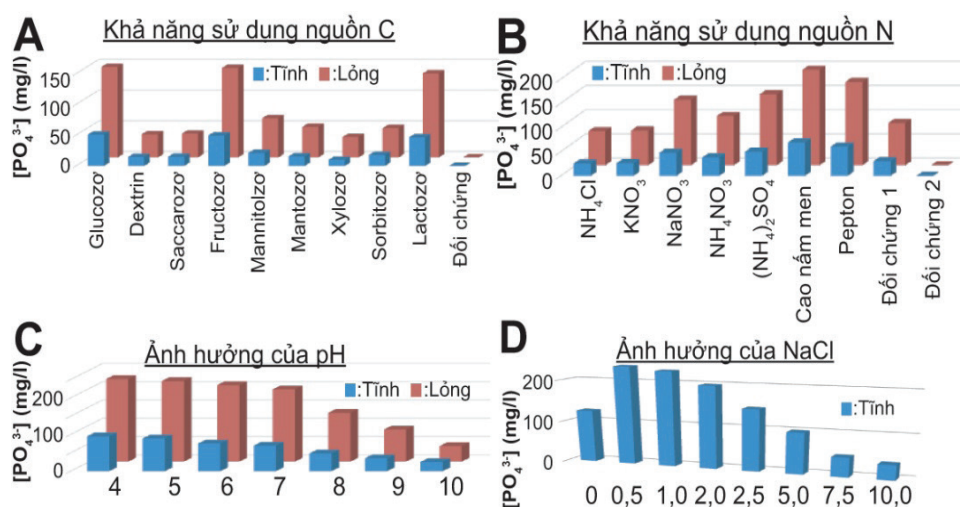


Hình 2. Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào (B) của chủng vi khuẩn CF19.

Một số đặc tính sinh học cơ bản của vi khuẩn CF19 được nghiên cứu và xác định chủng CF19 có khả năng tổng hợp enzyme catalase để phân giải H_2O_2 , sử dụng citrate, tiết acid (phản ứng với đỏ methyl), đặc biệt là sinh siderophore - chất vận chuyển sắt rất cần thiết khi cây trồng sinh trưởng tại các vùng đất nghèo dinh dưỡng. Chủng khuẩn CF19 có thể di động nhưng không có khả năng sinh acetoin (tiền chất của 2,3-butanediol). Các đặc tính này cũng được ghi nhận tương tự với một số vi sinh vật phân giải P khó tan đã phân lập từ đất vùng rẫy trồng sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam [13].

Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng phân giải P của chủng CF19

Để đánh giá hiệu quả phân giải P của chủng CF19, một số điều kiện nuôi cấy đã được thay đổi để theo dõi hàm lượng PO_4^{3-} được giải phóng vào môi trường. Các điều kiện về nguồn dinh dưỡng C, N, yếu tố pH, nồng độ muối lần lượt được thử nghiệm trong điều kiện nuôi tĩnh và lắc. Kết quả đánh giá khả năng phân giải P của CF19 trong từng điều kiện được minh họa ở hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy, bao gồm (A) nguồn C, (B) nguồn N, (C) giá trị pH và (D) muối NaCl đến hoạt tính phân giải P của chủng CF19.

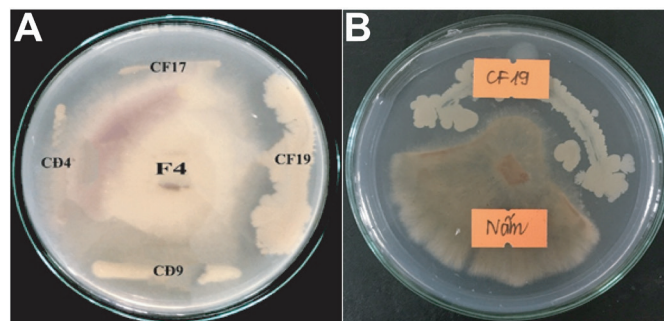
Hoạt tính phân giải P của chủng CF19 trong 2 điều kiện nuôi tĩnh và lắc đều thể hiện mạnh nhất trong công thức môi trường có bổ sung glucose (nuôi lắc đạt 147,32 mg/l PO_4^{3-} , tĩnh đạt 51,1 mg/l PO_4^{3-}), fructose (nuôi lắc và tĩnh lần lượt đạt 145,64 và 49,54 mg/l PO_4^{3-}) và lactose (nuôi lỏng đạt 136,63 mg/l PO_4^{3-} trong khi ở trạng thái tĩnh đạt 46,54 mg/l PO_4^{3-}) (hình 3A). Khi trong môi trường có nguồn N vô cơ dễ hấp thụ có gốc NO_3^- và NH_4^+ , như là NaNO_3 , NH_4NO_3 hay $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, chủng CF19 có hoạt tính phân giải P khó tan khá tốt. Cao nấm men được ghi nhận là nguồn N hữu cơ cho hiệu quả phân giải P cao nhất đối với chủng vi khuẩn CF19 (hình 3B).

Hoạt tính phân giải P được ghi nhận mạnh nhất ở pH đạt giá trị 4 trong điều kiện nuôi cấy tĩnh (tương ứng 95,15 mg/l PO_4^{3-}) và nuôi cấy lỏng (tương ứng 225,45 mg/l PO_4^{3-}) (hình 3C). Điều này rất thích hợp cho điều kiện đất trồng cà phê ở Tây Nguyên nói chung như đã được đề cập trong nghiên cứu trước đây [4]. Liên quan đến ảnh hưởng của nồng độ muối, chủng CF19 có hoạt độ phân giải P khó tan mạnh trên môi trường có bổ sung NaCl ở ngưỡng 0,5÷2,5%. Đáng chú ý, khả năng phân giải P của chủng CF19 vẫn được ghi nhận trên công thức môi trường có bổ sung 10% muối (hình 3D). Đặc tính này cho thấy chủng CF19 có khả năng chịu mặn khá tốt, thích hợp với sự thoái hóa và bạc màu đang xảy ra tại những vùng trồng cây công nghiệp lâu năm ở Việt Nam. Kết quả này hứa hẹn chủng CF19 sẽ là đối tượng tiềm năng trong việc sản xuất phân bón vi sinh tại các vùng canh tác hiện nay.

Khả năng tổng hợp IAA và đối kháng nấm *F. oxysporum* của chủng CF19

Khả năng sinh tổng hợp IAA là một trong những đặc tính quý của vi khuẩn sử dụng trong sản xuất phân bón vi sinh

vật. Kết quả xác định khả năng tổng hợp IAA của chủng CF19 trên môi trường NBRIP có bổ sung *L*-Tryptophan cho dịch ly tâm chuyển sang màu đỏ sau khi thử với dung dịch Salkowski. Hàm lượng IAA sau 4 ngày nuôi cấy đạt 68,79 $\mu\text{g/ml}$.



Hình 4. Khả năng đối kháng nấm gây bệnh *F. oxysporum* của chủng CF19 sau (A) 7 ngày và (B) 14 ngày đồng nuôi cấy.

Kết quả đánh giá khả năng đối kháng với *F. oxysporum* của chủng CF19 cho thấy vi khuẩn tuyển chọn có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của nấm *F. oxysporum* sau 7 ngày (hình 4A) và 14 ngày (hình 4B) đồng nuôi cấy.

Tóm lại, chủng vi khuẩn CF19 phân lập tại đất vùng rễ cây cà phê trồng tại Tây Nguyên vừa có khả năng phân giải các hợp chất P khó tan, đồng thời phân giải K, tổng hợp IAA và đối kháng nấm gây bệnh. Đây được xem là đối tượng có tiềm năng trong sản xuất chế phẩm vi sinh kích thích sinh trưởng thực vật.

Kết luận

Đã phân lập và tuyển chọn được 16 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải P và K khó tan từ đất vùng rễ cây cà phê trồng tại khu vực Tây Nguyên. Trong đó, chủng vi khuẩn

CF19 có hoạt tính phân giải 3 hợp chất P (FePO_4 , AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) và K khó tan cao nhất.

Khuẩn lạc của chủng CF19 tròn đều, bề mặt lõm, trơn, bóng ướt, màu trắng ngà, là trực khuẩn Gram dương. Chủng CF19 có khả năng tổng hợp enzyme catalase, sinh siderophore, có thể di động nhưng không có khả năng sinh acetoin.

Chủng CF19 có hoạt tính phân giải P mạnh nhất khi nguồn C được thay thế là đường glucosơ, nguồn N vô cơ và hữu cơ lần lượt là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và cao nấm men. Chủng CF19 sinh trưởng phát triển tốt ở điều kiện pH 4-5. Chủng này có thể chịu được nồng độ muối NaCl 10%, hoạt tính phân giải mạnh nhất trong môi trường có nồng độ muối dưới 1%.

Chủng CF19 có khả năng sinh tổng hợp IAA kích thích sự sinh trưởng của cây trồng. Lượng IAA thu được sau 4 ngày nuôi cấy đạt khoảng 68,79 $\mu\text{g/ml}$. Chủng CF19 đối kháng mạnh với nấm gây bệnh héo vàng *F. oxysporum*.

Nghiên cứu này sẽ được tiếp tục nhằm tìm hiểu những đặc tính sinh học và định danh chính xác chủng vi khuẩn CF19, từ đó có thể đánh giá hiệu quả phân giải P và K khó tan trong thực tế sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S.B. Sharma, et al. (2013), "Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils", *SpringerPlus*, **2**, p.587, doi: 10.1186/2193-1801-2-587.

[2] I.P. Anjanadevi, N.S. John, K.S. John, M.L. Jeeva, R.S. Misra (2016), "Rock inhabiting potassium solubilizing bacteria from Kerala, India: characterization and possibility in chemical K fertilizer substitution", *J. Basic Microbiol.*, **56**(1), pp.67-77.

[3] Z.S. Yuan, F. Liu, G.F. Zhang (2015), "Characteristics and biodiversity of endophytic phosphorus- and potassium-solubilizing bacteria in Moso

Bamboo (*Phyllostachys edulis*)", *Acta Biologica Hungarica*, **66**(4), pp.449-459.

[4] Phạm Thế Trịnh (2012), "Nghiên cứu đặc điểm sử dụng đất đỏ bazan (ferralsols) tỉnh Đắk Lắk", *Tạp chí Khoa học và phát triển*, **10**(7), tr.1024-1031.

[5] Nguyễn Thị Đơn, Nguyễn Thị Kiều Diễm, Cao Ngọc Diệp (2012), "Phân lập và nhận diện vi khuẩn hòa tan P và K từ mẫu vật liệu phong hóa đá hoa cương núi Sập, tỉnh An Giang", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **24a**, tr.179-186.

[6] Cao Ngọc Diệp, Nguyễn Thị Đơn, Dương Thị Xuân Dao (2012), "Isolation and identification of phosphate and potassium - solubilizing bacteria from weathered materials of granite brock of BaHon mountain, Kien Giang, Vietnam", *International Conference on Environmental Research and Technology*, **3**, pp.133-138.

[7] H. Xiufang, C. Jishuang, G. Jiangfeng (2006), "Two phosphate- and potassium- solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, pp.983-990.

[8] H.M. Sadiq, G.Z. Jahangir, I.A. Nasir, M. Iqtidar, M. Iqbal (2013), "Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from rhizosphere soil", *Biotechnol. & Biotechnol. Equip.*, **27**(6), pp.4248-4255.

[9] T.C. Setiawati, L. Mutmainnah (2016), "Solubilization of potassium containing mineral by microorganisms from sugarcane rhizosphere", *Agri. & Agricult. Sci. Proce.*, **9**, pp.108-117.

[10] Vũ Thị Minh Đức (2001), *Thực tập vi sinh vật học*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.

[11] S.M. Perez, N. Cabirol, R.G. Tellez, L.S. Zamudio Rivera, F.J. Fernandez (2007), "O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection", *J. Microbiol. Methods*, **70**(1), pp.127-131.

[12] E.A. Nagul, I.D. McKelvie, P. Worsfold, S.D. Kolev (2015), "The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box", *Anal. Chim. Acta.*, **890**, pp.60-82.

[13] Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Thị Thanh Mai, Phạm Hương Sơn, Phạm Thế Hải (2017), "Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải P từ đất trồng sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam", *Tạp chí Khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, **2**(75), tr.80-86.

Nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến cây cao su - *Hevea brasiliensis* giai đoạn vườn ươm

Đoàn Phạm Ngọc Nga^{1*}, Hà Thị Ngọc Trinh¹, Ngô Trần Ngọc Quý², Nguyễn Hữu Hiệp³

¹Trung tâm Hạt nhân TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Nông lâm TP Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 20/12/2017; ngày chuyển phản biện 27/12/2017; ngày nhận phản biện 6/2/2018; ngày chấp nhận đăng 22/2/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của bốn chủng vi khuẩn nội sinh *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* đến cây cao su (*Hevea brasiliensis*) giai đoạn vườn ươm. Kết quả nhận được cho thấy, bốn chủng có ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm ($P \leq 0,01$), tỷ lệ nảy mầm cao nhất nhận được khi ủ hạt cao su với chủng *Bacillus safensis* và thấp nhất khi xử lý hạt bằng *Rhizobium freirei*. Ngược lại, kết quả phần trăm hạt nảy mầm không có sự khác biệt thống kê ($P > 0,05$). Hạt được ủ với bốn chủng vi khuẩn ở mật độ 10^9 CFU/túi cho kết quả cao nhất về chiều dài rễ, chiều dài thân mầm, chiều cao và trọng lượng khô của cây ($P < 0,01$). Kết quả đánh giá bằng kỹ thuật đánh dấu đồng vị N-15 trên cây cao su giai đoạn vườn ươm cho thấy, %N có nguồn gốc từ không khí do *Enterobacter asburiae* và *Stenotrophomonas maltophilia* đóng góp đạt 46,43-47,62%; trong khi, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* đạt 35,71-38,69%.

Từ khóa: *Bacillus*, cây cao su, *Enterobacter*, N-15, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Cao su là cây công nghiệp lâu năm có vai trò quan trọng trong nền kinh tế Việt Nam. Cây cao su đòi hỏi dinh dưỡng đủ để có thể tăng trưởng và duy trì năng suất tốt [1]. Kết quả thí nghiệm cho thấy, thời kỳ kiến thiết cơ bản của cây cao su có thể được rút ngắn nhờ vào chế độ phân bón tối ưu [2]. Còn trên cây cao su trưởng thành, việc sử dụng phân bón có thể cải thiện năng suất mủ lên tới 15-30% [3].

Trong những năm gần đây, nhiều chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ tự nhiên sống nội sinh trong rễ, thân, lá của những cây không thuộc cây họ đậu (ví dụ: Lúa, mía, bắp, cò, dứa...) đã và đang được nghiên cứu phân lập tuyển chọn và ứng dụng [4]. Tại Việt Nam, từ trước đến nay canh tác cây cao su chủ yếu phụ thuộc vào phân bón đạm vô cơ. Tuy nhiên, việc lạm dụng phân đạm vô cơ không những làm cây cao su dễ mắc cảm với dịch hại, giảm năng suất, giảm hiệu quả kinh tế mà còn gây nên tình trạng ô nhiễm môi trường. Chính vì vậy, nghiên cứu và ứng dụng các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ sẽ góp phần đáng kể cho việc giảm chi phí đầu tư và giảm ô nhiễm môi trường trong canh tác cây cao su. Xuất phát từ nhu cầu thực tế đó, nghiên cứu này nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn cố định nitơ tiềm năng kích thích sự tăng trưởng của cây cao su giai đoạn vườn ươm.

Nội dung nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện tại Đồn điền cao su Bến Cui, huyện Dương Minh Châu, tỉnh Tây Ninh. Thời gian thực hiện thí nghiệm từ tháng 10/2015 đến tháng 1/2017. Hạt cao su thuộc dòng vô tính GT1. Để đảm bảo tỷ lệ nảy mầm và đồng nhất, chọn hạt mới thu hoạch, vỏ có màu sáng bóng, ruột còn trắng, đầy và nặng. Các thí nghiệm được tiến hành trong vùng có điều kiện khí hậu nhiệt đới gió mùa. Cây cao su được trồng trong bầu nhựa kích thước 18x40 cm. Thí nghiệm được bố trí trên diện tích 300 m², hàng đơn cách nhau 1 m, vườn ươm được tưới bằng hệ thống tưới phun mưa. Đất vô bầu lấy tại lô thí nghiệm có thành phần cơ giới thịt pha sét cát; mức độ kết vón 10-30% thể tích; pH_{H₂O} 5,5; hàm lượng chất hữu cơ 2,5% (kết quả phân tích của Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam).

Thí nghiệm 1: Đánh giá tác động của các vi khuẩn nội sinh đối với sự nảy mầm và sự phát triển của cây cao su - *Hevea brasiliensis*

Thí nghiệm gồm 2 yếu tố được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Yếu tố thứ 1: Bốn chủng vi khuẩn nội sinh cố định đạm *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* được phân lập từ rễ cây cao su (nguồn cung

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

Effect of diazotrophic bacteria on rubber trees - *Hevea brasiliensis* at the nursery stage

Pham Ngoc Nga Doan^{1*}, Thi Ngoc Trinh Ha¹,
Tran Ngoc Quy Ngo², Huu Hiep Nguyen³

¹Center for Nuclear Techniques in Ho Chi Minh City

²Nong lam University Ho Chi Minh City

³Can Tho University

Received 20 December 2017; accepted 22 February 2018

Abstract:

This study was carried out to investigate the effects of four diazotrophic bacteria: *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis*, and *Rhizobium freirei*, which were isolated from rubber roots planted in Vietnam, on rubber trees at the nursery stage. The results showed that these bacteria had significant influences on the germination rate ($P \leq 0.01$); the germination rate was affected highest by *Bacillus safensis* and lowest by *Rhizobium freirei*. In contrast, the four bacteria had no significant effect on the germination percentage ($P > 0.05$). The best colony forming unit was 10^9 CFU/pot. The bacteria also created statistically significant differences in root length, stem length, height and dry weight ($P < 0.01$). By using ^{15}N dilution technique, *Enterobacter asburiae* and *Stenotrophomonas maltophilia* demonstrated a biological nitrogen fixing contribution to the rubber trees with the ratio of nitrogen driven from air (%Ndfa) of 46.43–47.62% higher than *Bacillus safensis* and *Rhizobium freirei* with the %Ndfa of 35.71–38.69%.

Keywords: *Bacillus*, *Enterobacter*, ^{15}N , *Rhizobium*, rubber tree, *Stenotrophomonas*.

Classification number: 4.1

cấp từ Trung tâm Hạt nhân TP Hồ Chí Minh). Yếu tố thứ 2: *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* được cho vào mỗi túi trồng cây cao su ở 5 mật số vi khuẩn như sau: 10^9 CFU, 10^8 CFU, 10^7 CFU, 10^6 CFU và 10^5 CFU.

Vi khuẩn được chủng 2 lần: Lần đầu - áo hạt cao su, ngâm hạt cao su trong hỗn hợp vi khuẩn và aginate 2% trong 30 phút; lần thứ 2 là 11 ngày sau khi hạt nảy mầm, rễ cây được nhúng trong hỗn hợp vi khuẩn và aginate 2% trong 30 phút trước khi trồng vào bầu nhựa.

Thí nghiệm 2: Ứng dụng kỹ thuật đánh dấu đồng vị ^{15}N để đánh giá hiệu quả cố định đạm sinh học của vi khuẩn cố định đạm lên cây cao su giai đoạn ươm

Enterobacter asburiae, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* được xử lý ở mật số vi khuẩn 10^9 CFU/túi và cây đối chứng không chủng vi khuẩn. Urê - N - 15 được sử dụng là 3,2 g urê - ^{15}N /cây có 5,231 % ^{15}N .e (%N-15 atom excess - %N - 15 làm giàu) được bón vào túi nhựa 45 ngày sau khi trồng. Phân chứa P và K được sử dụng theo khuyến cáo của Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam gồm 11 g SSP/túi và 1,9 g KCl/túi. Thí nghiệm được theo dõi và lấy số liệu đến thời điểm 120 ngày sau khi bón phân urê - N - 15.

Xác định khả năng nảy mầm: Theo phương pháp của Djavanshir và Pourberk (1976) [5], giá trị được tính theo công thức:

$$GP = \frac{Ni}{S} \times 100$$

$$GV = (\sum DGS / N) \times \frac{GP}{10}$$

Trong đó: GP là tỷ lệ hạt nảy mầm cuối thí nghiệm, Ni là số lượng hạt nảy mầm và S là tổng số hạt được trồng. GV là giá trị nảy mầm, DGS là tốc độ nảy mầm hàng ngày, tính bằng cách chia tỷ lệ (%) nảy mầm cộng dồn cho số ngày thí nghiệm, tính từ ngày gieo; $\sum DGS$ là tổng số các tốc độ nảy mầm hàng ngày; N là số ngày có đếm nảy mầm, bắt đầu từ ngày có nảy mầm đầu tiên.

Phương pháp phân tích mẫu

N tổng được phân tích theo phương pháp Kjeldahl. %N - 15 a.e được xác định bằng quang phổ kế phát xạ NOI 7PC tại Trung tâm Hạt nhân TP Hồ Chí Minh theo quy trình của G. Hardarson (1990) [6]. Kết quả %N có nguồn gốc từ phân urê N - 15 (%Ndff), %N có nguồn gốc từ đất (%Ndffs) và %N có nguồn gốc từ không khí (%Ndffk) được tính theo công thức:

$$\%Ndff = \frac{\%N-15 \text{ a.e (cây)}}{\%N-15 \text{ a.e (phân urê N-15)}} \times 100$$

Nghiệm thức đối chứng (NF- Non fixing): $\%Ndff_{NF} + \%Ndffs_{NF} = 100$

Tuy nhiên, khi bổ sung vi khuẩn (F- fixing): $\%Ndff_F + \%Ndffs_F + \%Ndffa = 100$

Giả thuyết: NF và F hấp thu lượng N từ phân bón và đất là như nhau thì:

$$\frac{\%N_{dff}-NF}{\%N_{dfs}-NF} = \frac{\%N_{dff}-F}{\%N_{dfs}-F}$$

Xử lý số liệu

Số liệu thực nghiệm được xử lý theo các công thức của phần mềm Microsoft Excel 2007. Phân tích và xử lý thống kê theo chương trình MSTATC. Phép thử Duncan được sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức, độ khác biệt có ý nghĩa ở mức LSD 5%.

Kết quả

Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn cố định đạm lên sự nảy mầm của hạt cao su

Kết quả thống kê từ bảng 1 cho thấy, khi xử lý hạt cao su bằng *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* không ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm (GP) của hạt ($P > 0,05$) nhưng giá trị nảy mầm (GV) có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn cố định đạm lên sự nảy mầm của hạt cao su.

Nghiệm thức	Tỷ lệ nảy mầm % (GP)	Giá trị nảy mầm (GV)
Đối chứng (không có vi khuẩn)	76,65	40,23 ^c
<i>Enterobacter asburiae</i>	78,27	48,26 ^b
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	78,77	48,42 ^b
<i>Bacillus safensis</i>	78,27	55,89 ^a
<i>Rhizobium freirei</i>	78,03	40,69 ^c
	F_c^{ns} CV% = 7,77	F_v^{**} CV% = 10,12

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có cùng ký tự đi kèm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$; ns: khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn cố định đạm đến sự phát triển của cây cao su

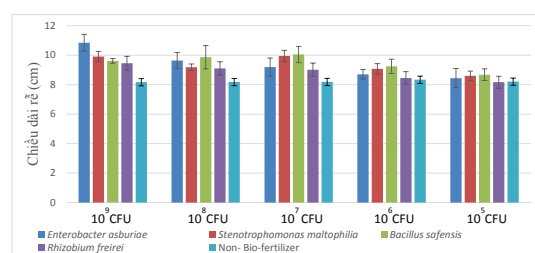
Kết quả từ bảng 2 cho thấy ảnh hưởng tích cực của 4 chủng vi khuẩn cố định đạm đến chiều dài rễ, chiều dài thân và trọng lượng khô của cây cao su giai đoạn vườn ươm ($P < 0,01$). Các chủng vi khuẩn *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia* và *Bacillus safensis* thể hiện ảnh hưởng đến chiều dài rễ và thân vượt trội hơn so với nghiệm thức xử lý chủng *Rhizobium freirei*. Tương tự, trọng lượng khô của cây trong các nghiệm thức xử lý bằng vi khuẩn *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia* và *Bacillus safensis* cũng cao hơn 14-16% so với đối chứng và nghiệm thức ủ với *Rhizobium freirei*.

Bảng 2. Ảnh hưởng của vi khuẩn cố định đạm đến sự phát triển của cây cao su.

Nghiệm thức	Chiều dài rễ (cm)	Chiều dài thân (cm)	Trọng lượng khô (g)
Đối chứng	8,21c	15,11 c	66,26b
<i>Enterobacter asburiae</i>	9,37a	15,58 b	82,06a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,35a	15,83 a	80,86a
<i>Bacillus safensis</i>	9,49a	15,86 a	80,75a
<i>Rhizobium freirei</i>	8,84b	15,18 c	70,06b
F	11,08**	6,13**	13,25**
CV (%)	6,82	1,97	10,22

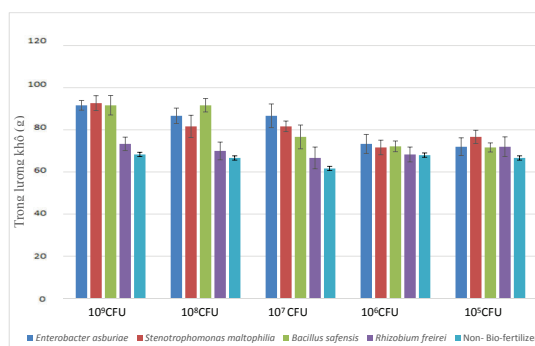
Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có cùng ký tự đi kèm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$.

Mật số vi khuẩn khác nhau của *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* ảnh hưởng đến chiều dài rễ ($P < 0,01$). Mật số vi khuẩn càng cao thì càng gây ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của rễ. Mật số vi khuẩn 10^9 CFU cho kết quả chiều dài rễ dài nhất đạt 9,6 cm và thấp nhất là 10^5 CFU đạt 8,42 cm (hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của mật số vi khuẩn đến chiều dài rễ của cây cao su giai đoạn vườn ươm.

Mật số vi khuẩn khác nhau của *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* tạo nên sự khác biệt thống kê về trọng lượng khô của cây ($P < 0,01$). Mật số vi khuẩn ở 10^9 CFU cho kết quả trọng lượng khô cao nhất đạt 83,53 g và thấp nhất là 10^5 CFU đạt 70,69 g (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của mật số vi khuẩn lên trọng lượng khô của cây cao su giai đoạn vườn ươm.

Theo kết quả từ bảng 3, các chủng vi khuẩn cố định đạm ảnh hưởng đến chiều cao cây ($P < 0,01$). Tại tất cả các thời điểm khảo sát từ 30 ngày đến 150 ngày sau khi nảy mầm, các nghiệm thức được xử lý vi khuẩn cố định đạm đều gia tăng chiều cao cây. Trong bốn chủng vi khuẩn cố định đạm, các nghiệm thức được ủ với *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia* và *Bacillus safensis* luôn có ảnh hưởng gia tăng chiều dài thân nhiều hơn so với nghiệm thức được xử lý bởi chủng *Rhizobium freirei*.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn cố định đạm đến chiều cao cây cao su.

Nghiệm thức	Chiều cao cây sau nảy mầm (cm)				
	30 ngày	60 ngày	90 ngày	120 ngày	150 ngày
Đối chứng	28,35 ^b	47,53 ^b	66,95 ^c	98,85 ^c	131,86 ^b
<i>Enterobacter asburiae</i>	30,04 ^a	49,91 ^a	71,78 ^{ba}	106,70 ^{ba}	143,77 ^a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	29,92 ^a	50,64 ^a	71,89 ^{ba}	107,99 ^a	144,37 ^a
<i>Bacillus safensis</i>	29,90 ^a	50,91 ^a	72,59 ^a	109,07 ^a	144,54 ^a
<i>Rhizobium freirei</i>	29,30 ^a	49,53 ^a	69,77 ^b	104,26 ^b	136,43 ^b
F	7,15 ^{**}	7,42 ^{**}	6,87 ^{**}	10,32 ^{**}	11,31 ^{**}
CV (%)	3,47	3,82	4,79	4,65	4,73

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có cùng ký tự đi kèm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$.

Đánh giá đóng góp cố định đạm sinh học của các chủng vi khuẩn cố định đạm cho cây cao su

Bảng 4. Đóng góp của các chủng vi khuẩn cố định đạm cho cây cao su từ quá trình cố định đạm sinh học.

Nghiệm thức	% N-15 a.e	%Ndff	%Ndffs	%Ndffa
Đối chứng (NF)	1,68 ^a	31,57 ^a	68,43 ^a	0
Xử lý vi khuẩn (F):				
<i>Enterobacter asburiae</i>	0,88 ^c	16,54 ^c	35,84 ^c	47,62 ^a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,9 ^c	16,91 ^c	36,66 ^c	46,43 ^a
<i>Bacillus safensis</i>	1,08 ^{ab}	20,30 ^b	43,99 ^b	35,71 ^b
<i>Rhizobium freirei</i>	1,03 ^{ab}	19,36 ^b	41,95 ^b	38,69 ^b
Urê - N - 15 (g)	5,321			
F	13,32 ^{**}	11,34 ^{**}	10,42 ^{**}	17,54 ^{**}
CV (%)	9,12	10,03	6,17	8,52

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có cùng ký tự đi kèm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$.

Kết quả từ bảng 4 thể hiện, ở thời điểm kết thúc thí nghiệm - 120 ngày sau khi bón phân urê - ¹⁵N, NF và F có sự khác biệt thống kê ($P < 0,01$). Nghiệm thức đối chứng - NF luôn thu được hàm lượng ¹⁵Na.e cao hơn so với nghiệm thức

được xử lý 4 chủng vi khuẩn cố định đạm - F. Nghiệm thức xử lý bằng *Enterobacter asburiae* và *Stenotrophomonas maltophilia* cho kết quả %N có nguồn gốc từ không khí là 46,43- 47,62%, cao hơn so với nghiệm thức được xử lý bằng *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* đạt 35,71- 38,69%. Điều này chứng tỏ khả năng cố định đạm trên cây cao su giai đoạn vườn ươm của chủng *Enterobacter asburiae* và *Stenotrophomonas maltophilia* cao hơn chủng *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei*.

Kết luận

Từ các kết quả nhận được trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* là các chủng vi khuẩn cố định đạm rất có tiềm năng trong hỗ trợ phát triển của cây cao su ở giai đoạn vườn ươm.

- Cây cao su có thể thu lợi từ quá trình cố định N sinh học của *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei*.

- Khả năng cố định đạm trên cây cao su giai đoạn vườn ươm của chủng *Enterobacter asburiae* và *Stenotrophomonas maltophilia* cao hơn chủng *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y.T. Adiwiganda, A. Hardjono, A. Manurung, U.T.B. Sihotang, Darmandono Sudiharto, D.H. Goenadi, H. Sihombing (1994), *Manuring recommendation technique for rubber plantation*, Indonesian Rubber Research Institute.
- [2] Y.T. Adiwiganda, A.E. Siahaan, J.P. Peranginangin, S. Darminta (1995), "Review of rubber nursery aging in PT Goodyear Sumatra Plantations", *Indonesian Rubber Research Institute News*, **14**(2), pp.76-88.
- [3] B.B. Bohlool, J.K. Ladha, D.P. Garrity, T. George (1992), "Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective", *Plant and Soil*, **141**, pp.1-11.
- [4] M. Park, C. Wookim, J. Jan, H. Lee, W. Shin, S. Kim, T. Sa (2005), *Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria form rhizosphere of agricultural crop of Korea*, **160**, pp.127-133.
- [5] K. Djavanshir, Pourberk (1976), "Germination value: A new formula, Silva", *Genetica journal*, **25**, pp.79-83.
- [6] G. Hardarson (1990), "Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships", *Training course series No. 2, IAEA-TSC2*, pp.41-52.

Hệ số di truyền và giá trị giống ước tính về tăng khối lượng, độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thăn và tỷ lệ nạc của lợn đực Landrace có nguồn gốc từ Pháp và Mỹ

Trịnh Hồng Sơn*, Lê Văn Sáng

Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 26/2/2018; ngày chuyển phản biện 2/3/2018; ngày nhận phản biện 3/5/2018; ngày chấp nhận đăng 8/5/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện với 459 lợn đực Landrace nguồn gốc Pháp và Mỹ nuôi tại Trạm Nghiên cứu và phát triển giống lợn hạt nhân Kỳ Sơn thuộc Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương từ năm 2015 đến 2017 để xác định hệ số di truyền và giá trị giống ước tính (GTGUT) đối với các tính trạng tăng trọng bình quân/ngày, độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thăn và tỷ lệ nạc nhằm chọn lọc các cá thể lợn đực có chất lượng cao đưa vào sản xuất. Thành phần phương sai di truyền và GTGUT được tính toán trên phần mềm MTDFRML dựa trên phương pháp REML. Hệ số di truyền của tính trạng tăng khối lượng bình quân/ngày, độ dày mỡ lưng và tỷ lệ nạc có hệ số di truyền cao (0,43, 0,36 và 0,40), độ dày cơ thăn ở mức trung bình (0,26). Các cá thể có GTGUT ở nhóm 1% cá thể tốt nhất cho từng tính trạng được chọn lọc để đưa vào đàn hạt nhân. Các cá thể ở nhóm 1% cá thể tốt nhất có GTGUT của tăng khối lượng từ +24,538 đến +20,583, của độ dày mỡ lưng từ -1,564 đến -1,155, của độ dày cơ thăn từ +3,075 đến +2,467, của tỷ lệ nạc từ +2,695 đến +1,994. Độ chính xác của GTGUT đối với các tính trạng nghiên cứu ở nhóm 1% cá thể tốt nhất đạt từ 0,398 đến 0,439.

Từ khóa: Độ dày cơ thăn, độ dày mỡ lưng, giá trị giống ước tính, hệ số di truyền, lợn đực Landrace, tỷ lệ nạc.

Chỉ số phân loại: 4.2

Đặt vấn đề

Trong chăn nuôi lợn nói riêng và vật nuôi nói chung, các chỉ tiêu về khả năng sinh trưởng và năng suất cho thịt của vật nuôi là những chỉ tiêu quan trọng, bên cạnh các chỉ tiêu về năng suất sinh sản và chất lượng thịt. Các chỉ tiêu về sinh trưởng như tăng trọng bình quân trên ngày (ADG) có tương quan di truyền cao với khả năng thu nhận và chuyển hóa thức ăn ở lợn [1-2]. Mặt khác, các chỉ tiêu độ dày mỡ lưng, tỷ lệ nạc của lợn tương quan chặt với các chỉ tiêu chất lượng thịt, từ đó ảnh hưởng đến giá thành sản phẩm. Do đó những tính trạng này đang được nghiên cứu và chọn lọc để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thị trường.

Năng suất của một cá thể phụ thuộc vào bản chất di truyền của nó và các yếu tố môi trường. Năng suất cao hay thấp của một cá thể do yếu tố di truyền được truyền lại từ thế hệ trước, và do tác động của ngoại cảnh như thức ăn, chuồng trại, điều kiện nuôi dưỡng, hoặc do tương tác giữa hai yếu tố này. Để bóc tách các nhân tố ảnh hưởng trên cần thu thập một lượng lớn thông tin về tính trạng quan tâm và sử dụng phương pháp nghiên cứu thích hợp.

Hiện nay, có nhiều phương pháp phân tích thống kê di truyền, nhưng phương pháp *Best Linear Unbias Prediction* (BLUP) được sử dụng phổ biến trong việc phân tích các tham số di truyền trong chăn nuôi ở nhiều nước có nền chăn nuôi lợn tiên tiến như Úc, Mỹ, Canada. Ở Việt Nam, nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng phương pháp BLUP trong chăn nuôi lợn đã được thực hiện như Kiều Minh Lực (2001), Trần Văn Chính (2004), Nguyễn Thị Viễn (2005)... [3-9].

Đàn lợn đực Landrace có tiềm năng di truyền tốt, năng suất, chất lượng cao, có nguồn gốc từ GENPLUS (Pháp), CEDAR RIDGE GENETICS (Mỹ) được Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương nhập về từ năm 2015 nhằm nâng cao năng suất, chất lượng đàn giống. Với mục đích khai thác tối đa tiềm năng di truyền của giống lợn đực Landrace trên, Trung tâm bước đầu nghiên cứu ước tính tham số di truyền và GTGUT về khả năng sinh trưởng, cho thịt của giống lợn đực Landrace có nguồn gốc từ Pháp và Mỹ.

Mục tiêu của nghiên cứu này là ước tính hệ số di truyền và GTGUT cho các tính trạng tăng khối lượng, độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thăn và tỷ lệ nạc của lợn đực Landrace có

*Tác giả liên hệ: Tel: 0912792872; Email: sontrinhvcn@gmail.com

Heritability and estimated breeding value of average daily gain, back fat, loin thickness and lean meat percentage of Landrace boars imported from France and the United States

Hong Son Trinh*, Van Sang Le

National Pig Research and Development Center

Received 26 February 2018; accepted 8 May 2018

Abstract:

This research was conducted on 459 Landrace boars which came from France and the United States and were raised in Thuy Phuong Pig Research and Development Center between 2015 and 2017 to examine the heritability and estimate the breeding value (EBV) for interested traits, including average daily gain (ADG), backfat thickness (BF), loin thickness (LT), and lean meat percentage (LMP). The heritabilities of ADG, BF, LT, and LMP were 0.43, 0.36, 0.26, and 0.40, respectively, which shows a large variation from moderate to high. 1% of the boars that had the best EBV for each traits was selected for the seed herd. This group showed the weight gain from +24.538 to +20.583, the backfat thickness from -1.564 to -1.155, the loin thickness from +3.075 to +2.467, and the lean rate from +2.695 to +1.994. The accuracy of the estimated breeding value for the studied traits achieved in the best group was from 0.398 to 0.439.

Keywords: BF, EBV, heritability, Landrace boars, LMP, LT.

Classification number: 4.2

nguồn gốc Pháp và Mỹ nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương, trên cơ sở đó, chọn lọc các cá thể đực có chất lượng tốt đưa vào sản xuất.

Đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 459 lợn đực Landrace có nguồn gốc từ Pháp và Mỹ nuôi tại Trạm Nghiên cứu và phát triển giống lợn hạt nhân Kỳ Sơn thuộc Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương từ năm 2015 đến năm 2017. Các cá thể có lý lịch, nguồn gốc rõ ràng (hệ phả được cung cấp từ hai công ty nhập về và được tiếp tục ghi chép, theo dõi tại Trung tâm). Số lợn đực Landrace trên được sử dụng để xác định hệ số di truyền và GTGUT về tăng khối lượng theo ngày tuổi, độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thăn và tỷ lệ nạc.

Đàn lợn được chăm sóc nuôi dưỡng theo quy trình chăm sóc nuôi dưỡng và thú y hiện hành tại Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương.

Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Ước tính hệ số di truyền và phương sai thành phần cho tính trạng tăng khối lượng, độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thăn và tỷ lệ nạc.

Nội dung 2: Ước tính giá trị giống cho tính trạng tăng khối lượng, độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thăn và tỷ lệ nạc.

Chọn lọc 1% lợn đực tốt nhất cho từng tính trạng.

Phương pháp nghiên cứu

Khối lượng của từng cá thể được xác định tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm (lợn con sơ sinh) và kết thúc thí nghiệm (100±2 kg) bằng cân điện tử Kelba (Đức). Tăng khối lượng trung bình được tính bằng tỷ lệ giữa khối lượng tăng lên trong thời gian nghiên cứu (g) và thời gian nghiên cứu (ngày). Độ dày mỡ lưng và độ dày cơ thăn được đo tại thời điểm kết thúc thí nghiệm bằng máy đo siêu âm Agrosan AL với đầu dò ALAL 350 (ECM, Pháp) ở vị trí xương sườn cuối cùng, cách đường sống lưng 6 cm trên từng cá thể sống theo phương pháp được mô tả trong nghiên cứu của Youssao và cs (2002) [10]. Độ dày mỡ lưng và độ dày cơ thăn được sử dụng để ước tính tỷ lệ nạc bằng phương trình hồi quy được Bộ Nông nghiệp Bỉ khuyến cáo năm 1999:

$$Y = 59,902386 - 1,060750X1 + 0,229324X2$$

Trong đó: Y là tỷ lệ nạc ước tính (%); X1 là độ dày mỡ lưng, bao gồm cả da (mm); X2 là độ dày cơ thăn (mm).

Số liệu được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1 (2002), Excel 2016. Các tham số thống kê mô tả của các chỉ tiêu nghiên

cứu gồm: Dung lượng mẫu (n), số trung bình (Mean), giá trị lớn nhất (Max), giá trị nhỏ nhất (Min).

Ước tính các phương sai thành phần, hệ số di truyền và giá trị giống bằng phương pháp REML (Restricted Maximum Likelihood), phần mềm MTDFREML với mô hình sau:

$$y = Xb + Za + e, V \begin{bmatrix} a \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 \\ 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

Trong đó: y là vector quan sát của tính trạng nghiên cứu (độ dày mỡ lưng, tăng khối lượng trung bình theo ngày tuổi, độ dày cơ thăn và tỷ lệ nạc); b là vector của các yếu tố cố định (thể hệ); a là vector của giá trị di truyền cộng gộp; e là vector sai số ngẫu nhiên; X là ma trận yếu tố cố định; Z là ma trận yếu tố ngẫu nhiên; A là ma trận tương quan cộng gộp giữa các cá thể; σ_a^2 phương sai di truyền cộng gộp; σ_e^2 là phương sai ngoại cảnh.

Các tham số ước tính bao gồm: Phương sai di truyền (σ_a^2), phương sai ngoại cảnh (σ_e^2), phương sai kiểu hình (σ_p^2), hệ số di truyền (h_a^2) và GTGUT của các tính trạng nghiên cứu nêu trên.

Quá trình xử lý số liệu được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương.

Kết quả và thảo luận

Các tham số thống kê mô tả

Bảng 1. Các tham số thống kê mô tả của các chỉ tiêu nghiên cứu.

Chỉ tiêu	Đơn vị	n	Mean	SD	Min	Max
Tăng khối lượng	g/ngày	459	667,42	27,20	558,40	752,90
Độ dày cơ thăn	mm	459	45,51	3,25	36,70	54,30
Độ dày mỡ lưng	mm	459	11,82	1,40	8,90	16,90
Tỷ lệ nạc	%	459	57,80	1,87	50,80	62,10

Tham số thống kê mô tả cho các tính trạng quan tâm được trình bày ở bảng 1. Kết quả bảng 1 cho thấy, tăng khối lượng của lợn đực Landrace từ lúc sơ sinh đến khi xuất bán là 667,42 g/ngày, độ dày mỡ lưng 11,82 mm, độ dày cơ thăn 45,51 mm và tỷ lệ nạc là 57,8%. Sự chênh lệch giữa Min và Max của các tính trạng lớn. Tăng khối lượng bình quân trên ngày giữa cá thể cao nhất và cá thể thấp nhất gấp 1,35 lần, độ dày mỡ lưng gấp 1,9 lần.

Tăng khối lượng bình quân/ngày trong nghiên cứu này thấp hơn so với lợn đực Landrace có nguồn gốc Pháp nuôi tại Đan Mạch (931 g/ngày) [11]; lợn đực Landrace nuôi tại Thái Lan (798,1 g/ngày) [12]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu

của chúng tôi về tăng khối lượng bình quân/ngày cao hơn báo cáo về khả năng tăng khối lượng của lợn đực Landrace tại Việt Nam 551,40 g/ngày [13], 646 g/ngày [14]. Tỷ lệ nạc của lợn đực Landrace khá cao, đạt 57,8%, tương đương với kết quả công bố của Nguyễn Văn Đức và cs (2010) [15] trên lợn Pietrain thuần (58,75%).

Phương sai thành phần và hệ số di truyền của một số chỉ tiêu về khả năng sinh trưởng, độ dày mỡ lưng và tỷ lệ nạc

Kết quả về phương sai di truyền, phương sai ngoại cảnh, phương sai kiểu hình và hệ số di truyền các tính trạng tăng khối lượng theo ngày tuổi, độ dày mỡ lưng, tỷ lệ nạc của lợn đực Landrace được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Hệ số di truyền về các tính trạng sinh trưởng, độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thăn và tỷ lệ nạc của lợn đực Landrace.

Chỉ tiêu	σ_a^2	σ_e^2	σ_p^2	h_a^2
Tăng khối lượng	258,205	339,263	597,468	0,430±0,109
Độ dày cơ thăn	2,578	7,349	9,927	0,260±0,096
Độ dày mỡ lưng	0,436	0,790	1,225	0,360±0,103
Tỷ lệ nạc	0,985	1,507	2,492	0,400±0,101

Hệ số di truyền của các tính trạng trong nghiên cứu này đạt từ trung bình đến cao. Tính trạng tăng khối lượng bình quân/ngày, độ dày mỡ lưng và tỷ lệ nạc có hệ số di truyền cao, tương ứng đạt 0,43, 0,36 và 0,40. Hệ số di truyền của tính trạng độ dày cơ thăn đạt mức trung bình (0,26). Sai số của hệ số di truyền trong nghiên cứu này cũng tương đối cao. Nguyên nhân là do đàn lợn đực Landrace có nguồn gốc từ Pháp và Mỹ mới được nhập về Trung tâm nên dung lượng mẫu được sử dụng trong nghiên cứu này nhỏ và đàn lợn đang ở giai đoạn thích nghi với môi trường mới.

Hệ số di truyền của tính trạng tăng trọng bình quân/ngày trong nghiên cứu này có kết quả tương đương với nhiều kết quả nghiên cứu khác như báo cáo của Camero (1990) [16] khi ước tính hệ số di truyền trên lợn đực Duroc và Landrace nuôi tại Anh (0,41 đến 0,50); Mrode và Kennedy (1993) [1] khi nghiên cứu trên các giống lợn đực Landrace và Duroc ở Canada, đạt lần lượt là 0,43 và 0,40. Hệ số di truyền cho tính trạng này trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn kết quả nghiên cứu của Lo và cs (1992) [17] khi ước tính trên đàn lợn đực Landrace tại Mỹ là 0,36; Radovic và cs (2013) [18] đối với đàn lợn đực Landrace nuôi tại Serbia là 0,11; Saintilan và cs (2011) [19] là 0,40 đối với đàn lợn đực Pietrain nuôi tại Pháp. Theo báo cáo kết quả nghiên cứu của NPPC (1995) [20], hệ số di truyền trung bình của các giống lợn ở Mỹ cho tính trạng tăng trọng bình quân/ngày (0,5), cao hơn với kết quả trong nghiên cứu này.

Hệ số di truyền của tính trạng độ dày mỡ lưng trong nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả công bố của Morde và Kennedy (1993) [1] 0,59; Lo và cs (1992) [17] 0,54; NPPC (1995) [20] 0,46; Nguyễn Hữu Tinh (2009) [21] 0,60. Hệ số di truyền của độ dày mỡ lưng của lợn đực Landrace tương đương với kết quả nghiên cứu của Cameron (1990) [16] 0,37; Cameron và Curan (1994) [22] 0,35; Crump và cs (1997) [23] 0,36. Kết quả về hệ số di truyền của nghiên cứu này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Cardellino và cs (1992) [24] 0,13; Trịnh Hồng Sơn và cs (2014) [9] 0,34.

Tỷ lệ nạc trong nghiên cứu này có hệ số di truyền cao (đạt 0,40), tương đương với kết quả nghiên cứu của Mrode và Kennedy (1993) [1] là 0,40. Tuy nhiên, kết quả này thấp hơn kết quả nghiên cứu của NPPC (1995) [20] 0,48 và cao hơn của Johnson và cs (1999) [2] 0,24.

Hệ số di truyền là tỷ lệ giữa phương sai di truyền với phương sai ngoại cảnh. Vì thế, những tính trạng có hệ số di truyền càng cao thì sự ảnh hưởng của ngoại cảnh tới những tính trạng đó càng thấp. Nói cách khác, tính trạng có phương sai di truyền lớn sẽ ổn định và ít bị ảnh hưởng bởi yếu tố ngoại cảnh. Do đó, việc chọn lọc sẽ đem lại hiệu quả cao.

GTGUT

GTGUT đối với tính trạng tăng khối lượng của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất ở đàn lợn đực Landrace: Để giúp cho công tác chọn giống đạt kết quả tốt và sử dụng đúng mục tiêu những cá thể tốt nhất cho việc tạo và nhân giống, GTGUT của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất trong đàn giống cần được nghiên cứu. Trong công tác giống, cá thể tốt nhất sẽ được chọn lọc để di truyền cho thế hệ sau. Chọn được những cá thể nằm trong nhóm 1% để đưa vào ghép phối là mục tiêu hàng đầu của các nhà chọn giống, nó sẽ cho kết quả cao hơn nếu chọn ghép đôi giao phối những cá thể nằm trong nhóm tiếp theo. Tuy nhiên, tùy theo quy mô quần thể vật nuôi mà ta có thể chọn lọc nhóm 1, 5, 10 hoặc 20% cá thể tốt nhất. GTGUT đối với tính trạng tăng khối lượng bình quân/ngày của lợn đực Landrace ở các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. GTGUT đối với tính trạng tăng khối lượng của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất ở đàn lợn đực Landrace.

Phân loại	n	GTGUT (g/ngày)			r (%)		
		Mean	Min	Max	Mean	Min	Max
1% cá thể tốt nhất	5	22,066	20,583	24,538	42,96	39,50	46,60
5% cá thể tốt nhất	23	17,775	14,863	24,538	41,43	34,20	46,60
10% cá thể tốt nhất	46	15,675	12,530	24,538	41,25	32,70	50,60
20% cá thể tốt nhất	92	13,001	8,751	24,538	41,92	32,70	53,60
50% cá thể tốt nhất	230	7,974	0,810	24,538	43,06	31,30	53,60

Đối với GTGUT của tính trạng tăng trọng bình quân/ngày thì lựa chọn những cá thể có giá trị dương cao nhất. GTGUT trung bình toàn đàn là +0,3995 với độ chính xác 43,13%. GTGUT trung bình của các nhóm 10, 5 và 1% cá thể tốt nhất tương ứng là +15,675, +17,775, +22,066 và độ chính xác trên 41%. Trong đó, ở nhóm 1% cá thể tốt nhất gồm 5 cá thể L3015, L3044, L3004, L3274 và L3176 với GTGUT tương ứng là +24,538, +22,633, +21,899, +20,679 và +20,583.

GTGUT đối với tính trạng độ dày mỡ lưng của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất ở đàn lợn đực Landrace: GTGUT đối với tính trạng độ dày mỡ lưng của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất của lợn đực Landrace được trình bày ở bảng 4. Ngược với kết quả GTGUT đối với tính trạng tăng khối lượng, độ dày cơ thân và tỷ lệ nạc, khi chọn lọc nhằm làm giảm độ dày mỡ lưng chúng ta cần lưu ý chọn những cá thể có GTGUT âm thấp nhất đối với tính trạng này làm đàn hạt nhân và loại thải không đưa những cá thể có GTGUT dương cao nhất.

Bảng 4. GTGUT đối với tính trạng độ dày mỡ lưng của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất ở đàn lợn đực Landrace.

Phân loại	n	GTGUT (mm)			r (%)		
		Mean	Min	Max	Mean	Min	Max
1% cá thể tốt nhất	5	-1,268	-1,155	-1,564	43,55	46,26	42,24
5% cá thể tốt nhất	23	-1,072	-0,836	-1,564	44,04	52,29	40,80
10% cá thể tốt nhất	46	-0,871	-0,536	-1,564	45,27	57,22	36,23
20% cá thể tốt nhất	92	-0,641	-0,309	-1,564	45,47	57,23	33,52
50% cá thể tốt nhất	230	-0,291	0,117	-1,564	45,47	57,36	33,52

GTGUT của độ dày mỡ lưng toàn đàn là +0,052 với độ chính xác là 0,45. Nhóm 1% cá thể có GTGUT âm cao nhất, trung bình -1,268, gồm 5 cá thể L3096, L3149, L3104, L3148 và L3145 với GTGUT tương ứng -1,564, -1,2212, -1,2162, -1,1838 và -1,1553. Độ chính xác trung bình là gần 44%. GTGUT trung bình của nhóm 5 và 10% lần lượt là -1,072 và -0,871 với độ chính xác trên 0,45.

GTGUT đối với tính trạng độ dày cơ thân của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất ở đàn lợn đực Landrace: Kết quả GTGUT đối với tính trạng độ dày cơ thân của các nhóm 1, 5, 10, 20 và 50% số cá thể được tốt nhất trong đàn lợn đực Landrace được trình bày ở bảng 5. Tương tự như tính trạng tăng khối lượng, tính trạng độ dày cơ thân lựa chọn cá thể có GTGUT dương cao nhất, chọn từ cao xuống thấp.

GTGUT của độ dày cơ thân toàn đàn là -0,04 với độ chính xác là 0,41. GTGUT ở các nhóm 1, 5, 10, 20 và 50% đều đạt giá trị dương, tương ứng lần lượt là + 2,692, +2,102,

+1,749, +1,36 và +0,688. Có 5 cá thể ở nhóm top 1% cá thể tốt nhất, gồm L3096 (+3,075), L3021 (+2,701), L3146 (+2,691), L3145 (+2,5263) và L3147 (+2,467). Độ chính xác của các nhóm tăng từ 39,45 lên 41,02.

Bảng 5. GTGUT đối với tính trạng độ dày cơ thần của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất ở đàn lợn đực Landrace.

Phân loại	n	GTGUT (mm)			r (%)		
		Mean	Min	Max	Mean	Min	Max
1% cá thể tốt nhất	5	2,692	2,467	3,075	39,77	39,23	41,46
5% cá thể tốt nhất	23	2,102	1,617	3,075	39,81	37,06	45,88
10% cá thể tốt nhất	46	1,749	1,168	3,075	39,45	30,15	48,31
20% cá thể tốt nhất	92	1,360	0,760	3,075	39,69	30,15	48,31
50% cá thể tốt nhất	230	0,688	-0,093	3,075	41,02	30,15	49,37

GTGUT đối với tính trạng tỷ lệ nạc của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất ở đàn lợn đực Landrace: Bảng 6 thể hiện kết quả về GTGUT với tỷ lệ nạc của các nhóm 1, 5, 10, 20 và 50% cá thể tốt nhất ở đàn lợn đực Landrace có nguồn gốc từ Pháp và Mỹ. Chọn lọc những cá thể có GTGUT đối với tính trạng tỷ lệ nạc có giá trị dương cao nhất. GTGUT trung bình toàn đàn là -0,066, độ chính xác là 0,464. GTGUT trung bình của tỷ lệ nạc ở nhóm 50% cá thể tốt nhất là 0,465 tăng lên 2,17 ở nhóm 1%. Nhóm 1% cá thể tốt nhất có 5 cá thể, gồm L3096 (+2,695), L3146 (+2,071), L3149 (+2,061), L3145 (+2,029) và L3148 (+1,994). Độ chính xác của GTGUT với tỷ lệ nạc cao, dao động từ 43,86 đến 47,1%. Có những cá thể, độ chính xác đạt trên 0,60.

Bảng 6. GTGUT đối với tính trạng tỷ lệ nạc của các nhóm từ 1 đến 50% cá thể tốt nhất ở đàn lợn đực Landrace.

Phân loại	n	GTGUT (%)			r (%)		
		Mean	Min	Max	Mean	Min	Max
1% cá thể tốt nhất	5	2,170	1,994	2,695	43,86	42,96	44,09
5% cá thể tốt nhất	23	1,672	1,163	2,695	46,19	41,52	58,71
10% cá thể tốt nhất	46	1,308	0,851	2,695	47,00	41,52	59,97
20% cá thể tốt nhất	92	0,994	0,541	2,695	46,55	34,04	59,98
50% cá thể tốt nhất	230	0,465	-0,184	2,695	47,10	32,22	60,15

Tỷ lệ nạc trong nghiên cứu này được ước tính thông qua độ dày mỡ lưng và độ dày cơ thần. Trong nhóm 1% cá thể tốt nhất có 2 cá thể có GTGUT tốt nhất cho tính trạng độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thần và tỷ lệ nạc, gồm: L3096 (-1,564,

+3,075 và +2,695); L3145 (-1,155, +2,526 và 2,029). Có 10 cá thể (L3096, L3102, L3105, L3144, L3145, L3146, L3147, L3148, L3149 và L1047) có GTGUT tốt nhất cho các tính trạng trên thuộc nhóm 5% cá thể tốt nhất. Tương tự, ở nhóm 10% cá thể tốt nhất có 16 cá thể có GTGUT tốt nhất cho tính trạng trên, gồm 10 cá thể có tên ở nhóm 5% và 6 cá thể: L3021, L3022, L3212, L3213, L3215 và L2059.

Kết luận

Hệ số di truyền của tính trạng tăng khối lượng bình quân/ngày, độ dày mỡ lưng và tỷ lệ nạc ở lợn đực Landrace nguồn gốc từ Pháp và Mỹ có hệ số di truyền cao tương ứng 0,43, 0,36 và 0,4. Hệ số di truyền của tính trạng độ dày cơ thần ở mức trung bình (0,26).

Chọn lọc được các cá thể có GTGUT tốt nhất cho từng tính trạng nghiên cứu đưa vào đàn hạt nhân để nâng cao năng suất, chất lượng toàn đàn. Nhóm 1% cá thể tốt nhất có GTGUT tốt nhất với các tính trạng nghiên cứu như: Tăng khối lượng từ +24,538 đến +20,583 (5 cá thể), của độ dày mỡ lưng từ -1,564 đến -1,155 (5 cá thể), của độ dày cơ thần từ +3,075 đến +2,467 (5 cá thể), của tỷ lệ nạc từ +2,695 đến +1,994 (5 cá thể).

Độ chính xác của GTGUT đối với các tính trạng nghiên cứu ở nhóm 1% cá thể tốt nhất đạt từ 0,398 đến 0,439.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.A. Mrode, B.W. Kennedy (1993), "Genetic-variation in measures of food efficiency in pigs and their genetic-relationships with growth-rate and backfat", *Anim. Prod.*, **56**, pp.225-232.
- [2] Z.B. Johnson, et al. (1999), "Genetic parameters for production traits and measures of residual feed intake in swine", *J. Anim. Sci.*, **77**, pp.1679-1685.
- [3] Kiều Minh Lực (2001), "Ảnh hưởng của thông số di truyền và mô hình phân tích thống kê đến giá trị giống của tính trạng tăng trọng và dày mỡ lưng ở lợn bằng phương pháp BLUP", *Hội thảo Đánh giá giá trị di truyền một số tính trạng kinh tế quan trọng ở lợn*, Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền Nam, tr.16-24.
- [4] Trần Văn Chính (2004), "Xác định giá trị giống trong chọn lọc để nâng cao tiến bộ di truyền của một số tính trạng sản xuất ở lợn", *Tạp chí Chăn nuôi*, **4(62)**, tr.4-6.
- [5] Nguyễn Thị Viễn (2005), "Giá trị kinh tế của tính trạng độ dày mỡ lưng và dày cơ thần trong hệ thống sản xuất và phân phối thịt khu vực TP Hồ Chí Minh", *Tạp chí Chăn nuôi*, **12(5)**, tr.4-6.
- [6] Nguyễn Văn Hùng, Trịnh Công Thành (2006), "Xây dựng chỉ số chọn lọc áp dụng trong công tác giống heo tại Trung tâm Nghiên cứu và huấn luyện chăn nuôi Bình Thắng", *Tạp chí Chăn nuôi*, **7(89)**, tr.4-6.
- [7] Phạm Thị Kim Dung, Tạ Thị Bích Duyên (2009), "GTGUT về tính trạng số con sơ sinh sống/lứa của 5 dòng cụ kỵ nuôi tại Trại lợn giống hạt nhân Tam Điệp", *Tạp chí Khoa học công nghệ chăn nuôi*, **18**, tr.17-22.
- [8] Tạ Thị Bích Duyên, Nguyễn Quế Côi, Trần Thị Minh Hoàng, Lê Thị Kim Ngọc (2009), "Giá trị giống và khuynh hướng di truyền của đàn lợn giống đực Landrace và Yorkshire nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu lợn

Thụy Phương”, *Tạp chí Khoa học công nghệ chăn nuôi*, **16**, tr.15-20.

[9] Trịnh Hồng Sơn, Nguyễn Quế Côi và Đinh Văn Chính (2014), “GTGUT về một số chỉ tiêu sinh sản của lợn nái dòng VCN03”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*, **10**, tr.9-18.

[10] A.K.I. Youssao, et al. (2002), “Prediction of carcass lean content by real-time ultrasound in Pietrain and negatif-stress Pietrain”, *Journal of Animal Science*, **75**, pp.25-32.

[11] I. Danbred (2006), Dam Lines, Retrieved March 1st, 2017 (http://www.danbredinternational.dk/sites/default/files/english/Damlines%20SHA_high.pdf).

[12] Thivakorn Sirichokchatchawan (2015), “Genetic Parameters for Residual Feed Intake, Feed Efficiency and Average Daily Gain in Landrace Pigs”, *Thai. J. Vet. Med.*, **45(4)**, p.7.

[13] Phùng Thị Vân và cs (2001), “Nghiên cứu khả năng cho thịt của lợn lai giữa hai giống LxY, giữa 3 giống LxYxDu và ảnh hưởng của hai chế độ nuôi tới khả năng cho thịt của lợn ngoại có tỷ lệ nạc trên 52%”, *Báo cáo khoa học Chăn nuôi thú y 1999-2000 (phần chăn nuôi gia súc)*, tr.217-219.

[14] Phan Xuân Hào (2002), *Xác định một số chỉ tiêu về sinh sản, năng suất và chất lượng thịt của lợn L và Y có các kiểu gen halothane khác nhau*, Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

[15] Nguyễn Văn Đức và cs (2010), “Năng suất sinh sản, sản xuất của lợn Móng cái, Pietrain, Landrace, Yorkshire và ưu thế lai của lợn lai F1 (LRxMC), F1 (YxMC) và F1 (PixMC)”, *Tạp chí Khoa học công nghệ chăn nuôi*, **22**, tr.29-36.

[16] N.D. Cameron (1990), “Comparison of Duroc and British

Landrace pigs and the estimation of genetic and phenotypic parameters for growth and carcass traits”, *Anim. Prod.*, **50**, pp.141-153.

[17] L.L. Lo, et al. (1992), “Genetic analysis of growth, real-time ultrasound, and pork quality traits in Duroc and Landrace pigs: II. heritabilities and correlations”, *J. Anim. Sci.*, **70**, pp.2387-2396.

[18] C. Radovic, et al. (2013), “Heritability, Phenotypic and Genetic Correlations of the Growth Intensity and Meat Yield of Pigs”, *Biotechnologie in Animal Husbandry*, **29**, pp.75-82.

[19] R. Saintilan, et al. (2011), “Genetic parameters and halothane genotype effect of residual feed intake in Piétrain growing pigs”, *Journées de la Recherche Porcine en France*, **43**, pp.63-64.

[20] National Pork Producers Council (NPPC) (1995), *Genetic Evaluation/Terminal Line Program Results*.

[21] Nguyễn Hữu Tinh (2009), *Đánh giá di truyền đàn giống thuần Yorkshire và Landrace liên kết giữa các trại nhằm khai thác hiệu quả nguồn gen và nâng cao chất lượng giống*, Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam.

[22] N.D. Cameron, M.K. Curran (1994), “Selection for components of efficient lean growth rate in pigs. 2. Selection pressure applied and direct responses in a Landrace herd”, *Anim. Prod.*, **59**, pp.263-269.

[23] R.E. Crump (1997), “Individual animal model estimates of genetic parameters for reproduction traits of Landrace pigs’ performance tested in a commercial nucleus herd”, *Anim. Sci.*, **65**, pp.285-290.

[24] R.A Cardellino, F. Siewerdt (1992), “Genetic parameters of production traits in Landrace and Large White pigs in southern Brazil”, *Rev. Bras. Genet.*, **15**, pp.575-583.

Khảo sát hiện trạng kỹ thuật nuôi và sự tích lũy carbon hữu cơ, nitrogen và phosphorus trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh tại Bạc Liêu

Nguyễn Thị Bích Vân^{1,2*}, Nguyễn Phúc Cẩm Tú¹,
Đinh Thế Nhân¹, Nguyễn Phú Hòa¹

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông lâm TP Hồ Chí Minh

²Trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật Bạc Liêu

Ngày nhận bài 5/2/2018; ngày chuyển phản biện 8/2/2018; ngày nhận phản biện 2/4/2018; ngày chấp nhận đăng 20/4/2018

Tóm tắt:

Bạc Liêu là một trong những tỉnh có diện tích nuôi tôm nước lợ lớn nhất Đồng bằng sông Cửu Long. Hiện trạng nghề nuôi tôm thẻ chân trắng ở tỉnh Bạc Liêu đã được tiến hành khảo sát dựa trên biểu mẫu được soạn sẵn. Kết quả nghiên cứu cho thấy, phần lớn các hộ nuôi tôm từ 1 đến 2 vụ trong năm (71%, 26% và 3% tổng số hộ nuôi 2 vụ, 1 vụ và 3 vụ), tôm được thả nuôi trong ao đất chiếm đến 91%. Thời gian thả nuôi tập trung vào từ tháng 1 đến tháng 3 chiếm đa số (83%), thời gian nuôi trung bình $97,7 \pm 16,5$ ngày/vụ. Diện tích ao nuôi từ 0,2-0,4 ha/ao (76%) và diện tích ao nuôi được thiết kế nhiều nhất là 0,3 ha/ao (chiếm 22%); mật độ thả nuôi tập trung ở hai nhóm mật độ chính là 50-60 con/m² và 80-100 con/m² với cỡ giống nhỏ (PL10-PL15). Thức ăn được sử dụng phổ biến là Grobest, Cargill và CP với hệ số chuyển hóa thức ăn trung bình FCR là $1,27 \pm 0,09$, tôm được cho ăn 4 lần/ngày (72%). Tỷ lệ sống của tôm nuôi khoảng $83,8 \pm 10,6\%$, cỡ tôm thu hoạch 62 ± 16 con/kg và năng suất thu được $10,2 \pm 3,38$ tấn/ha/vụ. Ngoài ra, mẫu thức ăn theo từng cỡ cho ăn và mẫu tôm (lúc thả và lúc thu hoạch) được thu thập để nghiên cứu khả năng chuyển hóa carbon hữu cơ, nitrogen và phosphorus trong ao nuôi tôm từ thức ăn. Các chỉ tiêu này được phân tích theo Boyd & Tucker (1992), TCVN: 1525:2001 và phương pháp Kielhdahl. Kết quả cho thấy, tỷ lệ chuyển hóa carbon hữu cơ, nitrogen và phosphorus từ thức ăn trong tôm nuôi là khá thấp và có sự khác biệt giữa các mật độ nuôi khác nhau.

Từ khóa: Carbon hữu cơ, chuyển hóa, năng suất, nitrogen, phosphorus, tôm thẻ chân trắng, tỷ lệ sống.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Nền công nghiệp nuôi tôm đã và đang phát triển nhanh chóng ở nhiều quốc gia châu Á trong nhiều thập niên qua do giá trị kinh tế trên thị trường xuất khẩu [1]. Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) là loài được nuôi phổ biến trên thế giới, với sản lượng năm 2014 đạt hơn 3 triệu tấn (chiếm 82,7% tổng sản lượng tôm nuôi nước lợ) [2]. Tôm thẻ chân trắng là một trong hai đối tượng chính được nuôi hiện nay ở các vùng ven biển Việt Nam [3].

Bạc Liêu có 56 km bờ biển khá bằng phẳng, với hệ thống sông ngòi chằng chịt lưu thông ra biển, tạo vùng sinh thái mặn, lợ đa dạng, phong phú về thức ăn tự nhiên, đây là điều kiện thuận lợi cho phát triển các loài thủy sản. Bạc Liêu

là một trong những tỉnh có nguồn nguyên liệu tôm lớn xuất khẩu đi các nước trên thế giới, góp phần tăng kim ngạch xuất khẩu của tỉnh.

Những năm qua nghề nuôi tôm ở nước ta nói chung, tỉnh Bạc Liêu nói riêng phát triển rất mạnh không những về quy mô mà cả ở sự đa dạng hóa các mô hình nuôi. Vì vậy, việc tìm hiểu hiện trạng nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh và nghiên cứu sự tích lũy các hợp chất hữu cơ trong ao nuôi là rất cần thiết, nhằm đánh giá thực trạng kỹ thuật của nghề nuôi và sự chuyển hóa carbon hữu cơ, nitrogen và phospho từ thức ăn trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh tại tỉnh Bạc Liêu, trên cơ sở đó đề xuất giải pháp quản lý phù hợp, giúp nghề nuôi tôm phát triển tốt hơn.

*Tác giả liên hệ: Email: ntbvan13@gmail.com; 0902977978

Studying the status of culturing techniques and the estimation of the ability to assimilate organic carbon, nitrogen and phosphorus from feed in intensive white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) ponds in Bac Lieu province

Thi Bich Van Nguyen^{1,2*}, Phuc Cam Tu Nguyen¹,
The Nhan Dinh¹, Phu Hoa Nguyen¹

¹Nong lam University Ho Chi Minh City

²College of Economics - Technical Bac Lieu province

Received 5 February 2018; accepted 20 April 2018

Abstract:

Bac Lieu is one of the largest brackish shrimp farming provinces in the Mekong River Delta. An analysis of the current status of white shrimp farming in Bac Lieu Province has been conducted based on a questionnaire. The study results showed that most households cultured one (accounting for 26%) or two crops per year (accounting for 71%), and stocked shrimp in earthen ponds was 91%. The stocking time was from January to March (83% of total farms), the average culture time was 97.7 ± 16.5 days/crop. The area of ponds ranged from 0.2-0.4 ha/pond (76%), and the most designed pond area was 0.3 ha/pond, accounting for 22%. The stocking density concentrated in two main density groups of 50-60 individuals/m² and 80-100 individuals/m² with small size (PL10-PL15). Commonly used feeds were Grobest, Cargill and CP with an average FCR of 1.27 ± 0.09 , and shrimp were fed 4 times a day (72%). The survival rate of shrimp was $83.8 \pm 10.6\%$, the shrimp size was 62 ± 16 shrimps/kg, and the yield was 10.2 ± 3.38 tons/ha/crop. In addition, the feed samples and the shrimp samples (stocking and harvesting) were collected to study the assimilation of organic carbon, nitrogen and phosphorus from the feed in shrimp ponds. These indicators were analysed according to Boyd & Tucker (1992), TCVN 1525:2001, and Kjeldahl methods. Sampling results showed that the assimilation of organic carbon, nitrogen and phosphorus from the feed in shrimp was rather low and significantly different among stocking densities.

Keywords: Assimilation, nitrogen, organic carbon, phosphorus, productivity, survival rate, white leg shrimp.

Classification number: 4.5

Nội dung nghiên cứu

Phương pháp thu thập thông tin

Thông tin thứ cấp: Tiến hành thu thập các báo cáo định kỳ hoặc báo cáo tổng kết cuối năm của Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (NN&PTNT) trong những năm 2014 và 2015; các thông tư, nghị định, quyết định của các cấp chính quyền; các bài báo trên các tạp chí, bản tin thủy sản của Bộ NN&PTNT, Tổng cục Thủy sản, các báo cáo khoa học trong và ngoài nước có liên quan đến tình hình nuôi thâm canh tôm thẻ chân trắng.

Thông tin sơ cấp: Được thu thập thông qua việc phỏng vấn trực tiếp 68 hộ nuôi tôm thẻ chân trắng tại thành phố Bạc Liêu (25 hộ), huyện Đông Hải (23 hộ) và huyện Hòa Bình (20 hộ) theo bảng câu hỏi được soạn sẵn, bao gồm các nội dung như: Thông tin cá nhân, kinh nghiệm nuôi, nguồn cung cấp thông tin kỹ thuật, diện tích ao, độ sâu, mật độ thả giống, thời gian nuôi, kích cỡ thu hoạch, tỷ lệ sống, hệ số tiêu tốn thức ăn, lượng thức ăn...

Phương pháp lấy mẫu nghiên cứu sự chuyển hóa carbon hữu cơ, nitrogen và phosphor:

- Mẫu thức ăn: Thu mẫu thức ăn phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của tôm nuôi. Mẫu thức ăn mỗi cỡ tiến hành thu 3 mẫu rồi trộn lại thành 1 mẫu, chọn điển hình là mẫu thức ăn được sử dụng phổ biến trong hộ nuôi.

- Mẫu tôm: Thu 10 gram mẫu tôm PL 12-15/ao ngẫu nhiên cho 9 mẫu (3 mẫu/ao/ huyện x 3 huyện = 9 mẫu) tôm giống và tôm thu hoạch kết thúc vụ nuôi thu 30-50 con/ao tại 3 huyện (3 mẫu/huyện) từ các ao đang thả nuôi cho vụ kế tiếp.

Phương pháp phân tích hàm lượng carbon hữu cơ, nitrogen và phosphor tích lũy trong ao nuôi tôm: Sử dụng acid potassium dichromate-sulfuric oxy hóa để xác định tổng hàm lượng carbon hữu cơ - TOC (Total Organic Carbon) (Boyd & Tucker, 1992); tổng hàm lượng phosphor - TP (Total Phosphorus) được xác định theo TCVN: 1525:2001; tổng hàm lượng nitrogen - TN (Total Nitrogen) được xác định theo phương pháp Kjeldahl.

Xác định hàm lượng nitrogen thải ra môi trường trong ao nuôi tôm: $TN = (TN_{Input} - TN_{Output})$. Trong đó: TN_{Input} : Tổng lượng nitrogen trong thức ăn, N_{Output} : Tổng lượng nitrogen tích lũy trong tôm. Xác định hàm lượng phosphorus thải ra môi trường trong ao nuôi tôm: $TP = (TP_{Input} - TP_{Output})$, Trong đó: TP_{Input} : Tổng lượng phosphor trong thức ăn,

TP_{Output} : Tổng lượng phosphor tích lũy trong tôm. Xác định tổng lượng carbon hữu cơ thải ra môi trường trong ao nuôi tôm: $TOC = (TOC_{Input} - TOC_{Output})$, trong đó: TOC_{Input} là tổng lượng carbon hữu cơ trong thức ăn, TOC_{Output} : Tổng lượng carbon tích lũy trong tôm.

Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được xử lý với chương trình Excel và phần mềm SPSS 22 thông qua các phương pháp thống kê mô tả dùng phân tích định tính cho các chỉ tiêu như: Tần suất, trung bình và tỷ lệ phần trăm; phân tích định lượng gồm các giá trị: Trung bình, lớn nhất, nhỏ nhất và độ lệch chuẩn; phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA, Duncan - test) hoặc kiểm định mẫu độc lập (independent - test).

Kết quả và thảo luận

Kinh nghiệm và trình độ kỹ thuật nuôi tôm

Kết quả cho thấy, đa số người dân có kinh nghiệm nuôi tôm thẻ chân trắng từ 4-5 năm (chiếm 82,3%) (bảng 1). Điều này phù hợp với kết quả báo cáo của Sở NN&PTNT tỉnh Bạc Liêu [4]. Báo cáo cho biết, nghề nuôi tôm thẻ chân trắng bắt đầu từ năm 2008 nhưng phát triển mạnh tại tỉnh từ năm 2013-2014. Đa số chủ hộ nuôi tôm thẻ chân trắng tại Bạc Liêu (60,3%) cho rằng, kỹ thuật nuôi tôm thẻ chân trắng đang được áp dụng tại nông hộ là do họ đúc kết kinh nghiệm từ việc nuôi tôm sú.

Bảng 1: Thông tin về kinh nghiệm nuôi tôm thẻ chân trắng và trình độ kỹ thuật nuôi tôm của nông hộ.

TT	Nội dung	Số hộ	Tỷ lệ (%)
1	Số năm kinh nghiệm nuôi tôm		
	7-8 năm	5	7,4
	4-5 năm	56	82,3
	< 4 năm	7	10,3
2	Trình độ kỹ thuật nuôi tôm		
	Kinh nghiệm bản thân	41	60,3
	Tập huấn	23	33,8
	Khác (Trung cấp nuôi trồng thủy sản, Đại học)	4	5,9

Để có kiến thức cũng như kinh nghiệm chuyển đổi từ nuôi tôm sú sang tôm thẻ chân trắng và khởi đầu nuôi tôm thẻ chân trắng, hầu như các hộ nuôi tôm chủ yếu học qua sách vở tài liệu liên quan và dựa vào kinh nghiệm nuôi tôm

của bản thân là chính (với 60,3%), còn lại được tham gia lớp tập huấn (33,8%) và trình độ khác (trung cấp, đại học) chỉ chiếm 5,9%. Các lớp tập huấn kỹ thuật nuôi tôm thẻ chân trắng do chính quyền tổ chức được xem là một trong những kênh thông tin cung cấp những tiến bộ kỹ thuật và đến với người dân nhanh nhất. Có 33,8% số hộ nuôi có tham gia các lớp tập huấn cho rằng đã áp dụng những nội dung tập huấn cho việc nuôi tôm thẻ chân trắng tại địa phương.

Cơ cấu mùa vụ

Số liệu khảo sát trên địa bàn Bạc Liêu là 68 hộ, với 18 hộ (26,5%) nuôi một vụ, 48 hộ (70,6%) nuôi hai vụ và chỉ có 2 hộ (2,9%) nuôi ba vụ trên một năm. Trong đó, tôm được thả nuôi trong ao đất chiếm đến 91%, chỉ có 9% là có lót bạt.

Bảng 2: Mùa vụ nuôi tôm.

TT	Nội dung	Số hộ	Tỷ lệ (%)
1	Nuôi 1 vụ	18	26,5
2	Nuôi 2 vụ	48	70,6
3	Nuôi 3 vụ	02	2,9
4	Thời gian thả tôm từ tháng 1-3	57	83,8
5	Thời gian thả tôm từ tháng 4-6	11	16,2

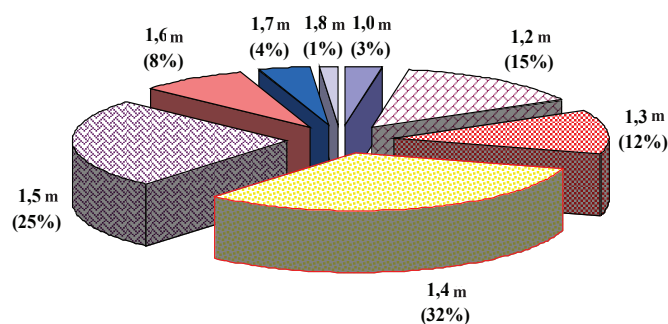
Bảng 2 cho thấy, số hộ nuôi tập trung vào từ tháng 1-3 chiếm đa số (83,8%), các tháng còn lại khá thấp (16,2%). Điều này cũng khớp với lịch thời vụ của tỉnh tại địa phương. Đối với tôm thẻ chân trắng: Thời gian thả giống là từ tháng 12/2013 đến tháng 10/2014, mật độ thả khuyến cáo dưới 100 con/m², nuôi tôm đã và đang thật sự là thế mạnh kinh tế của Bạc Liêu [4]. Diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng tập trung ở huyện Đông Hải, Hòa Bình và TP Bạc Liêu [5].

Diện tích ao nuôi: Bảng 3 cho thấy, diện tích ao nuôi trung bình 0,29±0,10 ha/ao, trong đó ở 3 nhóm mật độ thả tôm nuôi khác nhau về diện tích ao nuôi không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê. Với diện tích khảo sát, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự của Võ Nam Sơn và cs [6], diện tích ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại Sóc Trăng là 0,29±0,09 ha/ao; Phùng Thị Hồng Gấm và cs [7], tại Ninh Thuận ao có diện tích 0,29±0,09 ha/ao. Theo kết quả từ tác giả Nguyễn Thanh Long và cs [8], diện tích ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại Cà Mau là 0,22 ha/ao. Rõ ràng, diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long không có sự khác biệt đáng kể.

Bảng 3. Diện tích và mật độ tôm từ khảo sát thực tế.

Nội dung	Mật độ nuôi < 60 con/m ²	Mật độ nuôi 60-80 con/m ²	Mật độ nuôi 80-100 con/m ²	Trung bình
Số mẫu các nhóm	n=12	n=39	n=17	n=68
Diện tích (ao/ha)	0,289±0,117 ^a	0,297±0,100 ^a	0,274±0,123 ^a	0,290±0,108
Mật độ (con/m ²)	50,0±0,00 ^a	70,5±8,57 ^b	98,2±3,93 ^c	73,5±17,56

Độ sâu ao nuôi: Độ sâu ao nuôi trung bình 1,4±0,2 m (1,0-1,8 m), độ sâu ao nuôi tập trung từ 1,2-1,5 m chiếm 84%. Các ao nuôi với mực nước chỉ 1,0 m là do không giữ được nước. Theo Phùng Thị Hồng Gấm và cs [7], tại Ninh Thuận ao nuôi tôm thẻ chân trắng có độ sâu mực nước 1,23±0,10 m. Điều này nói lên độ sâu ao nuôi tôm thẻ thâm canh ở các vùng nuôi đều đảm bảo tiêu chuẩn của ao nuôi (hình 1).

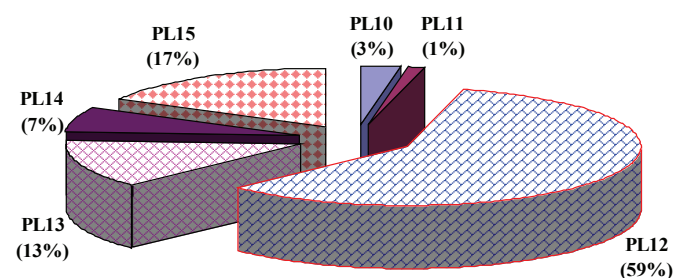


Hình 1. Tỷ lệ (%) độ sâu của ao nuôi tôm thẻ chân trắng.

Cải tạo ao: Số ao nuôi có cải tạo khô (có phơi ao) ở vụ nuôi đầu chiếm 91% và chỉ có 9% hộ nuôi không phơi ao, họ cho rằng cải tạo khô có thể tạo điều kiện cho phèn tiềm tàng hoạt động. Cải tạo ao là khâu đặc biệt quan trọng trong các mô hình nuôi thủy sản nói chung và nuôi tôm thẻ chân trắng nói riêng. Ao nuôi càng lâu năm tích tụ các chất dinh dưỡng ở nền đáy càng nhiều, kéo theo sự thâm thấu này càng đi sâu vào tầng đất đáy ao, do các chất dinh dưỡng tích tụ với nền đáy thiếu khí và yếm khí nên tạo điều kiện cho nhóm vi khuẩn không có lợi tồn tại và phát triển khi gặp điều kiện thuận lợi, gây bất lợi cho đối tượng thủy sản trong ao nuôi.

Con giống và mật độ thả tôm: Bảng 3 cho thấy, mật độ thả nuôi tập trung ở hai nhóm mật độ chính là 60-80 con/m² và nhóm 80-100 con/m². Kích cỡ giống thả nuôi từ PL10-PL15 (hình 2), trong đó PL12 được chọn lựa thả nuôi nhiều nhất (59%). Điều này chứng tỏ địa phương đã thực hiện

đúng theo khuyến cáo mật độ thả nuôi tôm thẻ chân trắng của Sở NN&PTNT, ngoài ra PL12 là giai đoạn tôm phát triển hoàn chỉnh, có thể làm tôm giống để tiến hành thả nuôi [5]. Cũng theo tác giả Phùng Thị Hồng Gấm và cs [7], ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại Ninh Thuận có mật độ trung bình là 87±10 con/m²; tương tự theo Võ Nam Sơn và cs [6], mật độ 80,7±16,8 con/m² và kích cỡ tôm giống được thả là PL13-16. Theo tác giả Nguyễn Thanh Long và cs [8], mật độ nuôi là 74,7 con/m², kích cỡ giống thả nuôi từ PL08-PL12; Lê Kim Long và cs [9], mật độ tôm thẻ chân trắng tại thị xã Ninh Hòa, Khánh Hòa là 40 con/m².



Hình 2. Kích cỡ tôm thả nuôi.

Loại thức ăn và cách cho ăn: Thức ăn tôm được người nuôi lựa chọn từ 7 loại, trong đó 3 loại được lựa chọn nhiều lần lượt là Grobest (33%), Cargill (17%) và CP (16%). Các loại thức ăn này được lựa chọn nhiều do một phần ảnh hưởng của các chương trình khuyến cáo và khuyến mãi từ các đại lý thức ăn trong thời gian hộ nuôi đã nuôi và được phỏng vấn lại sau đó.

Theo kết quả khảo sát từ hộ nuôi, thức ăn cho tôm thẻ chân trắng là thức ăn viên chuyên dụng, có hàm lượng protein khá cao (từ 38-42%), khi tôm nuôi đạt từ 15 ngày trở đi bắt đầu tập định lượng thức ăn qua nhá (sàng dùng cho tôm ăn) để điều chỉnh thức ăn phù hợp, giảm thức ăn khi tôm đang lột xác, hay những ngày nhiệt độ nước thấp hoặc cao và cho ăn theo giai đoạn tăng trọng của tôm. Tôm nuôi được cho ăn từ 2-5 lần/ngày, chủ yếu là 4 lần/ngày.

Năng suất và tỷ lệ sống của tôm nuôi: Bảng 4 cho thấy, với các nhóm mật độ nuôi khác nhau thì lượng thức ăn và năng suất tôm thu hoạch khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Đồng thời năng suất tôm thu hoạch giữa 3 nhóm mật độ cũng khác nhau có ý nghĩa, ở mật độ trên 80 con/m² cho năng suất cao nhất. Tuy nhiên, tỷ lệ sống giữa 2 nhóm mật độ 60-80 con/m² và trên 80 con/m² không có sự khác biệt nhưng có khác so với mật độ dưới 60 con/m².

Bảng 4. Năng suất và tỷ lệ sống của tôm theo 3 nhóm mật độ từ khảo sát thực tế.

Nội dung	Mật độ <60 con/m ²	Mật độ 60-80 con/m ²	Mật độ >80-100 con/m ²
	(n=12)	(n=39)	(n=17)
Mật độ (con/m ²)	50,0±0,00 ^a	70,5±8,57 ^b	98,2±3,93 ^c
Thức ăn (tấn/ha)	9,48±3,41 ^a	12,0±2,98 ^b	15,9±4,19 ^c
Tỷ lệ sống (%)	90,8±8,47 ^b	82,1±10,7 ^a	82,4±10,3 ^a
Năng suất (tấn/ha)	7,68±2,80 ^a	9,65±2,30 ^b	13,3±3,74 ^c

Các giá trị trong cùng một cột mang chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa (p<0,05).

Hệ số chuyển hóa thức ăn (FCR - Feed Conversion Ratio): Tôm thẻ chân trắng có nhu cầu về protein thấp hơn nhiều so với các loài tôm nuôi khác, tuy nhiên khi nuôi tôm thẻ chân trắng người nuôi dựa vào kỹ thuật nuôi tôm sú trước đây là thức ăn từ 36-44% protein. Kết quả điều tra cho thấy, tôm thẻ chân trắng sử dụng thức ăn với hệ số phổ biến nhất là FCR=1,3. Kết quả của chúng tôi có FCR trung bình 1,27±0,09 cũng nằm trong khoảng FCR nuôi tôm thẻ chân trắng.

Bảng 5. Hệ số chuyển hóa thức ăn.

Số TT	Tên tác giả	FCR
1	Phùng Thị Hồng Gấm và cs [7]	1,32±0,08
2	Võ Nam Sơn và cs [6]	1,32±0,08
3	Lê Kim Long và cs [9]	1,41
4	Tăng Minh Khoa và cs [10]	1,01
5	Nguyễn Thanh Long và cs [8]	1,07
6	Kết quả của nhóm nghiên cứu	1,27±0,09

Sự chuyển hóa TOC, TN và TP trong ao nuôi tôm từ thức ăn

Trước tình hình diện tích nuôi trồng thủy sản ngày một gia tăng, việc nuôi thâm canh hay bán thâm canh thiếu sự quy hoạch sẽ làm cho môi trường nước ngày càng bị ô nhiễm. Thêm vào đó, lượng thức ăn dư thừa, hóa chất xử lý ao nuôi được sử dụng ngày càng nhiều... là những nguyên

nhân làm ô nhiễm nguồn nước, lan truyền dịch bệnh, đe dọa sự phát triển bền vững của nghề nuôi. Vì vậy, thức ăn là một yếu tố quan trọng trong sự phát triển nghề nuôi tôm, ảnh hưởng đến môi trường và hiệu quả nuôi. Lượng C, N và P tích lũy trong tôm được ước tính theo 3 nhóm có mật độ thả nuôi lần lượt: < 60 con/m²; từ 60-80 con/m² và > 80-100 con/m². Ở các mật độ khác nhau, lượng C, N và P tích lũy trong tôm từ thức ăn đều có sự khác biệt ý nghĩa thống kê.

Bảng 6. Tổng lượng nitrogen chuyển hóa từ thức ăn ở các mật độ nuôi khác nhau.

Nội dung	Mật độ < 60 con/m ²	Mật độ 60-80 con/m ²	Mật độ > 80-100 con/m ²
Nitrogen cung cấp từ thức ăn (kg/ha/vụ)	706±251 ^a	897±225 ^b	1.177±311 ^c
Nitrogen tích lũy trong tôm (kg/ha/vụ)	220±79,9 ^a	276±66,0 ^b	380±107 ^c
Nitrogen thải ra môi trường ao nuôi (kg/ha/vụ)	487±175 ^a	621±162 ^b	797±209 ^c
Tỷ lệ tích lũy trong tôm (%)	31,0±2,65 ^a	30,9±1,95 ^a	32,2±2,44 ^a
Tỷ lệ thải ra môi trường ao nuôi (%)	69,0±2,65 ^a	69,1±1,95 ^a	67,8±2,44 ^a

Các giá trị trong cùng một cột mang chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa (p<0,05).

Bảng 6 cho thấy lượng nitrogen thải ra môi trường ao nuôi tôm từ thức ăn được ước tính là khá cao, khoảng 69,0%, 69,1% và 67,8% lần lượt cho các ao có mật độ < 60 con/m², từ 60-80 con/m² và > 80-100 con/m². Lượng nitrogen này có thể được chuyển hóa trong nhiều thành phần khác nhau của môi trường, như dạng đạm vô cơ hòa tan, đạm hữu cơ được vi sinh vật hấp thụ và chuyển hóa (vi khuẩn, tảo, động vật phù du sinh và phần khác lắng đọng vào nền đáy). Trong khi đó, lượng nitrogen tích lũy trong tôm từ thức ăn theo 3 nhóm có mật độ thả nuôi lần lượt là 220, 276 và 380 kg/ha/vụ và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Tuy nhiên tỷ lệ nitrogen tích lũy trong tôm giữa các mật độ nuôi khác nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê, dao động từ 30,9-32,2%. Lượng đạm tôm chuyển hóa từ thức ăn vào mùa mưa là 15,6%N và mùa nắng là 24,8%N [10]. So với kết nghiên cứu của Thakur và cs [11], tỷ lệ đạm chuyển hóa từ thức ăn là 23-31%, lượng thải ra môi trường từ đạm thức ăn là 61-77%.

Bảng 7. Tổng lượng carbon hữu cơ chuyển hóa từ thức ăn ở các mật độ nuôi khác nhau.

Nội dung	Mật độ < 60 con/m ²	Mật độ 60-80 con/m ²	Mật độ > 80-100 con/m ²
Carbon cung cấp từ thức ăn (kg/ha/vụ)	3.847±1.368 ^a	4.888±1.224 ^b	6.410±1.693 ^c
Carbon tích lũy trong tôm (kg/ha/vụ)	699±254 ^a	879±210 ^b	1.208±340 ^c
Carbon thải ra môi trường ao nuôi (kg/ha/vụ)	3.148±1.124 ^a	4.009±1.022 ^b	5.202±1.367 ^c
Tỷ lệ tích lũy trong tôm (%)	18,0±1,53 ^a	18,0±1,18 ^a	18,8±1,44 ^a
Tỷ lệ thải ra môi trường ao nuôi (%)	81,8±1,53 ^a	82,0±1,18 ^a	81,2±1,44 ^a

TOC mà tôm tích lũy được từ thức ăn rất thấp, chỉ khoảng 18,0% đến 18,8% và sai khác không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức (bảng 7). Lượng carbon hữu cơ thải ra môi trường ao nuôi tôm là 81,8%, 82,0% và 81,2% lần lượt cho các ao có mật độ < 60 con/m², từ 60-80 con/m² và > 80-100 con/m². Lượng này có thể được chuyển hóa trong nhiều thành phần khác nhau của môi trường, như dạng carbon vô cơ hòa tan (CO₂, CH₄, HCO₃⁻, CO₃²⁻), carbon hữu cơ được vi sinh vật hấp thụ và chuyển hóa (vi khuẩn, tảo, động vật phù du sinh, phần khác lắng đọng vào nền đáy).

Bảng 8. Tổng lượng phosphor chuyển hóa từ thức ăn ở các mật độ nuôi khác nhau.

Nội dung	Mật độ < 60 con/m ²	Mật độ 60-80 con/m ²	Mật độ > 80-100 con/m ²
Phosphor cung cấp từ thức ăn (kg/ha/vụ)	166±59,0 ^a	211±52,9 ^b	277±73,0 ^c
Phosphor tích lũy trong tôm (kg/ha/vụ)	21,2±7,65 ^a	26,5±6,35 ^b	36,6±10,2 ^c
Phosphor thải ra môi trường ao nuôi (kg/ha/vụ)	145±51,5 ^a	184±46,7 ^b	240±63,3 ^c
Tỷ lệ tích lũy trong tôm (%)	12,6±1,04 ^a	12,6±0,75 ^a	13,0±1,00 ^a
Tỷ lệ thải ra môi trường ao nuôi (%)	87,4±1,04 ^a	87,4±0,75 ^a	87,0±1,00 ^a

Bảng 8 cho thấy lượng phosphor (từ thức ăn) thải ra môi trường ao nuôi tôm khá cao, chiếm 145, 184, 240 kg/ha/vụ và tỷ lệ tích lũy trong tôm là thấp (12,6±1,04, 12,6±0,75 và 13,0±1,00%) lần lượt cho các mật độ < 60 con/m², 60-80 con/m² và > 80-100 con/m². Theo Thakur và Lin [11], phospho cho vào từ thức ăn chiếm 70-91% tổng phospho đầu vào và tôm hấp thụ, chuyển hóa cho cơ thể từ 10-13%. Theo kết quả nghiên cứu của Võ Nam Sơn và cs [6], hàm lượng phosphor tích lũy trong thịt tôm và thải ra môi trường của ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại tỉnh Sóc Trăng lần lượt là 12,46% và 87,46%. Lượng thải này là khá cao, khi được thải ra môi trường các chất thải này sẽ tham gia vào quá trình chuyển hóa vật chất, có thể tạo thành những chất hay khí độc có hại cho môi trường trong điều kiện kỵ khí [12]. Điều này cho thấy, mô hình nuôi tôm thâm canh không có biện pháp xử lý nước và chất thải sẽ dẫn đến việc gây ô nhiễm môi trường.

Kết luận

Ngành nuôi tôm ở tỉnh Bạc Liêu phần lớn được người dân triển khai trong 2 vụ nuôi, tôm được nuôi ở 2 mật độ 60-80 con/m² và trên 80-100 con/m². Giống thả nuôi là PL10-PL15. Tôm nuôi được cho ăn thức ăn viên công nghiệp với FCR trung bình là 1,27. Thời gian nuôi trung bình là 98 ngày với tỷ lệ sống là 84% và năng suất ước lượng khoảng 10 tấn/ha/vụ.

Tuy nhiên, lượng C, N và P từ thức ăn được tích lũy trong cơ thể tôm rất thấp so với lượng được cung cấp từ thức ăn. Tỷ lệ nitrogen và phosphor thải ra môi trường là khá cao, có thể dẫn đến ô nhiễm môi trường, đặc biệt là các ao có mật độ nuôi lớn hơn 100 con/m². Để hạn chế việc gây ô nhiễm môi trường, một trong những giải pháp là xử lý chất thải (bao gồm nước và chất thải rắn) từ ao nuôi tôm nhằm giảm thải nitrogen và phosphor ra môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Kongkeo (2001), "Current status and development trend of aquaculture Asia Region", *Aquaculture in the third millennium, Technical proceeding of conference on Aquaculture in the third millennium*, pp.267-293.
- [2] Aquaculture Asia Pacific (2015), "Marine Shrimp in Asia in 2014: Production Trends", *Zuridah Merican*, **11(1)**, p.18.
- [3] Tổng cục Thủy sản (2012), *Báo cáo tình hình nuôi tôm nước lợ năm 2013 và giải pháp thực hiện kế hoạch năm 2014*.
- [4] Sở NN&PTNT Bạc Liêu (2015), *Báo cáo tổng kết nuôi trồng thủy sản năm 2014 và kế hoạch thực hiện năm 2015*.

[5] Long Văn Nghĩa (2017), *Đánh giá hiện trạng sử dụng thuốc, hóa chất trong nuôi tôm biển ở tỉnh Bạc Liêu*, Luận văn cao học ngành nuôi trồng thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

[6] Võ Nam Sơn, Trương Tấn Nguyên và Nguyễn Thanh Phương (2014), “So sánh đặc điểm kỹ thuật và chất lượng môi trường giữa ao nuôi tôm sú và tôm thẻ chân trắng thâm canh tại tỉnh Sóc Trăng”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **2**, tr.70-78.

[7] Phùng Thị Hồng Gấm, Võ Nam Sơn và Nguyễn Thanh Phương (2014), “Phân tích hiệu quả sản xuất các mô hình nuôi tôm thẻ chân trắng và tôm sú thâm canh ở tỉnh Ninh Thuận”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **2**, tr.37-43.

[8] Nguyễn Thanh Long và Huỳnh Thanh Hiền (2015), “Phân tích hiệu quả kỹ thuật và tài chính của mô hình nuôi tôm thẻ chân trắng ở tỉnh Cà Mau”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **1**, tr.105-111.

[9] Lê Kim Long và Đặng Hoàng Xuân Huy (2015), “Phân tích hiệu quả kỹ thuật cho các ao nuôi tôm he chân trắng tại thị xã Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **1**, tr.210-216.

[10] Tạ Văn Phương (2008), *Nghiên cứu sự biến động các yếu tố môi trường và sự tích lũy đạm, lân trong ao nuôi tôm sú thâm canh ở Vĩnh Châu - Sóc Trăng*, Luận văn cao học Trường Đại học Cần Thơ.

[11] D.P. Thakur, C.K. Lin (2003), “Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems”, *Aquacultural Engineering*, **27**, pp.159-176.

[12] C.E. Boyd and D.R. Teicher Coddington (2001), *Inland shrimp farming and the environment*, World Aquaculture Society, USA, ISSN: 1041-5602.

Nghiên cứu khả năng nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh của chồi Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) *in vitro*

Trần Thị Triều Hà*, Lã Thị Thu Hằng, Vũ Tuấn Minh,
Trần Thị Phương Nhung, Trần Thị Xuân Phương

Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế

Ngày nhận bài 20/3/2018; ngày chuyển phản biện 26/3/2018; ngày nhận phản biện 23/4/2018; ngày chấp nhận đăng 27/4/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích xây dựng quy trình nhân nhanh và tạo cây Vanilla hoàn chỉnh *in vitro*. Chồi Vanilla *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog) có bổ sung nước dừa và các chất kích thích sinh trưởng (KTST) để thăm dò khả năng nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh của chúng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường nuôi cấy cơ bản MS được bổ sung 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA và 10% nước dừa cho kết quả nhân chồi tốt nhất với 5,4 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình là 2,03 cm, số lá trung bình là 3,67 sau 8 tuần nuôi cấy. Thí nghiệm cũng cho thấy, môi trường nuôi cấy cơ bản MS bổ sung 1 mg/l NAA có tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 96,67% và số rễ đạt nhiều nhất là 3,13 rễ/chồi.

Từ khóa: *In vitro*, nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh, Vanilla.

Chỉ số phân loại: 4.6

Dặt vấn đề

Vanilla planifolia Andr. là một loài lan cho hương liệu được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Tinh dầu Vanilin được chiết xuất từ quả Vanilla là loại hương liệu đắt giá thứ hai thế giới, sau nghệ tây [1]. Trên thế giới, loài cây này được trồng nhiều ở Madagasca, Mexico, Indonesia... [2]. Thông thường, Vanilla được nhân giống bằng phương pháp truyền thống như giâm cành. Tuy nhiên, phương pháp này có hệ số nhân giống thấp, mất nhiều thời gian và hiệu quả kinh tế không cao [3, 4]. Để đáp ứng nhu cầu ngày càng cao về cây giống Vanilla, các nhà khoa học trên thế giới đã tập trung nghiên cứu, ứng dụng kỹ thuật nhân giống *in vitro* cây Vanilla và đã đạt được nhiều thành công. Các tác giả đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Vanilla thông qua nuôi cấy mô sẹo, protocorm, nuôi cấy chồi đỉnh, chồi nách... [1-11].

Việt Nam có điều kiện sinh thái phù hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Vanilla [12]. Trong những năm gần đây, cây Vanilla đã được đưa vào trồng thử nghiệm ở nhiều địa phương như Bình Thuận, Đắk Lắk, Thừa Thiên - Huế và có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt [13]. Tuy nhiên, việc cung cấp một số lượng cây giống lớn, có độ đồng đều cao hầu như chưa được thực hiện ở Việt Nam. Các công trình nghiên cứu khoa học về nhân giống *in vitro* cây Vanilla tuy đã có nhưng còn rất ít và chưa hoàn chỉnh thành quy trình sản xuất [14-16]. Vì vậy, việc nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất giống cây Vanilla *in vitro* để phục

vụ sản xuất mang ý nghĩa thực tiễn quan trọng.

Trong nghiên cứu này, các tác giả trình bày kết quả về khả năng nhân nhanh và tạo cây Vanilla hoàn chỉnh *in vitro*, làm cơ sở cho việc sản xuất một lượng lớn cây giống đáp ứng nhu cầu sản xuất.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu được sử dụng cho các thí nghiệm là chồi Vanilla *in vitro* từ công trình [16] do các tác giả thực hiện tại Phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô tế bào thực vật, Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế; chồi có kích thước khoảng 0,5 cm.

Phương pháp nghiên cứu

Nhân nhanh chồi *in vitro*: Chồi Vanilla *in vitro* được cấy lên môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog) bổ sung thêm 25 g/l đường saccharose, 6,5 g/l agar, các chất KTST là BAP (benzyl aminopurin), IBA (indole butyric acid) và nước dừa với các nồng độ khác nhau để thăm dò khả năng nhân chồi của chúng.

Tạo cây hoàn chỉnh: Các chồi *in vitro* (1,5-2 cm) tách từ các cụm chồi được cấy lên môi trường cơ bản MS bổ sung thêm 25 g/l đường saccharose, 6,5 g/l agar, các chất KTST là α -NAA (naphthlene acetic acid) với các nồng độ khác nhau để thăm dò khả năng tạo rễ và phát triển thành cây hoàn chỉnh.

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn

*Tác giả liên hệ: Email: tranthitrieha@huaf.edu.vn

Study on the rapid multiplication and planlets regeneration of *Vanilla planifolia* Andr.

Thi Trieu Ha Tran*, Thi Thu Hang La, Tuan Minh Vu,
Thi Phuong Nhung Tran, Thi Xuan Phuong Tran

College of Agriculture and Forestry, Hue University

Received 20 March 2018; accepted 27 April 2018

Abstract:

This study was worked out to determine the protocol for rapid multiplication and planlet regeneration of *Vanilla planifolia*. The explants were cultured on the Murashige and Skoog (MS) basal medium containing 3% sucrose and 0.65% agar supplemented with coconut water and different plant growth regulators, either alone or in combination. The results indicated that the MS medium supplemented with 1 mg/l BAP, 0.1 mg/l IBA and 10% coconut water was most suitable for shoot multiplication with 5.4 shoots/explant, the average shoot height of 2.03 cm, the average leaf number of 3.67. Our experiments also showed that shoots were rooted on the MS medium with 1 mg/l NAA had the highest rooting percentage of 96.67%, and the highest number of roots was 3.13 roots/plantlet.

Keywords: *In vitro*, plantlets regeneration, rapid multiplication, *Vanilla planifolia*.

Classification number: 4.6

ngẫu nhiên (CRD), lặp lại 3 lần (mỗi công thức có 6 bình, mỗi bình có 5 mẫu), thực hiện trong điều kiện nhân tạo, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 14 h/ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi: Các số liệu thí nghiệm được theo dõi sau 8 tuần nuôi cấy gồm: Số chồi/mẫu (chồi), chiều cao chồi trung bình (cm), số lá/chồi (lá), tỷ lệ chồi ra rễ (%), số rễ/cây (rễ), chiều dài rễ (cm).

Số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel và Statistictics 10.0.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 6/2017 tại Phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô tế bào thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Khả năng nhân nhanh của chồi *Vanilla in vitro*

Mục đích của kỹ thuật nhân giống vô tính *in vitro* là tạo ra một số lượng lớn các cá thể đồng nhất về mặt di truyền, sinh trưởng và phát triển một cách đồng đều, mang những đặc điểm hoàn toàn giống với cá thể mẹ. Trong giai đoạn này, ngoài các chất dinh dưỡng cần thiết, môi trường nuôi cấy cần phải bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin và cytokinin. BAP là một trong những cytokinin tổng hợp được dùng phổ biến trong phòng thí nghiệm do nó có hoạt tính cao và bền với nhiệt độ. Loại cytokinin này ảnh hưởng rất rõ rệt lên sự hình thành và phân hóa cơ quan của thực vật, đặc biệt là sự phân hóa chồi [17].

Thí nghiệm này nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP (mg/l) đến khả năng nhân nhanh của chồi *Vanilla in vitro*. Kết quả sau 8 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh của chồi *Vanilla in vitro*.

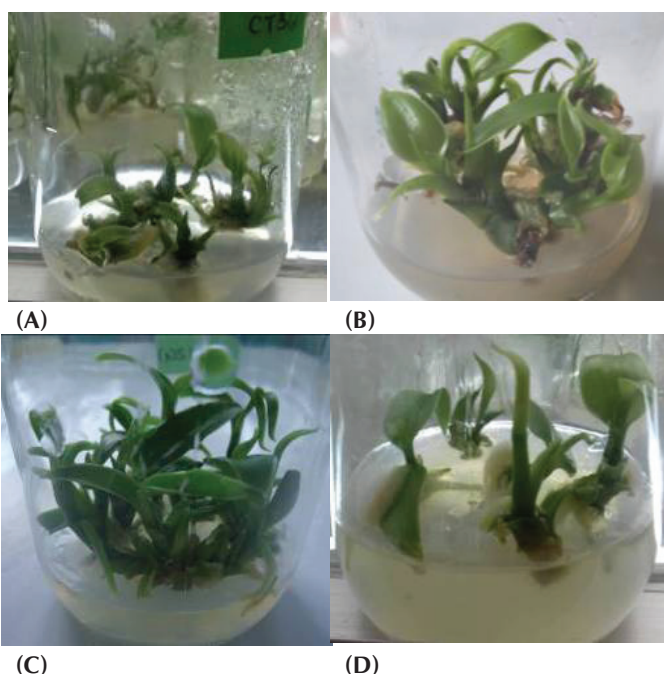
BAP (mg/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
0 (Đ/C)	1,47 ^c	4,68 ^a	2,10 ^c
0,5	3,17 ^{ab}	1,47 ^b	2,93 ^b
1	3,70 ^a	1,40 ^{bc}	3,43 ^a
1,5	2,90 ^b	1,16 ^{bc}	1,17 ^d
2	2,83 ^b	0,83 ^c	0,80 ^d
LSD _{0,05}	0,59	0,60	0,49

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái (a, b, c...) khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức ở mức $\alpha = 0,05$. Đ/C: đối chứng.

Số liệu ở bảng 1 cho thấy, khi bổ sung BAP vào môi trường nuôi cấy có tác dụng thúc đẩy tạo chồi khá tốt. Nồng độ BAP tăng từ 0 đến 1 mg/l thì hệ số nhân chồi tăng lên. Môi trường bổ sung BAP ở nồng độ 1 mg/l cho kết quả tốt nhất (hình 1A). Chồi sinh trưởng tốt, khỏe và xanh, số chồi tạo thành lớn nhất, sau 8 tuần nuôi đạt 3,7 chồi/mẫu. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ BAP từ 1,5 đến 2 mg/l thì hệ số nhân chồi bắt đầu giảm xuống nhưng vẫn cao hơn so với công thức đối chứng.

So sánh với kết quả nghiên cứu của tác giả Abebe và cộng sự [8] thì kết quả của chúng tôi thu được có khả quan hơn. Các tác giả này khi nuôi cấy chồi *Vanilla* trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BAP, số chồi tạo thành sau 45 ngày nuôi cấy là 3,17 chồi/mẫu [8].

Trong nhân giống *in vitro*, sự kết hợp giữa hai nhóm chất KTST là auxin và cytokinin với một tỷ lệ thích hợp có ý nghĩa quan trọng quyết định tăng hệ số nhân chồi và chất lượng chồi [17]. Vì vậy, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu ảnh



Hình 1. Chồi Vanilla *in vitro* sau 8 tuần nuôi. (A) Chồi Vanilla trên môi trường có 1 mg/l BAP; (B) Chồi Vanilla trên môi trường có 1 mg/l BAP và 0,1 mg/l IBA; (C) Chồi Vanilla trên môi trường có 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA và 10% nước dừa; (D) Cây Vanilla trong môi trường bổ sung 1 mg/l α -NAA.

hưởng kết hợp giữa BAP và IBA đến hệ số nhân chồi. Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng chồi nách *in vitro* cấy lên môi trường nuôi cấy cơ bản bổ sung BAP (1 mg/l) kết hợp với IBA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thí nghiệm sau 8 tuần nuôi được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP kết hợp với IBA đến khả năng nhân nhanh của chồi Vanilla.

Chất KTST (mg/l)		Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
BAP	IBA			
1 (Đ/C)	0	3,7 ^b	1,59 ^a	3,43 ^a
1	0,1	4,33 ^a	1,40 ^a	3,03 ^a
1	0,2	3,2 ^b	1,37 ^a	2,27 ^b
1	0,3	2,27 ^c	1,35 ^a	1,33 ^c
1	0,4	2,5 ^c	1,32 ^a	1,67 ^c
LSD _{0,05}		0,58	0,28	0,55

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái (a, b, c...) khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức ở mức $\alpha = 0,05$.

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, môi trường có 1 mg/l BAP kết hợp với 0,1 mg/l IBA cho kết quả tạo chồi tốt nhất với số chồi/mẫu tạo thành sau 8 tuần là 4,33 chồi, chiều cao chồi và số lá cũng lớn nhất (hình 1B). Trên môi trường này, chồi sinh trưởng mạnh, thân và lá có kích thước lớn. Tuy nhiên,

khi tiếp tục tăng nồng độ IBA lên 0,2-0,4 mg/l thì hệ số nhân cũng như số lá giảm trong khi chiều cao thì không thay đổi. Theo Abebe và cộng sự (2009), khi nuôi cấy chồi trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BAP số chồi/mẫu sau 45 ngày nuôi cấy là 3,17. Khi kết hợp với α -NAA, một chất trong nhóm auxin cùng với IBA, nồng độ từ 0,5 đến 1,25 mg/l thì các tác giả này thu được kết quả tốt nhất ở môi trường có bổ sung 1 mg/l BAP kết hợp với 0,75 mg/l α -NAA với số chồi/mẫu là 3,5 chồi [8].

Trong nghiên cứu nhân giống *in vitro*, đặc biệt là trong nhân giống *in vitro* các loài lan, người ta thường bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy để cải thiện hệ số nhân chồi và chất lượng chồi. Để tiếp tục nghiên cứu làm tăng hệ số nhân chồi Vanilla *in vitro*, chúng tôi sử dụng môi trường cơ bản MS có 1 mg/l BAP và 0,1 mg/l IBA bổ sung thêm nước dừa với các nồng độ 5-20% vào môi trường nuôi cấy để khảo sát ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân nhanh và chất lượng chồi Vanilla. Kết quả sau 8 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân nhanh của chồi Vanilla *in vitro*.

Nước dừa (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
0 (Đ/C)	4,33 ^b	1,59 ^{bc}	3,03 ^b
5	4,7 ^b	1,38 ^c	3,1 ^b
10	5,4 ^a	2,03 ^a	3,67 ^a
15	3,57 ^c	1,59 ^{bc}	3,03 ^b
20	3,43 ^c	1,97 ^{ab}	2,9 ^b
LSD _{0,05}	0,63	0,40	0,52

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái (a, b, c...) khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức ở mức $\alpha = 0,05$.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, môi trường bổ sung 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA và 10% nước dừa cho kết quả tốt nhất. Số chồi/mẫu đạt 5,4 chồi, chiều cao chồi trung bình là 2,03 cm và số lá/chồi đạt 3,67 lá. Chồi sinh trưởng khỏe mạnh, lá có màu xanh đậm (hình 1C). Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ nước dừa lên 15 và 20% thì không làm tăng số chồi tạo thành mà ngược lại. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả P. Giridhar, G.A. Ravishankar khi nghiên cứu nhân nhanh chồi Vanilla *in vitro* cũng xác định rằng bổ sung nước dừa với nồng độ 10% có tác dụng làm tăng hệ số nhân và chất lượng chồi [1].

Tạo cây Vanilla hoàn chỉnh *in vitro*

Trong thí nghiệm này, các chồi Vanilla *in vitro* có kích thước 1,5-2 cm tách từ cụm chồi được cấy lên môi trường nuôi cấy cơ bản MS có bổ sung α -NAA với các nồng độ

khác nhau để thăm dò khả năng tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả sau 8 tuần được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh của chồi Vanilla *in vitro*.

α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/cây (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
0 (Đ/C)	70	1,5 ^c	4,50 ^b
0,5	80	2,23 ^b	5,15 ^{ab}
1	96,67	3,13 ^a	6,90 ^a
1,5	80	1,93 ^{bc}	4,65 ^b
2	83,33	2,07 ^{bc}	4,42 ^b
<i>LSD</i> _{0,05}		0,65	1,84

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái (a, b, c,...) khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức ở mức mức $\alpha = 0,05$.

Số liệu ở bảng 4 cho thấy, ở công thức đối chứng khi không bổ sung chất kích thích tạo rễ là α -NAA chồi Vanilla cũng có khả năng tạo rễ với tỷ lệ khá cao là 70%, tuy nhiên số lượng rễ/cây thấp (1,5 rễ/cây), rễ nhỏ. Khi nồng độ α -NAA tăng từ 0 đến 1 mg/l thì tỷ lệ chồi ra rễ càng tăng dần, và đạt kết quả tốt nhất ở môi trường có bổ sung 1 mg/l α -NAA. Tỷ lệ chồi ra rễ đạt cao nhất (96,67%), cây sinh trưởng khỏe mạnh, số rễ trung bình trên cây đạt 3,13 rễ, chiều dài rễ đạt 6,90 cm (hình 1D). Tiếp tục tăng nồng độ α -NAA lên đến 2 mg/l thì tỷ lệ chồi ra rễ giảm dần nhưng vẫn cao hơn so với công thức đối chứng.

Nghiên cứu của Zuraida và cs (2013) cho thấy, môi trường MS có 1 mg/l α -NAA là thích hợp cho chồi Vanilla *in vitro* tạo rễ, sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ tạo rễ đạt 80% với 2,5 rễ/chồi, chiều dài rễ là 2,45 cm [4]. So với kết quả này, kết quả của chúng tôi có phần khả quan hơn với tỷ lệ chồi tạo rễ là 96,67%, số rễ trung bình trên một chồi là 3,13.

Kết luận

Qua kết quả nghiên cứu khả năng nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh của chồi Vanilla *in vitro*, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

- Môi trường cơ bản MS có 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA và 10% nước dừa cho kết quả nhân chồi tốt nhất với số chồi/mẫu tạo thành sau 8 tuần nuôi là 5,4 chồi. Chồi sinh trưởng khỏe mạnh.

- Môi trường cơ bản MS có 1 mg/l α -NAA cho kết quả tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất, có tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 96,67%, số rễ trung bình trên chồi là 3,13.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. Giridhar, G.A. Ravishankar (2004), "Efficient micropropagation of Vanilla planifolia Andr. under the influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk", *Indian J. Biotech.*, **3**, pp.113-118.
- [2] S. Menon, N. Nayeem (2013), "Vanilla planifolia: A review of a plant commonly used as flavouring agent", *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **20(2)**, pp.225-228.
- [3] K. Kalimuthu, R. Senthilkumar, N. Murugalatha (2006), "Regeneration and mass multiplication of Vanilla planifolia Andr: a tropical orchid", *Curr. Sci.*, **91(10)**, pp.1401-1403.
- [4] A.R. Zuraida, K. Izzati, O.A. Nazreena, W.S.W. Zaliha (2013), "A Simple and Efficient Protocol for the Mass Propagation of Vanilla planifolia", *American Journal of Plant Sciences*, **4**, pp.1685-1692.
- [5] P.S. George, G.A. Ravishankar (1997), "In vitro multiplication of Vanilla planifolia using axillary bud explants", *Plant Cell Rep.*, **16**, pp.490-494.
- [6] S. Geetha, S.A. Shetty (2000), "In vitro propagation of Vanilla planifolia, a tropical orchid", *Curr. Sci.*, **79(6)**, pp.886-889.
- [7] H.E.L. Espinosa, J. González, B. García-Rosas, A. Córdoba, L. Pérez, L.G. Iglesias-Andreu, N. Santana-Buzzy (2008), "In vitro Clonal Propagation of Vanilla (Vanilla planifolia 'Andrews')", *Hort. Sci.*, **43(2)**, pp.454-458.
- [8] Z. Abebe, A. Mengesha, A. Teresa, W. Tefera (2009), "Efficient in vitro multiplication protocol for Vanilla planifolia using nodal explants in Ethiopia", *Afr. J. Biotechnol.*, **8**, pp.6817-6821.
- [9] A. Mengesha, B. Ayenew, E. Gebremariam, T. Tadesse (2012), "Micro-Propagation of Vanilla planifolia Using Enset (*Ensete ventricosum*) Starch as a Gelling Agent", *Current Research Journal of Biological Sciences*, **4(4)**, pp.519-525.
- [10] S. Ruby, B. Sunil (2016), "In vitro sterilization protocol of Vanilla planifolia explants for micropropagation", *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences*, **4(11)**, pp.135-142.
- [11] B. Janarthanam, S. Seshadri (2006), "Plantlet regeneration from leaf derived callus of Vanilla planifolia Andr", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **44(2)**, pp.84-89.
- [12] Vũ Ngọc Long, Trần Giới (2013), *Khám phá tính đa dạng sinh học các loài Lan vani (Orchidaceae) trong hệ thực vật tỉnh Khánh Hòa*, www.vast.ac.vn/tin-tuc-su-kien/tin-khoa-hoc/trong-nuoc/1633-kham-pha-tinh-da-dang-sinh-hoc-cac-loai-lan-vani-orchidaceae-trong-he-thuc-vat-tinh-khanh-hoa.
- [13] <http://www.khuyennongtpcm.com/index.php?nu=3&s=600012&id=1299>.
- [14] Vũ Thị Mỹ Liên, Nguyễn Văn Uyên và cs (1993), *Nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP Hồ Chí Minh, tr.103-104.
- [15] Vũ Ngọc Phượng, Lê Hoàn Hào, Thái Xuân Du (2007), *Nhân giống vô tính cây Vani bằng nuôi cấy mô*, Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học nhiệt đới.
- [16] Trần Thị Triều Hà, Phan Thị Phương Nhi, Lê Thị Thu Hằng (2017), "Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu in vitro cây Vanilla", *Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam*, **23(12)**, tr.41-44.
- [17] Nguyễn Hoàng Lộc, (2011). *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật - Các khái niệm và ứng dụng*, Nhà xuất bản Đại học Huế, tr.28-32.

Nghiên cứu nhân giống lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào

Nguyễn Thị Lại^{1*}, Phạm Hương Sơn¹, Vũ Mạnh Hải², Tống Xuân Trung¹

¹Viện Ứng dụng Công nghệ

²Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 6/12/2017; ngày chuyển phản biện 12/12/2017; ngày nhận phản biện 17/1/2018; ngày chấp nhận đăng 26/1/2018

Tóm tắt:

Trong bài báo này, các tác giả trình bày kết quả nghiên cứu nuôi cấy lát mỏng tế bào cây lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe). Nguyên liệu ban đầu là lát cắt mỏng theo chiều ngang (tTCL - traverse thin cell layer) của chồi *in vitro*. Kết quả cho thấy, môi trường gây hiệu ứng tối ưu để sản sinh *protocorm - like bodies* là môi trường VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,5 mg/l BA (tạo ra 30,1 *protocorm - like bodies*/lát mỏng sau 6 tuần nuôi cấy). Cụm *protocorm - like bodies* được cấy lên môi trường VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than hoạt tính + 2 g/l peptone + 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 30 g/l dịch nghiền bí ngô + 1 g/l tảo *Spirulina* cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất, đạt 16,82 chồi/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy. Môi trường cấy chồi *in vitro* để tạo cây con hoàn chỉnh VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than hoạt tính + 1,0 mg/l IBA là thích hợp nhất với số rễ được hình thành là 7,3 rễ/cây sau 6 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: Cây thuốc, Hoàng thảo Nghệ tâm, nuôi cấy lát mỏng tế bào, PLBs, tái sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) là loài lan rừng đẹp, có giá trị y học và kinh tế cao, phân bố tập trung ở Trung Quốc, Lào và Việt Nam (các tỉnh Thái Nguyên, Lai Châu, Nghệ An). Cây thường mọc ở các khu rừng lá kim nhiều rêu và ẩm ướt ở độ cao 400-1.500 m [1, 2].

Theo y học cổ truyền Trung Quốc, lan Nghệ tâm có chứa hoạt chất chống ung thư dạ dày và ung thư phổi, chất chống đông máu [3], điều trị bệnh tiểu đường type 2 [4].

Do vừa có giá trị làm cây hoa cảnh vừa làm cây dược liệu nên lan Hoàng thảo Nghệ tâm đang bị khai thác với số lượng lớn. Mặt khác, tỷ lệ nảy mầm từ hạt trong tự nhiên rất thấp và vùng phân bố của Nghệ tâm bị phá hủy nên loài cây này đang ở trong tình trạng gần như tuyệt chủng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào lan Hoàng thảo Nghệ tâm nhằm tạo nguồn cây giống sạch bệnh, đồng đều, giữ được đặc trưng giống với số lượng lớn trong một thời gian ngắn, giá cả phù hợp, đáp ứng nhu cầu của thị trường và góp phần bảo tồn loài lan dược liệu quý hiếm của Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: Mẫu giống Hoàng thảo Nghệ tâm tách lấy đỉnh sinh trưởng nuôi cấy tạo chồi. Vật liệu sử dụng là chồi nuôi cấy 6 tuần tuổi.

Địa điểm nghiên cứu: Phòng nuôi cấy mô của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Nhiệt độ phòng 25±2°C, ẩm độ 60-70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1.500-2.300 lux.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu cảm ứng tạo PLBs từ lát mỏng tế bào: Chồi *in vitro* tách từ chồi nảy mầm của đỉnh sinh trưởng được nuôi cấy trên môi trường VW có kích thước 1-2 cm, cắt chồi thành những lát mỏng theo chiều ngang (tTCL) 1,0-1,5 mm. Lát mỏng tế bào được cấy lên môi trường cơ bản VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar, bổ sung BA (0,5-3 mg/l), 1,5 mg/l BA + α-NAA (0,5-2,0 mg/l), pH 5,5 để khảo sát khả năng phát sinh PLBs từ tTCL.

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

Micropropagation of *Dendrobium loddigesii* Rolfe by thin cell layer culture

Thi Lai Nguyen^{1*}, Huong Son Pham¹,
Manh Hai Vu², Xuan Trung Tong¹

¹National Center for Technological Progress

²Vietnam Academy Agricultural Science

Received 6 December 2017; accepted 26 January 2018

Abstract:

With the aim at preserving and developing highly precious *Dendrobium loddigesii* Rolfe, a study on its multiplication was carried out, in which a traversed thin cell layer (tTCL) excised from *in vitro* shoot tips was cultured in different media. Results showed that highest number of *protocorm-like bodies* (PBLs)/tTCL produced was obtained on the VW medium supplemented with 20 g/l sucrose + 10% coconut water + 7 g/l agar + 1.5 mg/l BA (the obtained number was 30.1 PBLs/tTCL at 6 weeks after culture) whereas the highest quantity of generated shoots was recorded in the VW medium added by 20 g/l sucrose + 10% coconut water + 7 g/l agar + 1 g/l activated carbon + 2 g/l peptone + 1.5 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA + 30 g/l mashed pumpkin + 1 g/l *Spirulina* algae (16.82 shoots/explant) at 8 weeks after culture. In addition, the VW medium supplemented with 20 g/l sucrose + 10% coconut water + 7 g/l agar + 1 g/l activated carbon + 1.0 mg/l IBA was considered to be most suitable for root development and growth of *in vitro* plants (7.3 healthy roots/plant after 6 weeks).

Keywords: *Dendrobium loddigesii* Rolfe, medicinal plant, *protocorm-like bodies*, shoot regeneration, thin cell layer.

Classification numbers: 4.6

Phương pháp tái sinh chồi từ PLBs: Các PLBs chất lượng tốt thu được từ thí nghiệm trên được tách thành cụm nhỏ có kích thước khoảng 3-4 mm, sau đó cấy lên môi trường cơ bản VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than hoạt tính + 2 g/l peptone; bổ sung 1,5 mg/l BA + IBA (0,5-2,0 mg/l); (10-50 g/l) dịch nghiền bí ngô; 30 g/l dịch nghiền bí ngô + (1-3 g/l) tảo *Spirulina*; pH 5,5 để khảo sát khả năng phát sinh chồi từ PLBs.

Phương pháp nghiên cứu tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh: Các chồi sau khi thu được từ thí nghiệm trên, có chiều cao

khoảng 2-3 cm, 2-3 lá, được cấy chuyển sang môi trường cơ bản VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than hoạt tính, bổ sung IBA, PAA từ 0,5-2,0 mg/l, pH 5,5 để khảo sát khả năng hình thành rễ.

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ với 3 lần nhắc lại.

Theo dõi, đánh giá theo các chỉ tiêu: Tỷ lệ mẫu tạo PLBs (%), số PLBs/tTCL, chiều cao cây (cm), số lá (lá), số rễ (rễ), chiều dài rễ (cm)... sau 6 tuần nuôi cấy. Số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm)... tái sinh chồi từ PLBs được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy.

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và phần mềm Excel 2007.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Nghiên cứu tạo PLBs từ tTCL

Nghiên cứu ảnh hưởng của BA lên khả năng tạo PLBs từ tTCL: Lát mỏng tế bào (tTCL) được cấy lên môi trường VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar bổ sung BA từ 0,5-3,0 mg/l để khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng phát sinh PLBs. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy (trình bày ở bảng 1) cho thấy: Bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy có tác động tích cực đến khả năng tạo PLBs trực tiếp từ tTCL, trong đó môi trường VW bổ sung 1,5 mg/l BA đem lại hiệu quả tốt nhất thể hiện qua số PLBs hình thành cao nhất (30,1 PBLs/tTCL với tỷ lệ tTCL phát sinh PLBs là 52%). Công thức đối chứng không bổ sung BA không có khả năng phát sinh PLBs.

Trong phạm vi nồng độ BA từ 1,5 đến 3,0 mg/l khả năng tạo PLBs tỷ lệ nghịch với sự tăng nồng độ, điều này có thể do nồng độ BA cao đã gây ức chế khả năng phát sinh PLBs từ tTCL. Kết quả thấp nhất khi bổ sung nồng độ 3,0 mg/l BA vào môi trường với tỷ lệ tTCL phát sinh PLBs chỉ đạt 10% với 8,5 PBLs/tTCL.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA lên khả năng phát sinh PLBs từ tTCL (6 tuần nuôi cấy).

Nồng độ BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo PLBs (%)	Số PLBs/tTCL
0 (Đ/C)	0,0 g	0,0 g
0,5	8,2 f	10,40 e
1,0	21,0 c	21,60 b
1,5	52,0 a	30,10 a
2,0	28,0 b	17,20 c
2,5	16,5 d	15,0 d
3,0	10,0 e	8,50 f
LSD (0,05)	2,61	1,15

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BA và α NAA lên khả năng tạo PLBs từ tTCL:

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α NAA lên khả năng tạo PLBs từ tTCL (6 tuần nuôi cấy)

Chất kích thích sinh trưởng (mg/l)		Tỷ lệ mẫu tạo PLBs (%)	Số PLBs/tTCL
BA	α NAA		
1,5	0 (Đ/C)	52,03a	30,12 a
1,5	0,5	38,0 b	21,00 b
1,5	1,0	31,0 b	19,00 c
1,5	1,5	21,9 c	12,80 d
1,5	2,0	16,0 d	7,00 e
LSD (0,05)		7,6	0,4

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Bảng 2 trình bày số lượng PLBs phát sinh trên môi trường cơ bản bổ sung thêm 1,5 mg/l BA và α NAA (0,5-2,0 mg/l) cho thấy: Việc bổ sung α NAA kết hợp BA vào môi trường đã không làm tăng tỷ lệ tTCL phát sinh PLBs cũng như số PLBs hình thành từ tTCL so với môi trường chỉ bổ sung BA.

Kết quả chúng tôi thu được cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thanh Tùng và cs (2010) [5] khi tái sinh chồi từ lát cắt mỏng tế bào loài lan *Dendrobium aduncum*, rằng khả năng tạo PLBs từ tTCL trên môi trường bổ sung riêng lẻ BA cho kết quả tốt hơn khi bổ sung BA kết hợp α NAA. Nguyên nhân có thể do α NAA kết hợp với BA có ảnh hưởng không tốt tới quá trình cảm ứng PLBs từ tTCL đối với loài lan *Dendrobium loddigesii* Rolfe.

Nghiên cứu tái sinh chồi từ PLBs

Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp (BA + IBA) lên khả năng tái sinh chồi từ PLBs: Cụm PLBs (3-4 mm) được cấy chuyển sang môi trường VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than hoạt tính + 2 g/l peptone + 1,5 mg/l BA kết hợp với 0,5-2,0 mg/l IBA để thăm dò khả năng tái sinh chồi từ PLBs. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp (BA + IBA) lên khả năng tái sinh chồi từ PLBs (sau 8 tuần nuôi cấy).

Chất kích thích sinh trưởng (mg/l)		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
BA	IBA			
1,5	0 (Đ/C)	1,52 e	1,30 c	Chồi nhỏ, lá bé
1,5	0,5	6,80 a	2,86 a	Chồi to, lá màu xanh
1,5	1,0	5,40 b	2,30 b	Chồi bình thường, lá màu xanh
1,5	1,5	4,22 c	2,02 b	Chồi bình thường, lá màu xanh
1,5	2,0	3,30 d	1,82 b	Chồi nhỏ và yếu, lá màu vàng nhạt
LSD (0,05)		0,8	0,5	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Nhận xét được rút ra là: Bổ sung tổ hợp BA + IBA vào môi trường nuôi cấy có tác động rõ rệt đến quá trình hình thành chồi từ cụm PLBs sau 8 tuần nuôi cấy. Ở mức nồng độ 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA, tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất đạt 6,8 chồi/mẫu với chiều cao chồi đạt 2,86 cm, cao hơn hẳn so với đối chứng không bổ sung IBA (tỷ lệ tái sinh 1,52 chồi/mẫu, chiều cao chồi 1,3 cm). Khi nồng độ IBA tiếp tục tăng, tỷ lệ tái sinh chồi và chiều cao chồi lại có xu hướng giảm, chứng tỏ ngưỡng nồng độ IBA từ 1,0 đến 2,0 mg/l khi kết hợp với 1,5 mg/l BA đã ức chế quá trình hình thành chồi, chồi nhỏ và yếu, lá màu vàng nhạt.

Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch nghiền bí ngô đến khả năng tái sinh chồi từ PLBs: Theo Tatjana Rakcejeva, et al. (2011) [6] trong dịch nghiền của bí ngô rất giàu carotenoid, vitamin C, vitamin E, B1, B6, P, K, Mg, Fe, phenolic, flavonoid, acid amin, pectin... Nhằm thăm dò khả năng tái sinh chồi từ PLBs chúng tôi bổ sung dịch nghiền của bí ngô ở các nồng độ khác nhau vào môi trường VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than hoạt tính + 2 g/l peptone + 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của dịch nghiền bí ngô đến khả năng tái sinh chồi từ PLBs (sau 8 tuần nuôi cấy).

Dịch nghiền bí ngô (g/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0,0 (Đ/C)	6,81 d	2,85 b	Chồi to, lá màu xanh
10	7,50 c	3,00 b	Chồi to, lá màu xanh
20	8,80 b	3,40 b	Chồi to, lá màu xanh
30	10,60 a	4,20 a	Chồi to, khỏe, lá màu xanh đặc trưng
40	8,90 b	3,20 b	Chồi to, lá màu xanh đặc trưng
50	7,60 c	2,92 b	Chồi nhỏ, lá bé màu xanh nhạt
LSD (0,05)	0,56	0,7	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Số liệu bảng 4 cho thấy: Dịch nghiền bí ngô có tác động tốt đến sự hình thành chồi từ cụm PLBs. Sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ tái sinh chồi và chiều cao chồi đạt cao nhất ở nồng độ 30 g/l dịch nghiền bí ngô (10,6 chồi/mẫu và chiều cao chồi 4,2 cm). Tuy nhiên, nếu bổ sung ở nồng độ cao hơn 30 g/l thì số chồi và chiều cao chồi lại có xu hướng giảm đi.

Nghiên cứu ảnh hưởng của bột tảo *Spirulina* với dịch nghiền bí ngô đến khả năng tái sinh chồi từ PLBs:

Bảng 5. Ảnh hưởng của bột tảo *Spirulina* với dịch nghiền bí ngô đến khả năng tái sinh chồi từ PLBs.

Tảo <i>Spirulina</i> (g/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0,0 (Đ/C)	10,59 c	4,20 b	Chồi to, khỏe, lá màu xanh đặc trưng
1	16,82 a	6,14 a	Chồi to, khỏe, lá màu xanh bóng
2	14,50 b	5,00 ab	Chồi to, khỏe, lá màu xanh đặc trưng
3	11,24 c	4,50 b	Chồi nhỏ, lá bé màu xanh nhạt
LSD (0,05)	2,16	1,42	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Qua số liệu bảng 5 chúng tôi nhận thấy: Đối với bột tảo *Spirulina*, trong môi trường VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 1,0 g/l than hoạt tính + 2 g/l peptone + 30 g/l dịch nghiền bí ngô, bổ sung 1 g/l bột tảo *Spirulina* cho kết quả tỷ lệ tái sinh chồi và chiều cao chồi cao nhất (16,82 chồi/mẫu, chiều cao chồi 6,14 cm), chồi to, khỏe, lá màu xanh bóng. Điều này là do trong tảo *Spirulina* có chứa nhiều amino acid tự do, các loại vitamin như A, B và E thúc đẩy quá trình trao đổi chất, chống sự nâu hóa mẫu cấy, giúp mẫu cấy hấp thụ dưỡng chất tốt hơn, sinh trưởng và phát triển mạnh, làm gia tăng số chồi, chiều cao chồi...[7]. Khi tăng nồng độ tảo *Spirulina* trên 1 g/l, khả năng tái sinh chồi từ PLBs bị giảm xuống, thậm chí việc tăng trưởng chiều cao chồi cũng bị chậm lại.

Nghiên cứu tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Nghiên cứu ảnh hưởng của IBA và PAA đến khả năng tạo rễ và sinh trưởng của chồi *in vitro*: Cây con *in vitro* hoàn chỉnh cần phải có bộ rễ phát triển tốt, vì vậy chúng tôi đã bổ sung vào môi trường nuôi cấy VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than hoạt tính, các chất kích thích IBA và PAA ở các nồng độ khác nhau nhằm nâng cao khả năng hình thành và sinh trưởng của bộ rễ lan Nghệ tâm, qua đó thúc đẩy sự tăng trưởng về thân lá. Kết quả thể hiện ở bảng 6.

Số liệu bảng 6 cho thấy: Bổ sung IBA và PAA vào môi trường nuôi cấy đã có tác dụng tích cực đến chiều cao cây, số lá và sự hình thành rễ từ chồi *in vitro*. Tại thời điểm 6 tuần sau nuôi cấy, cây con ở nồng độ 1 mg/l IBA và 0,5 mg/l PAA sinh trưởng tốt nhất, các chỉ tiêu chiều cao cây, số lá/cây, số rễ/cây, chiều dài rễ đạt tương ứng là 6,5 cm; 5,3 lá/cây; 7,3 rễ/cây; 2,87 cm (ở công thức bổ sung 1 mg/l

IBA) và 6,16 cm; 5,18 lá/cây; 6,5 rễ/cây; 2,46 cm (ở công thức bổ sung 0,5 mg/l PAA), cao hơn hẳn so với đối chứng không bổ sung (chiều cao cây chỉ đạt 3,5-3,53 cm; số lá 3,0 lá/cây; số rễ 2,5 rễ/cây và chiều dài rễ 1,1-1,12 cm).

Bảng 6. Ảnh hưởng của IBA và PAA đến khả năng tạo rễ và sinh trưởng của chồi *in vitro* (sau 6 tuần nuôi cấy).

Nồng độ IBA (mg/l)	Nồng độ PAA (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
0,0 (Đ/C)	-	3,50 c	3,00 c	2,50 e	1,12 c
0,5	-	5,30 b	4,20 b	6,20 b	2,13 ab
1,0	-	6,50 a	5,30 a	7,30 a	2,87 a
1,5	-	5,00 b	4,08 b	4,90 c	1,92 b
2,0	-	4,60 b	4,00 b	3,70 d	1,26 bc
LSD (0,05)		0,93	0,6	0,32	0,74
-	0,0 (Đ/C)	3,53 c	3,00 c	2,50 e	1,10 bc
-	0,5	6,16 a	5,18 ab	6,50 a	2,46 a
-	1,0	5,42 ab	5,46 a	5,40 b	2,00 ab
-	1,5	5,10 b	5,08 b	4,50 c	1,30 bc
-	2,0	4,20 c	5,02 b	3,60 d	0,92 c
LSD (0,05)		0,79	0,35	0,34	0,91

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Tuy nhiên, khi tăng nồng độ IBA trên 1 mg/l và PAA trên 0,5 g/l kết quả có chiều ngược lại: Số rễ giảm, rễ mảnh và ngắn và như vậy, ngưỡng nồng độ 1,0 mg/l với IBA và 0,5 g/l với PAA được coi là phù hợp.

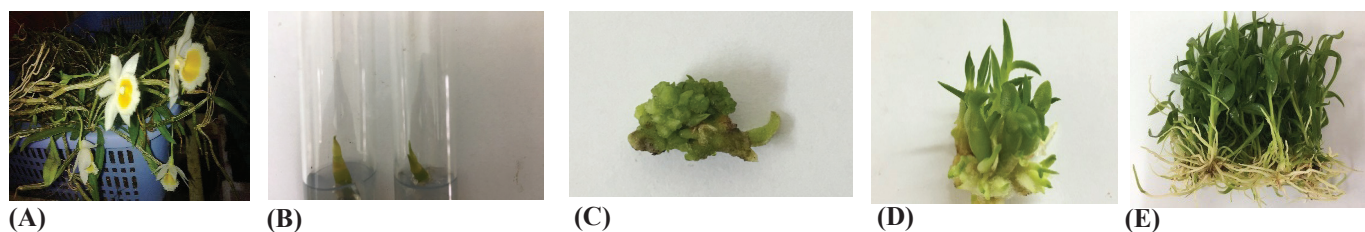
Kết luận

Qua nghiên cứu từng giai đoạn cho thấy:

- Giai đoạn tạo PLBs: Môi trường VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l BA phù hợp nhất cho việc nuôi cấy lát cắt mỏng chồi *in vitro* (1,0-1,5 mm), sau 6 tuần nuôi cấy đạt 52% tTCL phát sinh PLBs với 30,1 PLBs/tTCL.

- Giai đoạn tái sinh chồi: Môi trường VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than hoạt tính + 2 g/l peptone + 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 30 g/l dịch nghiền bí ngô + 1 g/l tảo *Spirulina* có tác dụng tốt làm tăng số lượng chồi và chiều cao chồi *in vitro* nhận từ cụm PLBs (3-4 mm). Sau 8 tuần nuôi cấy 16,82 chồi/mẫu được hình thành với chiều cao chồi đạt 6,14 cm.

- Giai đoạn tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh: Môi trường VW + 20 g/l sucrose + 10% nước dừa + 7 g/l agar + 1,0 g/l than



Hình 1. Nuôi cấy lát mỏng tế bào lan Hoàng thảo Nghệ tây (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) (A) Cây lan Hoàng thảo Nghệ tây; (B) Chồi nảy mầm từ đỉnh sinh trưởng; (C) Cảm ứng PLBs từ lát mỏng tế bào (tTCL); (D) Tái sinh chồi từ PLBs; (E) Cây *in vitro* hoàn chỉnh.

hoạt tính + 1 mg/l IBA đem lại hiệu quả tốt nhất trong tạo cây *in vitro* lan Nghệ tây hoàn chỉnh, sau 6 tuần nuôi cấy, cây con có chiều cao 6,5 cm với 5,3 lá/cây, 7,3 rễ/cây và chiều dài rễ 2,87 cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Tiến Bản (chủ biên) (2005), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, **3**, tr.574.
- [2] L. Averyanov, A. Averyanova (2005), "Rare species of orchids (Orchidaceae) in the flora of Vietnam", *Turczaninowia*, **8(1)**, p.60.
- [3] A.C. Tsai, S.L. Pan, C.H. Liao, J.H. Guh, S.W. Wang, H.L. Sun, Y.N. Liu, C.C. Chen, C.C. Shen, Y.L. Chang, C.M. Teng (2010), "Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth *in vitro* and *in vivo*", *Cancer Lett.*, **292(2)**, pp.163-170.
- [4] J.P. Zhang, X.L. Zheng, J.Z. Hong, J.C. Chen, Y.Y. Zheng, J.Z. Xin, Q.Y. Wang, K.D. Zhu, X.N. Wang, H. Shi (2011), "*Dendrobium* compound in treating 90 cases of type 2 diabetes mellitus", *J. Fujian Univ. TCM*, **21**, pp.6-10.
- [5] Nguyễn Thanh Tùng, Lê Văn Điệp, Nguyễn Minh Trung, Trương Thị Bích Phượng (2010), "Áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo Thân gầy (*Dendrobium aduncum*)", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **8(3)**, tr.361-367.
- [6] Tatjana Rakcejeva, Ruta Galoburda, Liga Cude, Envija Strautniece (2011), "Use of dried pumpkins in wheat bread production", *Procedia Food Science*, pp.441-447.
- [7] B. Dal, Z.S. Gerencsér, Z.S. Szendrő, C. Mugnai, M. Cullere, S. Ruggeri, S. Mattioli, C. Castellini, A. Dalle Zotte (2014), "Effect of dietary supplementation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and *Thyme* (*Thymus vulgaris*) on rabbit meat appearance, oxidative stability and fatty acid profile during retail display", *Meat Sci.*, **96 (1)**, pp.114-119.

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 5 - May 2018

Đánh giá hiệu quả vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu trong điều trị bệnh nhân viêm khớp vai thể đơn thuần.

Phạm Văn Minh, Vũ Thị Duyên Trang

Nghiên cứu tạo hệ phân phối thuốc hướng đích chủ động chitosan-mixen-paclitaxel-aptamer ứng dụng điều trị ung thư.

Nguyễn Kim Thạch, Liêu Mỹ Đông, Lê Đức Vinh, Lê Quang Huân

Nghiên cứu tổng hợp thuốc generic letrozole quy mô 100 g/mẻ đạt tiêu chuẩn được điển USP38.

Nguyễn Cửu Khoa, Nguyễn Đại Hải

Phân tích vi học và thành phần hoá học của lan một lá *Nervilia aragoana* Gaudich - họ lan Orchidaceae thu hái ở Kon Tum.

Trần Thị Ngọc Mai, Trần Công Luận

Phương pháp đo các đặc tính quang học của mẫu y sinh học bằng hệ thống phân cực ánh sáng trong chẩn đoán và theo dõi bệnh tiểu đường.

Bùi Thị Ngọc Phượng, Nguyễn Lê Trang Anh, Nguyễn Minh Kim, Trịnh Thị Diệu Thường, Phạm Thị Thu Hiền

Công nghệ nhân giống dịch thể, ứng dụng trong nuôi trồng nấm sò vàng (*Pleurotus citrinopileatus*).

Phạm Thị Thu, Lê Văn Vê, Trần Thu Hà, Nguyễn Duy Trinh

Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên.

Nguyễn Thị Thanh Mai, Chu Đức Hà, Phạm Phương Thu, Nguyễn Văn Giang

Nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến cây cao su - *Hevea brasiliensis* giai đoạn vườn ươm.

Đoàn Phạm Ngọc Nga, Hà Thị Ngọc Trinh, Ngô Trần Ngọc Quý, Nguyễn Hữu Hiệp

Hệ số di truyền và giá trị giống ước tính về tăng khối lượng, độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thăn và tỷ lệ nạc của lợn đực Landrace có nguồn gốc từ Pháp và Mỹ.

Trịnh Hồng Sơn, Lê Văn Sáng

Khảo sát hiện trạng kỹ thuật nuôi và sự tích lũy carbon hữu cơ, nitrogen và phosphorus trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh tại tỉnh Bạc Liêu.

Nguyễn Thị Bích Vân, Nguyễn Phú Hòa

Nghiên cứu khả năng nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh của chồi *Vanilla (Vanilla planifolia* Andr.) in vitro.

Trần Thị Triều Hà, Lê Thị Thu Hằng, Vũ Tuấn Minh, Trần Thị Phương Nhung, Trần Thị Xuân Phương

Nghiên cứu nhân giống lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào.

Nguyễn Thị Lại, Phạm Hương Sơn, Vũ Mạnh Hải, Tống Xuân Trung

1 Evaluation of effectiveness of exercises therapy combined with physiotherapy in treatment for patients with simple periarthritis of the shoulder.

Van Minh Pham, Thi Duyen Trang Vu

5 Investigation on preparing an active drug delivery system for a chitosan-micelle-paclitaxel-aptamer to treat cancer.

Kim Thạch Nguyen, My Dong Lieu, Duc Vinh Le, Quang Huan Le

12 Research on the synthesis of generic drug - letrozole on a scale of 100 g per batch conforming to the United State Pharmacopeia (USP38).

Cuu Khoa Nguyen, Dai Hai Nguyen

17 Microscopic examination and chemical composition analysis of one-leaf orchid *Nervilia aragoana* Gaudich - Orchidaceae family harvested at KonTum.

Thi Ngoc Mai Tran, Cong Luan Tran

22 Method for measuring the optical properties of bio-materials utilizing the polarized light system for diagnosis and monitoring of diabetes.

Thi Ngoc Phuong Bui, Le Trang Anh Nguyen, Minh Kim Nguyen, Thi Dieu Thuong Trinh, Thi Thu Hien Pham

27 Liquid fermentation technology, its applications in cultivation of golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*).

Thi Thu Pham, Van Ve Le, Thu Ha Tran, Duy Trinh Nguyen

34 Isolation, selection of phosphate and potassium solubilising rhizosphere bacteria from coffee cultivated soil of the Central Highlands.

Thi Thanh Mai Nguyen, Duc Ha Chu, Phuong Thu Pham, Van Giang Nguyen

39 Effect of diazotrophic bacteria on rubber trees - *Hevea brasiliensis* at the nursery stage.

Pham Ngoc Nga Doan, Thi Ngoc Trinh Ha, Tran Ngoc Quy Ngo, Huu Hiep Nguyen

43 Heritability and estimated breeding value of average daily gain, back fat, loin thickness and lean meat percentage of Landrace boars imported from France and the United States.

Hong Son Trinh, Van Sang Le

49 Studying the status of culturing techniques and the estimation of the ability to assimilate organic carbon, nitrogen and phosphorus from feed in intensive white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) ponds in Bac Lieu province

Thi Bich Van Nguyen, Phu Hoa Nguyen

56 Study on the rapid multiplication and planlets regeneration of *Vanilla planifolia* Andr.

Thi Trieu Ha Tran, Thi Thu Hang La, Tuan Minh Vu, Thi Phuong Nhung Tran, Thi Xuan Phuong Tran

60 Micropropagation of *Dendrobium loddigesii* Rolfe by thin cell layer culture.

Thi Lai Nguyen, Huong Son Pham, Manh Hai Vu, Xuan Trung Tong