



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 60 - Số 7 - Tháng 7 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 Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam
Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology
Tran Tho Dat - National Economics University
Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Vu Minh Giang - Vietnam National University, Hanoi
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology
Tu Quang Hien - Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry
Pham Huy Khang - University of Transport and Communications
Pham Gia Khanh - President of Vietnam Society of Organ Transplantation
Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology
Nguyen Thi My Loc - University of Education, Vietnam National University, Hanoi
Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology
Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh City
Mai Trong Nhuan - Vietnam National University, Hanoi
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Pham Hung Viet - VNU University of Science

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN

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

EDITORIAL OFFICE

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

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

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

PUBLICATION LICENCE

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

Nghiên cứu một số đặc điểm của vi khuẩn lao ở bệnh nhân lao phổi mới và lao phổi tái trị được chỉ định điều trị bằng thuốc chống lao hàng 1

Lê Thị Luyến^{1*}, Trịnh Thị Hiền¹, Nguyễn Văn Hưng², Phạm Thị Thu Huyền²,
Đặng Văn Khoa³, Giang Mạnh Chiến³, Phạm Hữu Thường⁴, Nguyễn Phụng Hoàng⁴

¹Khoa Y dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Bệnh viện Phổi Trung ương

³Bệnh viện 74 Trung ương

⁴Bệnh viện Phổi Hà Nội

Ngày nhận bài 8/5/2018; ngày chuyển phản biện 17/5/2018; ngày nhận phản biện 20/6/2018; ngày chấp nhận đăng 25/6/2018

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá đặc điểm vi khuẩn lao dựa trên kết quả xét nghiệm vi sinh ở bệnh nhân (BN) lao phổi mới và tái trị được chỉ định điều trị bằng thuốc chống lao hàng 1. Phương pháp thực hiện: Nghiên cứu mô tả, so sánh kết quả xét nghiệm vi khuẩn lao của BN lao phổi mới và tái trị. Nghiên cứu được tiến hành trên 64 BN lao phổi mới, 39 BN lao phổi tái trị điều trị tại Bệnh viện Phổi Hà Nội và Bệnh viện 74 Trung ương. Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt về kết quả xét nghiệm vi khuẩn lao bằng nhuộm soi trực tiếp và nuôi cấy MGIT BACTEC giữa nhóm lao phổi mới và lao phổi tái trị. Tỷ lệ kháng thuốc chống lao hàng 1 của vi khuẩn lao phân lập từ BN lao tái trị (53,85%) cao hơn lao mới (21,88%). Mặc dù được loại trừ nhanh đa kháng thuốc bằng GenXpert nhưng có 1 BN lao mới và 5 BN lao tái trị được xác định đa kháng thuốc bằng kháng sinh đồ. Qua nghiên cứu có thể kết luận: Vi khuẩn lao phân lập từ đờm của nhóm BN lao phổi tái trị có tỷ lệ kháng thuốc chống lao hàng 1 cao hơn nhóm BN lao mới.

Từ khóa: Lao đa kháng thuốc, lao kháng thuốc, lao phổi mới, lao phổi tái trị, vi khuẩn lao.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Bệnh lao vẫn là vấn đề về sức khỏe của các quốc gia trên thế giới, bao gồm cả Việt Nam. Đây là bệnh có tỷ lệ tử vong cao nhất trong số các bệnh nhiễm trùng trên thế giới. Theo Tổ chức y tế thế giới (WHO), năm 2017, Việt Nam nằm trong 30 nước có gánh nặng BN lao cao trên thế giới và trong nhóm các quốc gia có tỷ lệ BN đa kháng thuốc (MDR-TB) cao [1]. Theo Hướng dẫn của Chương trình chống lao quốc gia, những BN đã từng điều trị lao nhưng tái phát hoặc điều trị thất bại, nếu không xác định là MDR-TB thì được chỉ định tái trị bằng thuốc chống lao hàng 1. Hiện nay, GenXpertMTB/RIF được đưa vào áp dụng để chẩn đoán nhanh vi khuẩn lao, đồng thời xác định nhanh vi khuẩn kháng Rifampicin, nếu không kháng Rifampicin BN được chỉ định các phác đồ có thuốc chống lao hàng 1.

Ở Việt Nam, năm 2016, tỷ lệ điều trị thành công ở BN lao khoảng 92%, trong đó có 95% BN lao mới điều trị thành công, nhưng chỉ có 77% BN tái trị điều trị thành công [2]. Câu hỏi đặt ra là, liệu có sự khác biệt về đặc điểm vi khuẩn lao phân lập từ BN lao tái trị so với BN lao mới khi cùng được chỉ định điều trị bằng thuốc chống lao hàng 1 hay không?

Từ những lý do được đề cập trên đây, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu: So sánh đặc điểm các chủng vi khuẩn lao thông qua kết quả xét nghiệm vi khuẩn ở BN lao phổi mới và lao phổi tái trị được chỉ định điều trị bằng thuốc chống lao hàng 1.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành trên 103 BN lao phổi mới và lao phổi tái trị, điều trị tại Bệnh viện Phổi Hà Nội và Bệnh viện 74 Trung ương từ tháng 3/2017 đến tháng 3/2018, đáp ứng các tiêu chuẩn sau:

- Được chẩn đoán lao phổi mới hoặc lao phổi tái trị có bằng chứng vi khuẩn AFB(+) hoặc MGIT BACTEC(+) ở các mẫu đờm trước điều trị.
- Lao phổi mới: Chưa từng điều trị lao hoặc mới dùng thuốc điều trị <1 tháng.
- Lao phổi tái trị: Đã từng điều trị lao, được chẩn đoán lao phổi tái phát hoặc thất bại điều trị.
- Kết quả GenXpert MTB+/RIF- mẫu đờm trước điều trị (loại trừ kháng RMP).
- Chỉ định điều trị bằng các thuốc chống lao hàng 1.

*Tác giả liên hệ: Email: luyenle66@gmail.com

Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the new and re-treatment pulmonary tuberculosis patients assigned to chemotherapy by first-line anti-tuberculosis drugs

Thi Luyen Le^{1*}, Thi Hien Trinh¹, Van Hung Nguyen²,
Thi Thu Huyen Pham², Van Khoa Dang³, Manh Chien Giang³,
Huu Thuong Pham⁴, Phuong Hoang Nguyen⁴

¹Faculty of Medicine, Vietnam National University, Hanoi

²Central Lung Hospital

³National K74 Hospital

⁴Hanoi Lung Hospital

Received 8 May 2018; accepted 25 June 2018

Abstract:

Objectives: To assess the characteristics of *M. tuberculosis* strains based on the microbiology tests from the new pulmonary tuberculosis and re-treatment pulmonary tuberculosis patients, who have been assigned by first-line anti tuberculosis drugs. **Methods:** Perspective descriptive study was conducted on 64 new cases and 39 re-treatment pulmonary tuberculosis patients assigned for first line anti-tuberculosis drugs at Hanoi Lung Hospital and National K74 Hospital. The microbiology test results of sputum smears, culture by MGIT-BACTEC 960, GenXpertMTB/RIF and Drug Susceptibility Test were compared for the new-case and re-treatment pulmonary tuberculosis patient groups. **Results:** There was no significant difference of sputum smear results between re-treatment and new-case groups. The GU and TTD in MGIT-BACTEC results when culturing *M. tuberculosis* from sputum were widely variable between patients in both the groups. The re-treatment group had a higher tendency in TTD. Although all patients had the results as GenXpertMTB+/RIF- (sensitivity to Rifampicin), the drug susceptibility test Lowenstein-Jansen revealed that there were some patients with multi-drug resistance to first-line anti-tuberculosis drugs in both the new-case and re-treatment TB patient groups (1.56 and 12.82%, respectively). The rate of drug resistance to any first-line anti-tuberculosis drugs of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from re-treatment tuberculosis patients is higher than that from new cases (53.85 and 21.88%, respectively). **Conclusions:** The *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from the re-treatment pulmonary tuberculosis patients had the higher rate of drug resistance to first-line anti-tuberculosis drugs than that of the new cases.

Keywords: Anti-tuberculosis drug resistance, MDR-TB, *Mycobacterium tuberculosis*, new pulmonary tuberculosis, re-treatment tuberculosis.

Classification number: 3.2

- Tuổi từ 16 trở lên.

- Chấp thuận tình nguyện tham gia nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu tiền cứu có so sánh kết quả xét nghiệm vi sinh ở 2 nhóm BN lao mới và lao tái trị. Tiến hành thu thập các dữ liệu của BN nghiên cứu, bao gồm: 1) Đặc điểm của nhóm BN nghiên cứu: Tuổi, giới, thể lao, tiền sử điều trị bệnh lao (đối với bệnh lao tái trị) và các bệnh phổi hợp; 2) Kết quả xét nghiệm vi khuẩn lao từ bệnh phẩm đờm của BN thu thập ở thời điểm trước điều trị, bao gồm: Xét nghiệm vi khuẩn lao bằng nhuộm soi trực tiếp, nuôi cấy vi khuẩn lao, chẩn đoán nhanh vi khuẩn lao bằng GeneXpertMTB/RIF, kháng sinh đồ của *M. tuberculosis* đối với thuốc chống lao hàng 1.

Các kỹ thuật được áp dụng theo Hướng dẫn của Chương trình chống lao quốc gia [1], bao gồm:

- Xét nghiệm đờm bằng nhuộm soi trực tiếp tại Khoa Vi sinh - Bệnh viện Phổi Hà Nội và Bệnh viện 74 Trung ương.

- Nuôi cấy đờm tìm vi khuẩn lao bằng kỹ thuật MGIT BACTEC trên hệ thống BACTEC 960 tại Khoa Vi sinh - Bệnh viện Phổi Hà Nội và Bệnh viện 74 Trung ương.

- Định danh xác định vi khuẩn lao từ các mẫu nuôi cấy dương tính và phân lập vi khuẩn tại Khoa Vi sinh - Bệnh viện Phổi Trung ương.

- Xác định nhanh vi khuẩn lao và tính kháng Rifampicin bằng kỹ thuật GenXpertMTB/RIF tại Khoa Vi sinh - Bệnh viện Phổi Hà Nội và Bệnh viện 74 Trung ương.

- Xác định tính nhạy cảm của các chủng vi khuẩn *M. tuberculosis* phân lập được bằng kỹ thuật Lowenstein-Jensen tại Khoa Vi sinh và Labo lao chuẩn quốc gia - Bệnh viện Phổi Trung ương.

Địa điểm thực hiện các xét nghiệm:

- Các xét nghiệm nhuộm soi trực tiếp, nuôi cấy vi khuẩn bằng MGIT BACTEC, GenXpertMTB/RIF: Mẫu đờm của BN thu nhận ở bệnh viện nào thì tiến hành xét nghiệm tại Khoa Vi sinh của bệnh viện đó.

- Định danh vi khuẩn, phân lập và làm kháng sinh đồ: Các mẫu MGIT BACTEC dương tính từ các Bệnh viện Phổi Hà Nội và Bệnh viện 74 Trung ương sẽ chuyển về định danh, phân lập và làm kháng sinh đồ tại Khoa Vi sinh và Labo lao chuẩn quốc gia - Bệnh viện Phổi Trung ương.

So sánh các kết quả xét nghiệm vi khuẩn lao nêu trên nhằm bước đầu xác định đặc điểm của vi khuẩn lao gây bệnh ở nhóm lao mới và tái trị.

Xử lý số liệu: Tất cả số liệu được xử lý theo phương pháp toán thống kê y học. Xử lý bằng phần mềm SPSS 20.

Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu: Nghiên cứu được

triển khai sau khi được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Khoa Y dược - Đại học Quốc gia Hà Nội xét duyệt hồ sơ và chấp thuận. Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học nêu trên có mã số IRB-VN01016 do Bộ Y tế cấp và IRB0001047 School of Medicine and Pharmacy VNU do HHS-OHRP Hoa Kỳ cấp mã số hoạt động.

BN tuyển chọn vào nghiên cứu đều được thực hiện đầy đủ quy trình lấy chấp thuận tham gia nghiên cứu và ký Bản chấp thuận tham gia nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu

Đặc điểm nhóm BN nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm nhóm BN nghiên cứu.

Đặc điểm	Lao mới		Lao tái trị	
	Số lượng	Tỷ lệ	Số lượng	Tỷ lệ
Thể lao	64	62,10	39	37,90
Giới (nam)	42	64,62	35	89,74
Bệnh phổi hợp	11	17,19	19	48,72
Tuổi	42,84±16,36		50,36±12,62	

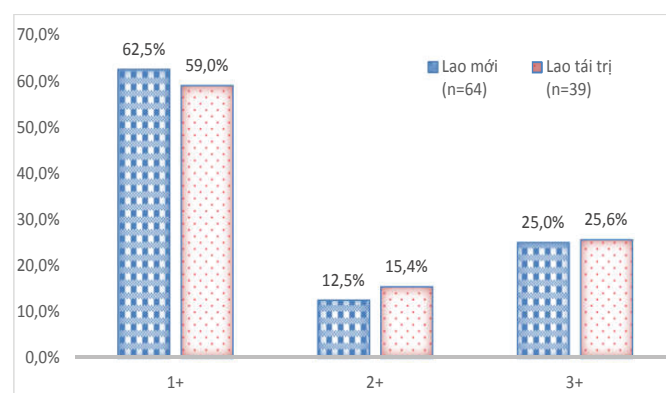
Bảng 1 cho thấy, BN lao phổi tái trị chiếm tỷ lệ 37,9% tổng số BN nghiên cứu, trong đó chủ yếu là lao tái phát (37 BN).

Tỷ lệ BN lao tái trị có bệnh phổi hợp (48,72%) cao hơn BN lao phổi mới (17,19%) ($p < 0,05$). Các bệnh phổi hợp chủ yếu là viêm dạ dày - tá tràng, đái tháo đường, nghiện rượu.

Tuổi trung bình của nhóm BN lao tái trị cao hơn so với nhóm BN lao mới. BN nam chiếm tỷ lệ cao hơn BN nữ ở cả 2 nhóm lao mới và tái trị.

Mức độ dương tính của xét nghiệm vi khuẩn lao bằng nhuộm soi trực tiếp

Hình 1 so sánh mức độ dương tính của kết quả xét nghiệm vi khuẩn lao bằng nhuộm soi trực tiếp giữa nhóm BN lao mới và nhóm lao tái trị.



Hình 1. Mức độ AFB (Acid-fast bacillus - trực khuẩn lao) trong đờm của nhóm BN lao mới và lao tái trị.

Tỷ lệ BN có kết quả AFB dương tính mức (1+) là chủ yếu ở cả 2 nhóm BN. Không có sự khác biệt rõ rệt giữa 2 nhóm BN về tỷ lệ của từng mức độ dương tính ($p > 0,05$).

Kết quả xét nghiệm vi khuẩn lao nuôi cấy bằng kỹ thuật MGIT BACTEC

So sánh số đơn vị sinh trưởng (GU - Growth Unit) và thời gian cho tín hiệu dương tính (TTD - Time to detection) dựa trên kết quả MGIT BACTEC của nhóm lao mới và lao tái trị như trong bảng 2.

Bảng 2. Số lượng vi khuẩn và thời gian cho tín hiệu dương tính.

Thể lao	Đơn vị sinh trưởng (GU)	Thời gian cho tín hiệu dương tính (TTD - giờ)
Lao mới (n=64)	Trung vị: 398 Khoảng giá trị (thấp nhất-cao nhất): 80-35978	178 71-450
Lao tái trị (n=39)	Trung vị: 399 Khoảng giá trị (thấp nhất-cao nhất): 95-40401	233 39-638
P value	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Có sự dao động lớn giữa các cá thể về các chỉ số GU và TTD ở cả 2 nhóm. Không có sự khác biệt về GU trên xét nghiệm mẫu đờm của nhóm BN lao phổi mới và lao phổi tái trị ($p > 0,05$). TTD của nhóm lao tái trị có xu hướng cao hơn lao mới.

Xét nghiệm GenXpertMTB-RIF chẩn đoán nhanh vi khuẩn lao và tính kháng Rifampicin

GenXpertMTB/RIF là kỹ thuật nhằm xác định nhanh vi khuẩn lao và tính kháng Rifampicin của vi khuẩn lao, thông thường hầu hết những trường hợp có kháng Rifampicin được xếp vào nhóm MDR-TB vì có kháng đồng thời Rifampicin-INH, do đó hiện nay áp dụng kỹ thuật GenXpertMTB/RIF để loại trừ nhanh MDR-TB. Tất cả 103 BN (cả lao phổi mới và lao phổi tái trị) đều được chỉ định xét nghiệm GenXpertMTB/RIF và 100% mẫu bệnh phẩm đờm cho kết quả GenXpert MTB+/RIF- (có vi khuẩn lao trong bệnh phẩm và vi khuẩn không kháng Rifampicin).

Kháng sinh đồ xác định tính nhạy cảm của M. tuberculosis với các thuốc chống lao hàng 1

Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập được tiến hành xác định tính nhạy cảm đối với thuốc chống lao hàng 1. Trong số các mẫu nuôi cấy bằng MGIT BACTEC dương tính, có một số mẫu không phân lập được vi khuẩn lao vì bị nhiễm vi khuẩn lao không điển hình (Non-tuberculosis mycobacteria-NTM).

Bảng 3. Tỷ lệ kháng thuốc bất kỳ và số thuốc kháng của các chủng vi khuẩn *M. tuberculosis* phân lập từ BN xác định bằng kháng sinh đồ.

Tình trạng kháng thuốc chống lao		Lao mới (n=64)		Lao tái trị (n=39)		Giá trị p
		n	%	n	%	
Tình trạng nhạy cảm/ kháng thuốc bất kỳ	Nhạy cảm tất cả các loại thuốc	45	70,31	14	35,90	<0,05
	Kháng thuốc bất kỳ (1 hoặc nhiều loại thuốc)	14	21,88	21	53,85	
	Không phân lập được vi khuẩn/NTM	5	7,81	4	10,26	
Số thuốc kháng/chủng	Kháng 1 thuốc	7	10,94	8	20,51	
	Kháng 2 thuốc	6	9,38	7	17,95	
	Kháng 3 thuốc	0	0,00	0	0,00	
	Kháng 4 thuốc	1	1,56	5	12,82	

Tỷ lệ BN có chủng vi khuẩn lao nhạy cảm ở nhóm lao phổi mới (70,31%) cao hơn nhóm lao phổi tái trị (35,90%) và ngược lại, tỷ lệ kháng thuốc bất kỳ của BN lao phổi tái trị cao hơn lao mới, bao gồm số lượng thuốc bị kháng đối với mỗi chủng. Đặc biệt có 6 BN kháng 4 thuốc.

Trên cơ sở kết quả kháng sinh đồ, phân bố tỷ lệ kháng từng thuốc và đa kháng thuốc (kháng đồng thời Isoniazid và Rifampicin) chống lao hàng 1 ở 103 BN nghiên cứu như bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ kháng của từng thuốc và đa kháng của các chủng vi khuẩn *M. tuberculosis* đối với thuốc chống lao hàng 1.

Kháng với từng thuốc và đa kháng thuốc chống lao		Lao mới (n=64)		Lao tái trị (n=39)		Giá trị p
		n	%	n	%	
Kháng với từng thuốc	Isoniazid (INH)	13	20,31	18	46,15	<0,05
	Rifampicin (RMP)	1	1,56	5	12,82	
	Streptomycin (SM)	7	10,94	14	35,90	
	Ethambutol (EMB)	1	1,56	5	12,82	
	Pyrazinamid (PZA)	1	1,56	4	10,26	
Kháng đồng thời RMP và INH		1	1,56	5	12,82	

Tỷ lệ kháng với từng loại thuốc ở BN lao tái trị cao hơn so với BN lao mới. Kháng INH chiếm tỷ lệ cao nhất ở 2 nhóm (20,31 và 46,15%), nhóm BN tái trị có tới 35,9% BN kháng với SM. Đa kháng thuốc gặp ở BN lao tái trị (12,82%) cao hơn lao mới (1,56%).

Bàn luận

Kết quả xét nghiệm tìm AFB trong đờm bằng nhuộm soi trực tiếp cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ các mức độ dương tính ở nhóm lao phổi mới và lao tái trị. Kết quả này

khác với các nghiên cứu của Hoàng Hà [3] cho thấy mức độ (1+) ở BN lao mới cao hơn lao tái trị và mức độ (3+) ở BN lao mới thấp hơn lao tái trị.

Không có sự khác biệt về kết quả nuôi cấy MGIT BACTEC tìm vi khuẩn lao từ bệnh phẩm đờm giữa 2 nhóm lao mới và tái trị (bảng 2). Các chỉ số GU và TTD có sự dao động lớn giữa các mẫu đờm của BN lao phổi trong cùng một nhóm lao mới hoặc tái trị. Nhóm lao tái trị có xu hướng thời gian cho tín hiệu dương tính chậm hơn.

Trên cơ sở kết quả kháng sinh đồ ở bảng 3 cho thấy, BN lao phổi tái trị có tỷ lệ kháng thuốc bất kỳ (53,85%) cao hơn BN lao phổi mới (21,88%). Điều này có thể lý giải rằng vi khuẩn lao ở BN tái trị đã có 1 lần chọn lọc kháng thuốc dưới tác dụng điều trị lần trước [4]. Kết quả nghiên cứu này so với số liệu điều tra quốc gia về kháng thuốc chống lao năm 2011 cho thấy, BN lao mới có tỷ lệ kháng thuốc bất kỳ là 32,7% và nhóm lao tái trị là 54,2% [5], như vậy, tỷ lệ kháng thuốc chống lao hàng 1 bất kỳ ở nhóm lao mới trong nghiên cứu này thấp hơn so với số liệu điều tra quốc gia về kháng thuốc năm 2011.

Tỷ lệ đa kháng thuốc trong nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả điều tra quốc gia năm 2011 ở nhóm lao mới (4%), tái trị (23,3%) [5] và tỷ lệ đa kháng thuốc ở BN lao Việt Nam trong Báo cáo của WHO 2017 [1], cũng như so với nghiên cứu của một số tác giả trong nước và nước ngoài [3, 4, 6-8]. Điều đó có thể lý giải là nhóm BN trong nghiên cứu này đã được loại trừ các trường hợp kháng Rifampicin (để loại trừ đa kháng thuốc) bằng xét nghiệm GeneXpertMTB/RIF.

Tỷ lệ chủng vi khuẩn kháng thuốc INH ở nhóm lao mới và tái trị (20,31 và 46,15%) tương tự như số liệu điều tra quốc gia 2011, nhưng kháng SM (10,94 và 35,90%) thấp hơn so với số liệu điều tra quốc gia và nghiên cứu của các tác giả khác [3, 5-7]. Điểm lưu ý ở đây là, đối với BN lao tái trị tỷ lệ kháng PZA chiếm 10,26% và kháng INH chiếm 46,15%. Trong khi đó, INH liều cao được chỉ định cho BN lao kháng Rifampicin và PZA được dùng cho BN MDR-TB trong các phác đồ hiện nay do WHO và Chương trình chống lao quốc gia ban hành [9].

Trong nghiên cứu này, 100% BN đã được xét nghiệm GenXpertMTB/RIF cho kết quả xác định nhanh không kháng Rifampicin, nhưng kết quả kháng sinh đồ cho thấy có 6 BN (lao mới và tái trị) có kháng Rifampicin đồng thời kháng INH (MDR-TB) (bảng 4). Tỷ lệ MDR-TB phát hiện bằng kháng sinh đồ trong nhóm tái trị là 12,82%, cao hơn so với nhóm lao mới (1,56%). Trong nghiên cứu này, những BN được xác định MDR-TB phải ngừng phác đồ thuốc chống lao hàng 1 chuyển sang phác đồ điều trị MDR-TB. Các chủng vi khuẩn này được phân tích sâu hơn bằng các kỹ

thuật khác trong nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, những trường hợp lao tái trị cần được làm kháng sinh đồ để xác định tính nhạy cảm/kháng thuốc chống lao và chỉ định phác đồ điều trị phù hợp, tránh bỏ sót các trường hợp đa kháng thuốc. Mặt khác cần tiến hành nghiên cứu sâu hơn về đặc tính vi khuẩn lao ở những trường hợp tái trị.

Kết luận

Nghiên cứu so sánh đặc điểm kết quả xét nghiệm vi sinh ở BN lao phổi mới và lao phổi tái trị ở thời điểm trước điều trị, chúng tôi rút ra những kết luận sau:

1. Không có sự khác biệt về kết quả xét nghiệm vi khuẩn lao bằng nhuộm soi trực tiếp và nuôi cấy vi khuẩn lao bằng kỹ thuật MGIT BACTEC giữa nhóm BN lao mới và lao tái trị.

2. Kết quả kháng sinh đồ với thuốc chống lao hàng 1 cho thấy, nhóm BN lao phổi tái trị có tỷ lệ kháng thuốc bất kỳ (53,85%) cao hơn nhóm BN lao mới (21,88%). Tỷ lệ kháng INH và SM ở BN tái trị tương đối cao và cao hơn nhóm lao phổi mới. Có khoảng 10% lao tái trị kháng PZA.

3. Mặc dù được xác định không kháng Rifampicin bằng xét nghiệm GenXpertMTB/RIF nhưng có 1,56% số BN lao mới và 12,82% số BN lao tái trị được xác định đa kháng thuốc bằng kháng sinh đồ.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, vi khuẩn lao phân lập ở những BN có tiền sử đã điều trị thuốc chống lao có tính kháng thuốc cao hơn và cần phải xác định tính kháng thuốc cho những BN lao tái trị. Những kết luận từ nghiên cứu bước đầu này phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu tiếp theo về được lực học của vi khuẩn lao và đáp ứng lâm sàng trong quá trình điều trị lao cho BN lao mới và tái trị bằng thuốc chống lao hàng 1.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm thực hiện đề tài xin trân trọng cảm ơn các bác sỹ của Bệnh viện Phổi Trung ương, Bệnh viện Phổi Hà Nội và Bệnh viện 74 Trung ương đã tạo điều kiện và cùng phối hợp thực hiện nghiên cứu. Nội dung nghiên cứu này thuộc đề tài nghiên cứu khoa học cấp nhà nước - Chương trình hợp tác nghiên cứu song phương đa phương về khoa học và công nghệ đến năm 2020 và Chương trình Newton Fund Vietnam, mã số đề tài HNQT/SPDP/01.06.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2017), *Global Tuberculosis Report 2017*.
- [2] Bộ Y tế - Chương trình chống lao quốc gia Việt Nam (2016), *Hướng dẫn quản lý bệnh lao*, Nhà xuất bản Y học.
- [3] Hoàng Hà (2009), *Nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, sinh học của vi khuẩn lao ở BN điều trị lại*, Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [4] R. Ragonnet, J.M. Trauer, J.T. Denholm, et al. (2017), "High rates of multidrug resistant and Rifampicin resistant tuberculosis among re-treatment cases: where do they come from?", *BMC Infectious Diseases*, **17**, p.36.
- [5] N.V. Nhung, N.B. Hoa, D.N. Sy, et al. (2015), "The fourth national anti-tuberculosis drug resistance survey in Viet Nam", *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **19**(6), pp.670-675.
- [6] Nguyễn Thu Hà, Trần Văn Sáng, Đinh Ngọc Sỹ (2011), "Lâm sàng, cận lâm sàng và tính kháng thuốc của vi khuẩn lao ở BN lao phổi tái phát", *Jour. Fran. Viet. Pul.*, **2**(3), tr.63-67.
- [7] Nguyễn Thị Thu Thái, Nguyễn Thái Sơn, Đinh Ngọc Sỹ (2013), "Kiểu hình kháng thuốc của các chủng vi khuẩn lao phân lập tại Việt Nam", *Y học Thực hành*, **879**, tr.72-74.
- [8] B. Komurcuoglu (2013), "Drug resistance in pulmonary tuberculosis in new and previously treated cases: experience from Turkey", *Journal of Infection and Public Health*, **6**(4), pp.276-282.
- [9] Bộ Y tế (2018), *Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị và dự phòng bệnh lao*, ban hành kèm theo Quyết định số 3126 ngày 23/5/2018 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

Áp dụng phương pháp sinh học phân tử trong phát hiện sớm người mắc bệnh Wilson chưa có triệu chứng lâm sàng và mang gen bệnh

Nguyễn Thị Mai Hương^{1*}, Nguyễn Phạm Anh Hoa², Nguyễn Thị Phương Mai¹, Ngô Mạnh Tiến¹, Tạ Thành Văn³, Phan Văn Chi⁴, Trần Văn Khánh³, Ngô Diễm Ngọc¹

¹Khoa Di truyền và sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương (NCH)

²Khoa Gan - mật, NCH

³Trung tâm Nghiên cứu gen - protein, Trường Đại học Y Hà Nội

⁴Phòng Nghiên cứu hóa sinh - protein, Viện Công nghệ sinh học (IBT), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

Ngày nhận bài 18/5/2018; ngày chuyển phản biện 22/5/2018; ngày nhận phản biện 21/6/2018; ngày chấp nhận đăng 27/6/2018

Tóm tắt:

Bệnh Wilson (WD) là bệnh di truyền lặn, do đột biến gen *ATP7B* nằm trên nhiễm sắc thể làm rối loạn quá trình chuyển hóa đồng. Đặc điểm lâm sàng của bệnh rất đa dạng và phức tạp nhưng thường gặp nhất là các bệnh gan và tâm thần, thần kinh. Nếu không được phát hiện và điều trị, bệnh nhân (BN) có thể bị tử vong. Nghiên cứu nhằm khảo sát đặc điểm đột biến gen *ATP7B* trên BN mắc WD ở miền Bắc Việt Nam và áp dụng phương pháp phân tích ADN để chẩn đoán sớm cho các thành viên trong gia đình BN. Trong nghiên cứu này, nhóm BN gồm 43 người mắc WD được giải trình tự trực tiếp 21 exon và vùng intron bao quanh các exon của gen *ATP7B* để phát hiện đột biến, sau đó các đột biến này sẽ được sàng lọc cho toàn bộ 67 anh, chị, em ruột của BN. Kết quả phát hiện được 18 đột biến khác nhau trên gen *ATP7B*, tỷ lệ đột biến là 91,9%. Đột biến S105X có tỷ lệ phát hiện cao nhất (34,9%). Các exon thường xảy ra đột biến nhất là exon 2 (40,7%), exon 16 (11,6%), exon 8 (9,3%), intron 14 (7%), exon 18 (5,9%). Trên nhóm anh, chị, em ruột của BN, 4/11 (36,4%) trường hợp được xác định bị đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép là người mắc WD chưa có triệu chứng lâm sàng và đã được điều trị sớm ngay sau khi được chẩn đoán xác định; 3/11 (27,3%) BN đã tử vong; 4/11 (36,4%) BN vẫn đang được theo dõi và điều trị ngoại trú. Kết quả nghiên cứu cho thấy, xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất để chẩn đoán xác định BN mắc WD chưa có triệu chứng và người bị đột biến gen dị hợp tử.

Từ khóa: Bệnh Wilson, chẩn đoán sớm, đột biến gen *ATP7B*, người bệnh chưa có triệu chứng.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

WD là bệnh di truyền chuyển hóa với tỷ lệ mắc vào khoảng 1/30.000. Bệnh biểu hiện triệu chứng ở hệ thần kinh, tâm thần và bệnh lý của gan [1, 2], bao gồm: Viêm gan, xơ gan hoặc các biểu hiện liên quan đến thần kinh, tâm thần như rối loạn hệ vận động, co cứng, mệt mỏi, lơ mơ, thiếu tập trung... WD do đột biến gen *ATP7B*, mã hóa protein vận chuyển đồng theo cơ chế vận chuyển xuyên màng, nhóm P (P-type ATPase) [1, 3, 4]. Gen *ATP7B* có 21 exon, kích thước gen khoảng 100 kb. Khung đọc mở dài 4,3 kb mã hóa cho sản phẩm protein gồm 1.465 amino acid (aa). Đến nay, khoảng hơn 800 đột biến khác nhau đã được phát hiện trên gen *ATP7B* [5, 6]. Đột biến gen *ATP7B* rất đa dạng, trong đó có một số đột biến đặc trưng cho từng chủng tộc [7, 8]. Theo đó, đột biến có tần suất bắt gặp cao nhất hiện nay ở người châu Á là R778L (14-49%) và trên người châu Âu, Địa Trung Hải là H1069Q (30-40%) [9, 10]. Ngoài đột biến sai nghĩa là phổ biến, các đột biến khác (mất đoạn, lặp đoạn, đột biến vô nghĩa và splice site) cũng có thể xảy ra trên gen *ATP7B* [1, 10]. Vì đột biến có thể xảy ra trên toàn bộ gen *ATP7B*, nên kiểu gen của WD rất đa dạng và chủ yếu gặp ở dạng dị hợp tử kép (có hai đột biến dị hợp tử được di truyền từ bố và mẹ) [2, 11].

WD là một trong những bệnh di truyền gây ra nhiều biến chứng phức tạp liên quan đến các bệnh về gan, tâm thần, thần kinh và thậm chí có thể gây tử vong, nhưng cũng là bệnh được điều trị nội khoa rất hiệu quả [1, 11]. Bởi vậy, chẩn đoán xác định WD có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong điều trị và tiên lượng bệnh [5, 12]. Vì các xét nghiệm sinh hóa trong chẩn đoán WD theo thang điểm Leipzig [5] có thể cho kết quả dương tính giả hoặc âm tính giả, do đó sẽ làm cho tình hình bệnh tật trở nên nghiêm trọng hơn hoặc cũng có thể bị bỏ sót dẫn đến BN không có cơ hội được điều trị bệnh. Đặc biệt, với những trường hợp biểu hiện bệnh không đặc trưng hoặc chưa có triệu chứng lâm sàng của bệnh, việc chẩn đoán bệnh sẽ vô cùng khó khăn [5]. Do đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm chẩn đoán sớm cho các trường hợp mắc WD chưa biểu hiện lâm sàng và người mang gen bệnh thông qua sàng lọc đột biến cho các thành viên trong gia đình để làm cơ sở cho tư vấn tiền hôn nhân và chẩn đoán trước sinh.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

43 BN nghi ngờ mắc WD, từ 3 đến 26 tuổi, bao gồm 20 nữ và 23 nam. BN Wilson được chẩn đoán và điều trị tại Khoa Gan - mật, Bệnh viện Nhi Trung ương.

*Tác giả liên hệ: Email: nmai.huong@gmail.com

Applying molecular technique in early detection of Wilson asymptomatic patients and carriers

Thi Mai Huong Nguyen^{1*}, Pham Anh Hoa Nguyen²,
Thi Phuong Mai Nguyen¹, Manh Tien Ngo¹, Thanh Van Ta³,
Van Chi Phan⁴, Van Khanh Tran³, Diem Ngoc Ngo¹

¹Human Genetics Department, Vietnam National Children's Hospital (NCH)

²Hepatology Department, NCH

³Ha Noi Medical University

⁴Institute of Biotechnology (IBT), VAST

Received 18 May 2018; accepted 27 June 2018

Abstract:

Wilson's disease (WD) is an autosomal recessive disorder of the copper metabolism, which is caused by a mutation in the copper-transporting P-type ATPase (*ATP7B*). The mechanism of this disease is the failure of hepatic excretion of copper to bile, which leads to copper deposits in the liver and other organs. This study aimed to identify Wilson asymptomatic patients and carriers in their families. Forty-three WD patients and their 67 siblings were identified as having *ATP7B* gene mutations. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples; 21 exons and exon-intron boundaries of the *ATP7B* gene were analysed by direct sequencing. We recognised 18 different mutations, accounting for 91.9 %. Mutation S105X was determined to have the highest rate (34.9%) in this study. The hotspot regions of *ATP7B* were found at exons 2 (40.7%), exon 16 (11.6%), exon 8 (9.3%), intron 14 (7%), and exon 18 (5.9%). Among 11 homozygote/compound heterozygote siblings of the patients with WD, 4 (6%) individuals were determined as asymptomatic by screening mutations of the probands. In conclusion, 18 different mutations were detected. Of this number, mutation S105X is the most prevalent and has been considered as a biomarker that can be used in a rapid detection assay for diagnosis of WD. Exons 2, 8, 16, and 18, and intron 14 should be screened initially for WD patients in Vietnam. Four asymptomatic Wilson patients were identified by screening mutations of proband would be treated soon and so far are healthy. Based on risk profile for WD, genetic testing is also useful for asymptomatic diagnosis and treatment.

Keywords: Asymptomatic patients, *ATP7B* gene mutation, early diagnosis, Wilson disease.

Classification number: 3.2

67 anh, chị, em của BN Wilson được tiến hành phân tích gen *ATP7B* dựa trên đột biến đã xác định được (đột biến đích) trên BN Wilson đã biểu hiện bệnh và được xác định kiểu gen trong gia đình (ca chỉ điểm).

Phương pháp

Tách chiết ADN từ máu ngoại vi:

- Mẫu bệnh phẩm: 2 ml máu ngoại vi chống đông EDTA.

- Tách ADN tổng số: ADN tổng số của BN và các thành viên trong gia đình được tách bằng Kit tách ADN (QIAamp DNA Blood Mini preparation kits, Qiagen, Đức).

Phân tích gen *ATP7B*: BN sẽ được giải trình tự trực tiếp toàn bộ 21 exon của gen *ATP7B* sử dụng 25 cặp mồi đặc hiệu (5 cặp mồi cho exon 2, mỗi một cặp mồi cho các exon còn lại) để phát hiện đột biến. Dựa trên kết quả phân tích gen của BN, các thành viên trong gia đình của BN sẽ được khuếch đại và giải trình tự trực tiếp vùng gen dễ sàng lọc đột biến.

- Phản ứng PCR: Phản ứng có tổng thể tích 25 µl bao gồm 10X PCR buffer (Invitrogen, Mỹ), 20mM magnesium chloride, 10µM dNTPs, 10µM mỗi xuôi và mỗi ngược, 5U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Mỹ) và 50 ng ADN tổng số. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy ABI GeneAmp PCR system 9700. Chu trình nhiệt phản ứng PCR: 95°C - 5 giây, [95°C - 20 giây, 55°C - 20 giây, 72°C - 30 giây] x 35 chu kỳ, 72°C - 7 phút. Sản phẩm PCR sẽ được điện di trên agarose (1%) và được tinh sạch bằng Kit tinh sạch DNA purification Kit (Qiagen, Đức).

- Giải trình tự gen *ATP7B*: Sản phẩm tinh sạch tiếp tục được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự gen. Sau đó, sản phẩm giải trình tự gen tiếp tục được kết tủa bằng Kit Bigdye X.terminator purification (Applied Biosystems, Mỹ). Giải trình tự gen sử dụng Kit Bigdye terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems, Mỹ) và được thực hiện trên máy ABI PRISM - 3130 Genetic Analyzer machine (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự gen được xử lý bằng phần mềm Sequencing Analysis Software v5.3, được phân tích bằng phần mềm Chromas, Seqscape 2.5 và so sánh với trình tự chuẩn được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế NT_024524.

Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ đạo đức nghiên cứu trong y học. BN và người nhà hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không muốn tiếp tục tham gia. Các thông tin của BN được đảm bảo bí mật.

Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Di truyền và sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 1/2015-12/2017.

Kết quả

Kết quả phân tích đột biến trên BN Wilson

Qua phân tích kết quả đã phát hiện tổng số 18 loại đột biến khác nhau (đột biến thay thế, n = 14; đột biến dịch khung, n = 2; đột biến vô nghĩa, n = 1; đột biến splice site, n = 1). Tỷ lệ phát hiện đột biến trong nghiên cứu là 91,9% (bảng 1).

Trong số 43 BN tham gia nghiên cứu, có 38 BN (14 BN có đột biến đồng hợp tử, 24 BN có đột biến dị hợp tử kép) được xác định

đột biến trên cả hai alen, 3 BN có đột biến duy nhất, không phát hiện đột biến trên alen còn lại, 2 BN không phát hiện đột biến trên toàn bộ 21 exon của gen *ATP7B*.

Đột biến thường xảy ra trên exon 2 (40,7%), exon 16 (11,6%), exon 8 (9,3%), intron 14 (7%) và exon 18 (5,9%). Đột biến S105X là có tỷ lệ phát hiện cao nhất, chiếm 34,9% (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm đột biến gen *ATP7B* phát hiện trên BN mắc WD.

Dạng đột biến	Đột biến	Thay đổi nucleotide	Exon	Tần suất alen bị đột biến (n) (%)
Nonsense	S105X	c.314C>A	2	30 (34,9)
Frameshift	V176SfsX28	c.525dupA	2	5 (5,8)
	M769HfsX26	c.204dupC	8	2 (2,3)
Missense	R778L	c.2333G>T	8	4 (4,7)
	R765G	c.2294A>G	8	2 (2,3)
	T850I	c.2549C>T	10	4 (4,7)
	P992L	c.2975C>T	13	3 (3,5)
	K1010T	c.3029 A>C	13	1 (1,2)
	L902P	c.2705T>C	11	1 (1,2)
	P1052L	c.3155C>T	14	1 (1,2)
	D1027H	c.3081 G>C	14	1 (1,2)
	I1148T	c.3443T>C	16	7 (8,1)
	E1173K	c.3517G>A	16	3 (3,5)
	P1273G	c.3818 C>A	18	1 (1,2)
	G1281D	c.3842 G>A	18	1 (1,2)
	P1273Q	c.3818C>A	18	3 (3,5)
	L1371P	c.4112T>C	20	4 (4,7)
	Splice site	IVS14-2A>G	c.3244-2A>G	Int14
Tổng				79 (91,9)

Kết quả phân tích đột biến trên anh, chị, em ruột của BN Wilson

Đột biến đã được phát hiện trên BN (đột biến đích) sẽ tiếp tục được sàng lọc trên 67 anh, chị, em của BN.

Bảng 2. Kết quả phân tích gen *ATP7B* cho anh, chị, em ruột của BN Wilson.

Anh, chị, em ruột của BN	Đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép (n) (%)	Dị hợp tử (n) (%)	Không phát hiện đột biến (n) (%)
Đã có biểu hiện của bệnh	7 (10,5)	-	-
Chưa có triệu chứng	4 (6)	-	-
Không bị bệnh		41 (61,2)	15 (22,4)
Tổng	11 (16,4)	41 (61,2)	15 (22,4)

Qua phân tích kết quả đã phát hiện 11 (16,4%) trường hợp anh, chị, em có đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép, bao gồm 7 (10,5%) BN đã có biểu hiện lâm sàng của WD, trong đó 3 BN đã tử vong và 4 (6%) trường hợp còn lại chưa có bất kỳ biểu hiện lâm sàng của WD; 41 trường hợp có một đột biến dị hợp tử; 15 (22,4%) trường hợp không có đột biến (bảng 2).

Bảng 3. Xét nghiệm cận lâm sàng của 4 trường hợp mắc WD chưa có triệu chứng.

BN mắc WD chưa có triệu chứng	Giới hạn bình thường	1	2	3	4
Tuổi/giới		3/nam	7/nam	1/nam	12/nam
Bilirubin - Direct (μmol/l)	0,5-6,8	0,75	0,21	3,4	0,43
Bilirubin - Total (μmol/l)	3,4-17	2,87	4,01	4	5,46
AST (u/l)	<40	37,19	43,29	37,80	33,01
ALT (u/l)	<40	32,46	60,01	25,70	54,44
GGT (u/l)	<40	20,46	40,44	15,10	87,16
PT%	>70%	121,00	94,50	90	87,00
Albumin (g/l)	35-50	29,00	38,94	45	43,39
Total protein (g/l)	60-80	57,80	65,42		71,39
Test Coombs	-	-	-	-	-
Vòng K-F	-	-	-	-	-
Cp (mg/dl)	≥20	0,05	0,01	0,028	0,04
u-Cu/day (mg/24h)	<0,1	<0,25	0,13	Không có	0,21
s-Cu (umol/l)	12-28	2,7	2,26	Thấp	2,57
Kiểu gen		S105X/S105X	S105X/I1148T	L902P/P1273Q	P992L/P992L

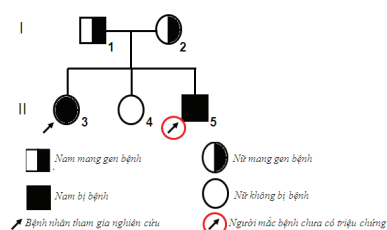
Ghi chú: AST (Aspartate Amino Transferase); ALT (Alanin Amino Transferase); GGT (Gamma Glutamyl Transferase); PT (Prothrombin); Cp (Ceruloplasmin); u-Cu (Urinary copper); s-Cu (Serum copper/day); KF (Kayser-Fleischer ring); (-): Âm tính.

Trong số 4 trường hợp được chẩn đoán sớm mắc WD nhưng chưa có biểu hiện lâm sàng đều có 2 đột biến dị hợp tử trên 2 alen của gen *ATP7B*. Kết quả xét nghiệm sinh hóa của cả 4 ca được phát hiện sớm cho thấy ceruloplasmin giảm mạnh, đồng niệu tăng cao và đồng máu có thay đổi nhẹ; 2 ca tăng men gan nhẹ (bảng 3).

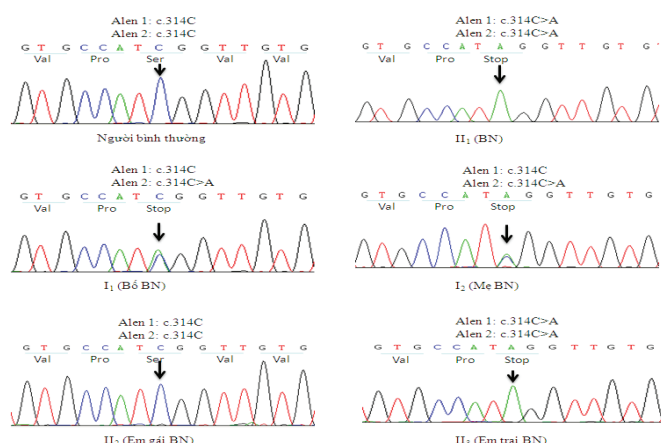
Gia đình BN thứ nhất: Gia đình BN có người con gái lớn (II₃) bị WD được phát hiện năm 9 tuổi. Người em trai của BN được phát hiện sớm mắc bệnh nhờ sàng lọc đột biến đích trên cả chi điểm, tại thời điểm đó người em trai của BN chưa có biểu hiện lâm sàng của WD.

BN (II₃) và em trai út (II₅) bị đột biến đồng hợp tử S105X. Kết quả phân tích gen *ATP7B* có thể thấy (hình 1), tại vị trí 314 xuất hiện duy nhất đỉnh A thay thế cho đỉnh C ở người bình thường. Em gái thứ 2 của BN (II₄) bị đột biến dị hợp tử. Trên hình ảnh phân tích trình tự gen của người em gái thứ 2 của BN nhận thấy trình tự gen tại vị trí 314 chỉ có 1 đỉnh C giống với trình tự gen chuẩn. Bố, mẹ BN (I_{1,2}) bị đột biến dị hợp tử. Theo đó, trên trình tự gen tại vị trí 314 sẽ có 2 tín hiệu của nucleotid C và A tại cùng một vị trí. Do đó, có thể khẳng định bố mẹ BN là người có gen bệnh.

Gia đình BN thứ hai: Gia đình BN có 2 anh em trai bị WD và có kiểu gen dị hợp tử kép S104X/I1148T. Tuy nhiên, người em (II₄) của BN (II₃) chưa có biểu hiện lâm sàng.

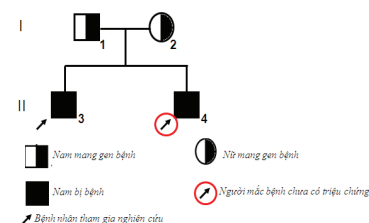


(A)

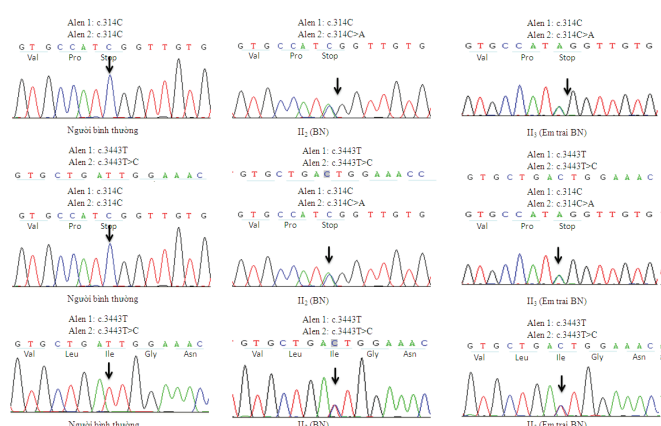


(B)

Hình 1. Sơ đồ phả hệ và một phần hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến S105X của gia đình BN số 1. (A) Phả hệ của gia đình; (B) Hình ảnh giải trình tự gen *ATP7B*.



(A)

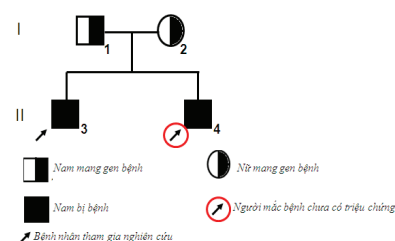


(B)

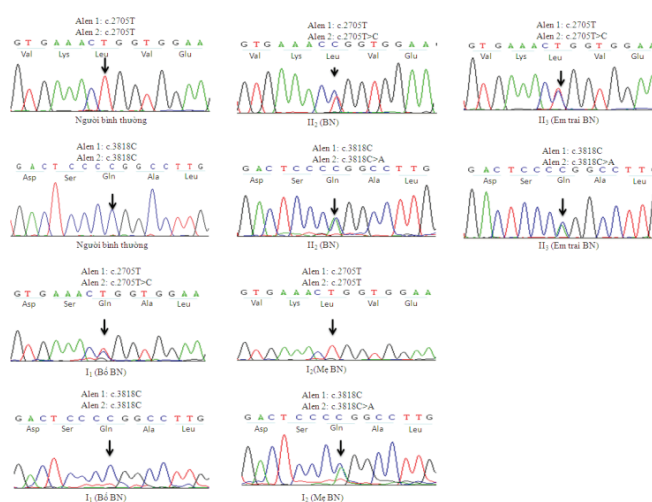
Hình 2. Sơ đồ phả hệ và một phần hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến S105X và I1148T của gia đình BN số 2. (A) Phả hệ của gia đình; (B) Hình ảnh giải trình tự gen *ATP7B*.

Kết quả phân tích trình tự gen của gia đình BN thứ hai (hình 2) cho thấy, tại vị trí 314 xuất hiện cả hai đỉnh A và C, trong khi ở người bình thường chỉ có một đỉnh C, ngoài ra tại vị trí 3443 có 2 đỉnh T và C, tại vị trí này ở người bình thường chỉ có một đỉnh T. Như vậy, BN có 2 đột biến dị hợp tử trên gen *ATP7B*, c.314C>A (S105X) và c.3443T>C (I1148T). Bố, mẹ BN (II_{1,2}) đều là người bình thường mang gen *ATP7B* bị đột biến dị hợp tử.

Gia đình BN thứ ba: Gia đình BN có người con trai lớn (III₃) được chẩn đoán mắc WD với biểu hiện lâm sàng là viêm gan mạn tính năm 4 tuổi. Em trai BN là người bệnh chưa có biểu hiện lâm sàng.



(A)

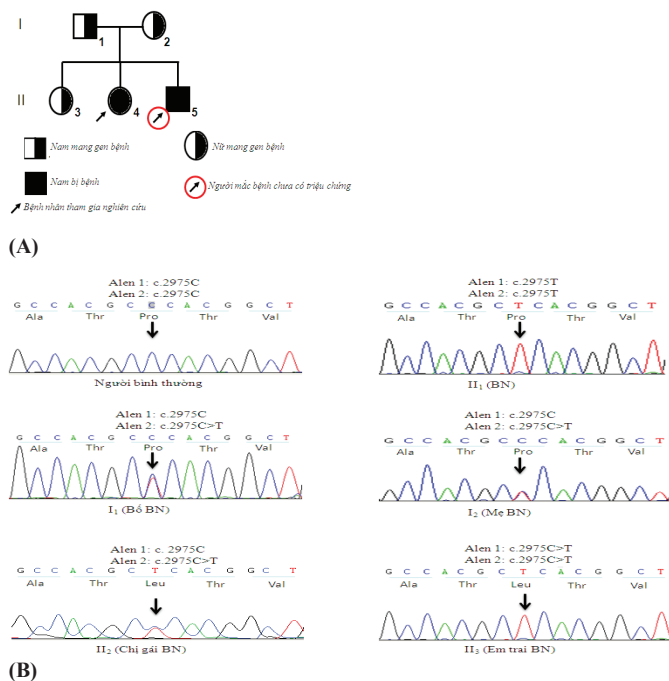


(B)

Hình 3. Sơ đồ phả hệ và một phần hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến L902P và P1273Q của gia đình BN số 3. (A) Phả hệ của gia đình; (B) Hình ảnh giải trình tự gen *ATP7B*.

Kết quả phân tích trình tự gen *ATP7B* (hình 3) cho thấy, tại vị trí 2705 xuất hiện cả 2 đỉnh T và C, trong khi ở người bình thường chỉ có duy nhất đỉnh T, ngoài ra tại vị trí 3818 cũng có 2 đỉnh C và A, trong khi ở người bình thường chỉ có một đỉnh C. Như vậy, cả 2 anh em BN đều bị 2 đột biến dị hợp tử trên gen *ATP7B*, c.2705T>C (L902P) và c.3818C>A (P1273Q). Em trai của BN là trường hợp nhỏ tuổi nhất (3 tháng) mắc WD. Bố, mẹ BN (III_{1,2}) đều là người bình thường mang gen *ATP7B* bị đột biến dị hợp tử.

Gia đình BN thứ tư: Gia đình BN có một người con gái thứ 2 (IV₄) bị WD và đã tử vong do suy gan cấp lúc 14 tuổi. Em trai BN là người bị bệnh chưa có triệu chứng lâm sàng.



Hình 4. Sơ đồ phả hệ và một phần hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến P992L của gia đình BN số 4. (A) Phả hệ của gia đình; (B) Hình ảnh giải trình tự gen *ATP7B*.

Phân tích trình tự gen mang đột biến đích được xác định trên BN đã phát hiện em trai BN có kiểu gen tương tự với BN. Kết quả phân tích trình tự gen *ATP7B* của BN (hình 4) đã chỉ rõ tại vị trí 2975 xuất hiện duy nhất đỉnh T thay thế cho đỉnh C ở người bình thường. Như vậy, BN bị đột biến đồng hợp tử (c.2975C>T, P992L). Chị gái của BN bị đột biến dị hợp tử. Kết quả giải trình tự gen *ATP7B* (hình 4) đã khẳng định BN (IV₁) bị đột biến đồng hợp tử P992L, chị gái BN (IV₂) có đột biến dị hợp tử, người em trai út của BN (IV₃) bị đột biến đồng hợp tử P992L. Bố, mẹ BN (IV_{1,2}) đều là người bình thường mang gen bệnh.

Bàn luận

Tỷ lệ phát hiện đột biến trong nghiên cứu là 91,9%, tương tự với tỷ lệ đột biến trong nghiên cứu của Trung Quốc (83,8-94,7%) và cao hơn so với tỷ lệ đột biến của Hàn Quốc (75%), Đài Loan (65,52%) [8, 13-15]. Trong số 43 BN mắc WD có 2 BN không phát hiện đột biến trên cả 2 alen của gen *ATP7B*. Hai trường hợp này có thể có đột biến ở vùng khác, nằm ngoài các exon và vùng tiếp nối giữa các exon và intron, chẳng hạn như vùng promoter hoặc các vùng intron nằm ở xa các exon của gen *ATP7B* [16]. Tuy nhiên, cỡ mẫu vẫn cần được thu thập nhiều hơn nữa để khái quát được đặc điểm đột biến, tỷ lệ đột biến chung của BN mắc WD ở Việt Nam.

Qua phân tích tỷ lệ 18 đột biến đã được phát hiện trong nghiên cứu, đột biến có tần suất cao nhất trong nghiên cứu là S105X, chiếm 34,9%. Đây không phải là một đột biến thường gặp ở châu Á. Theo đó, R778L là đột biến có tỷ lệ phát hiện cao nhất ở một số nước, vùng lãnh thổ trong khu vực châu Á như Trung Quốc (30-40%), Đài Loan (43,1%), Hàn Quốc (39,2%) [8, 17, 18]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu đột biến R778L có tỷ lệ phát hiện rất thấp,

chỉ chiếm 4,7%. Như vậy, đột biến gen *ATP7B* trên bệnh nhi mắc Wilson ở Việt Nam có thể có nhiều điểm khác biệt so với các y văn trên thế giới. Ngoài S105X, một số đột biến khác có tỷ lệ phát hiện cao bao gồm: I1148T (8,1%), IVS14-2A>G (7%), V176SfsX28 (5,8%), L1371P (4,7%) và R778L, T850I, P1273Q (3,5%). Ngoài I1148T là một trong các đột biến có tỷ lệ phát hiện cao ở Trung Quốc [10, 16], các đột biến còn lại không phải là đột biến thường gặp ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Hồng Kông. Các đột biến thường gặp ở các quốc gia này là R778L (31,9-37,7%), P992L (11,2%), T935M (10%) (Trung Quốc) hoặc R778L (17,3%), P992L (13,4%), T1178A (8,7%) (Hồng Kông), R778L, A874V, L1083F, D1270S (tần suất của 4 loại đột biến là 55,4% (Hàn Quốc) [10, 14, 19] hay 2871delC (15,9%), c.1708-5T>G (11%), R778L (13,4%) (Nhật Bản) [20].

Vùng hot-spot (điểm nóng thường xảy ra đột biến) của gen *ATP7B* trong nghiên cứu cũng khác biệt so với các nước khác ở châu Á. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đột biến thường xảy ra trên exon 2 (40,7%), exon 16 (11,6%), exon 8 (9,3%), intron 14 (7%), exon 18 (5,9%). Trong khi đó ở Đài Loan, vùng hot-spot của gen *ATP7B* bao gồm các exon 8, 12, 13, 14, 16 và 18; ở Trung Quốc bao gồm các exon 8, 12, 13 và 16 [8, 13, 14]. Các exon trong vùng hot-spot nên được ưu tiên sàng lọc đột biến để chẩn đoán WD ở Việt Nam, giúp việc chẩn đoán WD được nhanh chóng, tiết kiệm hơn.

Tỷ lệ mắc WD được chẩn đoán sớm và chưa biểu hiện lâm sàng trong nghiên cứu là 6% (4/67). Các trường hợp này lần lượt có kiểu gen là S105X/S105X, S105X/I1148T, L902P/P1273Q, P992L/P992L. Kết quả xét nghiệm sinh hóa cho thấy, 4 trường hợp trên đều có ceruloplasmin giảm, đồng niệu/24 giờ tăng cao. Trong đó, 2 trường hợp tăng men gan nhưng vẫn chưa đủ tiêu chuẩn để chẩn đoán WD theo bảng điểm của Leipzig. Phân tích kết quả giải trình tự gen đã phát hiện đột biến trên cả 2 alen của gen *ATP7B*. Với mỗi đột biến, BN sẽ được 2 điểm và khi có 2 đột biến BN sẽ được 4 điểm theo bảng điểm Leipzig và hoàn toàn đủ tiêu chuẩn chẩn đoán xác định WD [5]. Wilson là bệnh có mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình [14], vì vậy xác định kiểu gen cho các trường hợp mắc bệnh chưa có biểu hiện lâm sàng có ý nghĩa quan trọng trong thực hành lâm sàng. Dựa trên những triệu chứng và biểu hiện trên các ca chỉ điểm giúp bác sĩ tiên lượng bệnh cho các ca sàng lọc. Trường hợp thứ nhất có kiểu gen S105X/S105X, thuộc nhóm SMs/SMs (BN có hai đột biến nghiêm trọng). S105X là đột biến vô nghĩa ảnh hưởng nghiêm trọng đến quá trình tổng hợp protein dẫn tới có thể không có sản phẩm dịch mã. Do đó, BN Wilson bị đột biến S105X thường có kiểu hình nặng và phát bệnh sớm. Trong nghiên cứu, kiểu gen S105X/S105X được phát hiện trên BN Wilson có biểu hiện tổn thương gan trên lâm sàng, hoặc có thể gặp ở một số trường hợp bệnh cảnh kết hợp giữa bệnh gan và thần kinh. Chị gái của trường hợp thứ nhất được phát hiện sớm mắc Wilson (kiểu gen S105X/S105X) có biểu hiện lâm sàng nặng, bao gồm co cứng cơ, vận động tứ chi khó khăn và cuối cùng bị liệt toàn thân, do vậy nếu không được phát hiện sớm, trường hợp này có thể sẽ có biểu hiện lâm sàng nặng nề giống chị gái ruột. Anh, chị của BN số 2, 3 (kiểu gen S105X/I1148T, L902P/P1273Q) bị viêm gan mạn tính, xơ gan và hiện vẫn tiếp tục được điều trị. Mặc dù P992L là đột biến sai nghĩa, ít nghiêm trọng hơn các đột biến

vô nghĩa và đột biến dịch khung, nhưng với BN số 4 được phát hiện sớm WD trong nghiên cứu (kiểu gen P992L/P992L) có một chị gái mắc WD và đã từ vong vì suy gan cấp (kiểu gen P992L/P992L) [14, 21]. Nếu không được phát hiện sớm bằng xét nghiệm di truyền, các trường hợp bị Wilson chưa có biểu hiện lâm sàng có thể gặp các biến chứng nghiêm trọng tương tự như anh, chị của mình. Do đó, việc phát hiện sớm người bị Wilson chưa biểu hiện triệu chứng có ý nghĩa vô cùng to lớn trong điều trị dự phòng sớm nhằm ngăn chặn các biểu hiện và các biến chứng nghiêm trọng có thể xảy ra của bệnh [2, 19].

Rõ ràng, xét nghiệm di truyền là phương pháp đơn lẻ duy nhất có thể chẩn đoán xác định WD nếu phát hiện 2 đột biến trên 2 alen của gen *ATP7B*. Xét nghiệm sinh hóa đặc trưng cho WD bao gồm xét nghiệm ceruloplasmin và đồng niệu/24 giờ không phải là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán bệnh bởi ceruloplasmin có thể giảm trong một số trường hợp như mất protein ở thận hoặc ruột (marked renal or enteric protein loss). Hội chứng giảm hấp thu hoặc bệnh gan giai đoạn cuối hay bị đột biến gen nằm trên nhiễm sắc thể số 3 nhưng trong trường hợp này, BN không bị tích tụ đồng. Đặc biệt, các xét nghiệm sinh hóa không thể phát hiện được người mắc bệnh chưa có triệu chứng lâm sàng cũng như người mang gen bệnh.

Trong tổng số ca bị Wilson ở trẻ em, trường hợp có ceruloplasmin bình thường chiếm 15-36%. Ngoài ra, người mang gen bị đột biến dị hợp tử cũng có ceruloplasmin giảm và số này chiếm đến 20% [5, 11]. Ceruloplasmin không phải là một tiêu chuẩn đặc hiệu trong chẩn đoán người bệnh và người mang gen. Nó có thể được áp dụng kết hợp với nhiều xét nghiệm sinh hóa và đánh giá biểu hiện lâm sàng, tuy nhiên lúc này BN đã có triệu chứng của bệnh [8, 12, 22, 23]. Do đó, xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất để chẩn đoán sớm, chẩn đoán xác định và phân biệt bệnh với nhiều bệnh lý khác liên quan đến gan và thần kinh. Phát hiện người mang gen bệnh chính là cơ sở của tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh, giúp hạn chế tỷ lệ sinh con mắc WD, qua đó nâng cao chất lượng sống cho BN và xã hội.

Nguy cơ mắc bệnh của anh, chị, em ruột của BN là 25%, nguy cơ đối với anh, em họ hàng là 12,5%, vì vậy sàng lọc cho các thành viên trong gia đình có tiền sử mắc WD là phương pháp chẩn đoán bệnh hiệu quả nhất, giúp cho các bác sỹ có thể tiên lượng và đưa ra phác đồ điều trị sớm, nhờ đó ngăn chặn các biến chứng nghiêm trọng có thể xảy ra, đồng thời tiết kiệm chi phí điều trị cho gia đình người bệnh [7, 23, 24]. Bởi trên thực tế ở Việt Nam hầu hết các BN Wilson đều đến viện khi đã có biểu hiện lâm sàng của bệnh, hoặc BN được phát hiện muộn do lâm sàng của bệnh rất phong phú, dễ gây nhầm lẫn hoặc bỏ sót trong chẩn đoán bệnh nếu không được khám đúng chuyên khoa [2]. Một số BN có biến chứng nặng như suy gan cấp và suy gan tối cấp. BN cần ghép gan cấp cứu để đảm bảo tính mạng [5, 6] nhưng quá trình ghép gan cần tìm người hiến tạng không bị bệnh hoặc không mang gen bệnh. Do đó, xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất được thực hiện nhằm xác định người cho gan phù hợp nhất [24].

Kết luận

Tỷ lệ đột biến trên 43 BN Wilson là 91,9% (79/86 alen bị đột biến). Đột biến S105X là đột biến thường gặp nhất trong nghiên cứu (34,9%), tiếp đến là các đột biến I1148T (8,1%), IVS14-2A>G

(7%), V176SfsX28 (5,8%) và R778L, T850I, P1273Q (4,7%). Vùng hot-spot trên gen *ATP7B* trong nghiên cứu bao gồm exon 2 (40,7%), exon 16 (11,6%), exon 8 (9,3%), intron 14 (7%), exon 18 (5,9%).

Nghiên cứu đã phát hiện 4 trường hợp bị WD nhưng chưa có biểu hiện lâm sàng. Các trường hợp này đã được điều trị sớm, tránh các biểu hiện lâm sàng và các biến chứng nguy hiểm có thể xảy ra của bệnh. Xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất trong chẩn đoán xác định WD, chẩn đoán sớm cho người mắc bệnh WD chưa có triệu chứng và người bị đột biến gen dị hợp tử.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Ala, et al. (2007), "Wilson's disease", *The Lancet*, **369**(9559), pp.397-408.
- [2] D. Huster, et al. (2012), "Diverse functional properties of Wilson disease *ATP7B* variants", *Gastroenterology*, **142**(4), pp.947-956.
- [3] E.A. Roberts, M.L. Schilsky (2003), "A practice guideline on Wilson disease", *Hepatology*, **37**(6), pp.1475-1492.
- [4] S. Vrabelova, et al. (2005), "Mutation analysis of the *ATP7B* gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease", *Mol. Genet. Metab.*, **86**(1-2), pp.277-285.
- [5] European Association for the Study of the Liver (2012), "EASL Clinical practice guidelines: Wilson's disease", *J. Hepatology*, **56**(3), pp.671-685.
- [6] M. Patil, et al. (2013), "A Review and Current Perspective on Wilson Disease", *J. Clin. Exp. Hepatol.*, **3**(4), pp.321-336.
- [7] J.K. Seo (2016), "Wilson disease: An update" (Article in Korean), *Korean J. Hepatol.*, **12**(3), pp.333-363.
- [8] L. Wan, et al. (2006), "Mutation analysis of Taiwanese Wilson disease patients", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**(2), pp.734-738.
- [9] P. Ferenci (2006), "Regional distribution of mutations of the *ATP7B* gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing", *J. Hum. Genet.*, **120**(2), pp.151-159.
- [10] Y. Zhang, et al. (2011), "Wilson's disease in Asia", *Neurology Asia*, **1**(2), pp.103-109.
- [11] R.F. Pfeiffer (2007), "Wilson's disease", *Semin. in Neuro.*, **27**(2), pp.123-132.
- [12] M.L. Schilsky (2009), "Wilson disease: Current status and the future", *Biochimie*, **91**(10), pp.1278-1281.
- [13] Y.H. Gu, et al. (2003), "Mutation spectrum and polymorphisms in *ATP7B* identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnic patients with Wilson's disease", *Clin. Genet.*, **64**(6), pp.479-484.
- [14] X.H. Li, et al. (2011), "Clinical and molecular characterization of Wilson's disease in China: identification 14 novel mutations", *BMC Med. Genet.*, **12**(6), doi: 10.1186/1471-2350-12-6.
- [15] D. Kuppalu, et al. (2009), "Wilson disease mutation in the American population: Identification of five novel mutations in *ATP7B*", *The open Hepatology Journal*, **1**, pp.1-4.
- [16] L.H. Wang, et al. (2011), "Mutation analysis of 73 southern Chinese Wilson's disease patients: identification of 10 novel mutations and its clinical correlation", *J. Hum. Genet.*, **59**(9), pp.660-665.
- [17] S. Park, et al. (2007), "Identification of novel *ATP7B* gene mutation and their functional roles in Korean patients with Wilson disease", *Hum. Mutat.*, **28**(11), pp.1108-1113.
- [18] Y. Fan, et al. (2000), "Identification of a mutation hotspot in exon 8 Wilson disease gene by cycle sequencing", *Chin. Med. J. (Engl.)*, **113**(2), pp.172-174.
- [19] Y. Kusuda, et al. (2000), "Novel mutations of the *ATP7B* gene in Japanese patients with Wilson disease", *J. Hum. Genet.*, **45**(2), pp.86-91.
- [20] T. Okada, et al. (2000), "Mutational analysis of *ATP7B* and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson disease", *Hum. Mutat.*, **15**(5), pp.454-462.
- [21] L. Leggio, et al. (2007), "Analysis of the T1288R Mutation of the Wilson Disease *ATP7B* Gene in Four Generations of a Family: Possible Genotype-Phenotype Correlation with Hepatic Onset", *Dig. Dis. Sci.*, **52**(10), pp.2570-2575.
- [22] I. Maleki, et al. (2013), "Novel mutation of *ATP7B* gene in Iranian patients with Wilson's disease", *Res. Mol. Med.*, **1**(1), pp.44-47, 2013.
- [23] J. Manoochehri, et al. (2014), "Family screening for a novel *ATP7B* gene mutation, c.2335T>G, in the South of Iran", *Iran J. Ped. Hematol. Oncol.*, **4**(1), pp.26-31.

Khảo sát sự thay đổi tần số tim và huyết áp sau nhĩ áp huyết Tâm tai trái và phải trên người bình thường khi thực hiện nghiệm pháp kích thích thụ thể lạnh

Nguyễn Văn Huy, Nguyễn Văn Đàn, Trịnh Thị Diệu Thường*

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

Ngày nhận bài 31/5/2018; ngày chuyển phản biện 4/6/2018; ngày nhận phản biện 3/7/2018; ngày chấp nhận đăng 6/7/2018

Tóm tắt:

Trong y học cổ truyền, nghiệm pháp tác động lên dây thần kinh X ở loa tai đã và đang được ứng dụng để điều trị nhiều bệnh lý liên quan đến rối loạn thần kinh tự chủ. Trong đó, huyết Tâm ở xoắn tai dưới là một trong những huyết có tác động mạnh nhất lên dây X ở tai. Tuy nhiên, hiện vẫn chưa có nghiên cứu về hiệu quả của liệu pháp nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tai đối với tần số tim (TST), huyết áp (HA) tại huyết Tâm và so sánh hiệu quả giữa hai tai. Vì thế, câu hỏi nghiên cứu là sử dụng hạt dán loa tai tại huyết Tâm có làm thay đổi TST và HA trên người tăng hoạt tính giao cảm hay không? Tác động đó tại huyết Tâm giữa hai tai có khác nhau không? Nghiên cứu được thực hiện trên 60 người khỏe mạnh, chia làm 2 nhóm, mỗi nhóm 30 người, thực hiện nghiệm pháp kích thích thụ thể lạnh (Cold Pressor Test - CPT) 2 lần (không có nhĩ áp và sau khi nhĩ áp tại huyết Tâm tai trái/phải). TST được theo dõi liên tục mỗi 30 giây trong 360 giây, HA được theo dõi trước khi làm CPT và ngay sau khi kết thúc CPT. So sánh TST và HA trước - sau ở những thời điểm tương ứng trong 2 lần thực hiện CPT trong cùng một nhóm để đánh giá hiệu quả nhĩ áp huyết Tâm từng tai và so sánh sự thay đổi TST và HA giữa hai nhóm để so sánh hiệu quả của nhĩ áp huyết Tâm giữa hai tai. Kết quả cho thấy, ở cả hai nhóm, sau khi nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tai, TST theo dõi trong 360 giây khi thực hiện CPT lần 2 luôn nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê so với CPT lần 1 ($p < 0,05$), trong khi HA thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sự thay đổi TST và HA giữa hai lần CPT ở hai nhóm khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, có thể kết luận: Nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tai tại huyết Tâm làm giảm TST, nhưng không làm giảm HA trên người tăng hoạt giao cảm do CPT. Hiệu quả làm thay đổi TST của nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tai tại huyết Tâm bên trái và bên phải là tương đương nhau.

Từ khóa: Hạt dán loa tai, huyết áp, nghiệm pháp kích thích thụ thể lạnh, nhĩ áp, tần số tim.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Đột tử do tim là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở Hoa Kỳ, thường do rối loạn nhịp gây ra [1]. Trong y học cổ truyền, liệu pháp loa tai đã và đang được sử dụng thành công trong hỗ trợ điều trị một số bệnh lý tim mạch, trong đó có rối loạn nhịp [1-3]. Tác động của liệu pháp loa tai lên hệ tim mạch chủ yếu là thông qua tác động trên dây thần kinh X thuộc hệ phó giao cảm do sự phân phối phong phú của dây thần kinh này ở tai. Nhiều bằng chứng đã chỉ ra kích thích thần kinh X có tác động khá hiệu quả trong các bệnh lý rối loạn nhịp [3]. Từ lý thuyết về sự phân bố đám rối X ở tai, mối tương quan với nhân bó đơn độc ở thân não đến các chứng minh thực tế trên lâm sàng, huyết Tâm tỏ ra là một trong những huyết có hiệu lực mạnh nhất trong tác động lên các nhánh dây X ở tai [4]. Nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tai là một phương pháp trị liệu được sử dụng

từ lâu trong y học cổ truyền. Tuy nhiên những nghiên cứu về phương pháp này hiện còn khá ít so với nhĩ châm, hiện tại đã có một số chứng cứ về hiệu quả của nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tai trên một số bệnh lý [5, 6]. Mặc dù vậy vẫn chưa có nghiên cứu nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tai nào thực hiện trên huyết Tâm và so sánh hiệu quả khi tác động trên từng bên so với hai bên tai, vì theo y văn: “Dây X phải ảnh hưởng mạnh lên nút xoang, có thể làm ngưng tim trong vài giây. Dây X trái ức chế chính yếu mô dẫn truyền nhĩ thất và gây ức chế nhĩ - thất” [7]. Do vậy, mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi trong đề tài này là: Khảo sát sự thay đổi TST và HA sau sử dụng hạt dán loa tai tại huyết Tâm tai trái và tai phải trên người bình thường khi thực hiện CPT; so sánh sự thay đổi TST và HA sau sử dụng hạt dán loa tai huyết Tâm tai trái và tai phải trên người bình thường khi thực hiện CPT; khảo sát những tác dụng không mong muốn khi thực hiện CPT và khi sử dụng hạt dán loa tai tại huyết Tâm.

*Tác giả liên hệ: Email: thuong.ttd@ump.edu.vn

Auricular acupressure effect on autonomic responses during cold pressor test in healthy volunteers

Van Huy Nguyen, Van Dan Nguyen,
Thi Dieu Thuong Trinh*

Faculty of Traditional Medicine, Ho Chi Minh city Medicine and
Pharmacy University

Received 31 May 2018; accepted 6 July 2018

Abstract:

In traditional medicine, vagus nerve stimulation has been used for treating some diseases related to autonomic dysfunction. The heart is one of the acupoints which affect to vagus nerve the most. However, there is a lack of the evidence about the effectiveness of auricular acupressure with ear seeds at the Heart acupoint and the comparison of the effectiveness of the left and right Heart acupoints. This study was conducted to clarify these issues via monitoring the heart rate and blood pressure of healthy volunteers with cold pressor test. The study was implemented on sixty healthy volunteers who were divided into 2 groups, being performed cold pressor test (CPT) before and after auricular acupressure (AA) with ear seeds at the left/right Heart acupoints. The heart rate was measured continuously every 30 seconds in 360 seconds, and the blood pressure was measured before CPT and 3 minutes after CPT started. The results exhibited that after AA, heart rate measured during the second CPT reduced significantly in comparison with the first CPT ($p < 0.05$) in the both groups. There was no significant difference in blood pressure between the first and the second CPT ($p > 0.05$). And there was no significant difference in effectiveness between two groups ($p > 0.05$). In conclusion, auricular acupressure with ear seeds at the Heart acupoint could decrease the heart rate, but did not attenuate blood pressure responses during the cold pressor test in healthy volunteers. The effectivenesses of the left and right Heart acupoints on the heart rate decrement were similar.

Keywords: Auricular acupressure, blood pressure, cold pressor test, ear seeds, heart rate.

Classification number: 3.2

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng, so sánh trước - sau.

Đối tượng nghiên cứu: Áp dụng công thức $n = \frac{2xCx(1-r)}{ES^2}$, thay các giá trị tính được cỡ mẫu mỗi nhóm là 30 người, tổng cộng là 60 người.

Tiêu chuẩn chọn: Nam, nữ khỏe mạnh, tuổi từ 18-30 tuổi, chỉ số cơ thể BMI (Body Mass Index) từ 18,5-23 (kg/m^2); TST 60-100 lần/phút, mạch và TST đi đôi với nhau; không rối loạn nhịp, không thiếu máu cơ tim trên ECG; ở trạng thái thoải mái trong ngày tiến hành thử nghiệm (đánh giá theo thang điểm DASS 21 với điểm stress < 15 điểm); tự nguyện đồng ý tham gia đề tài, được đọc, giải thích tường tận và ký tên vào phiếu đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: Đang mắc các bệnh có tính chất cấp tính, cường giáp, sốt; sử dụng chất kích thích (rượu, bia, cafe, thuốc lá) trong vòng 24 giờ trước khi thực hiện đề tài; chơi thể thao, vận động trước khi tiến hành thử nghiệm; phụ nữ có thai hoặc đang hành kinh; sử dụng thuốc ảnh hưởng đến nhịp tim và HA trong vòng 1 tháng trước.

Tiêu chuẩn ngưng nghiên cứu: Xuất hiện các triệu chứng gây khó chịu cho người tình nguyện khởi phát ở bất kỳ giai đoạn nào của quá trình nghiên cứu (buồn nôn, đau đầu, chóng mặt, khó thở, vã nhiều mồ hôi); người tình nguyện không đồng ý tiếp tục tham gia nghiên cứu ở bất kỳ giai đoạn nào của quá trình nghiên cứu.

Phương pháp can thiệp

Nhĩ áp: Gắn hạt dán loa tai tại huyệt Tâm ở xoắn tai dưới hai bên, kích thích bằng ấn và day huyệt 4 lần, mỗi lần 30 giây với 60 kích thích, khoảng cách giữa mỗi lần là 5 phút.

CPT: Đối tượng nghiên cứu ngâm cùng lúc 2 chân vào nước ở 7°C sao cho nước ngập ngang hai mắt cá chân, được theo dõi bằng nhiệt kế liên tục trong vòng 3 phút.

Các chỉ số theo dõi: TST được theo dõi liên tục qua máy oxymeter hiệu GIMA; HA (bao gồm HA tâm thu - HATT và HA tâm trương - HATTr) được theo dõi bằng máy đo HA cánh tay OMRON.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm STATA 13.0. So sánh TST, HATT và HATTr ở hai thời điểm CPT lần 1 và CPT lần 2 trong từng nhóm nghiên cứu bằng phép kiểm định phi tham số. So sánh TST, HATT và HATTr trung bình ở hai thời điểm CPT lần 1 và CPT lần 2 giữa 2 nhóm nghiên cứu bằng phép kiểm Kruskal Wallis.

Kết quả nghiên cứu

Đặc điểm chung của các đối tượng trước nghiên cứu (thời điểm T10)

- Nhóm 1 (nhĩ áp huyệt Tâm tai trái): 15 nam và 15 nữ,

tuổi trung bình: $22,97 \pm 2,36$, TST trung bình: $73,07 \pm 8,01$ lần/phút, HATT trung bình: $107,63 \pm 7,20$ mmHg, HATTr trung bình: $66,03 \pm 4,82$ mmHg.

- Nhóm 2 (nhĩ áp huyết Tâm tai phải): 14 nam và 16 nữ, tuổi trung bình: $22,58 \pm 2,74$, TST trung bình: $76,13 \pm 8,37$ lần/phút, HATT trung bình: $108,83 \pm 10,93$ mmHg, HATTr trung bình: $67,34 \pm 5,86$ mmHg.

- Các chỉ số TST, HATT, HATTr trong giới hạn bình thường. Số lượng nam - nữ, tuổi, TST trung bình, HATT trung bình và HATTr trung bình giữa hai nhóm khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

Sự thay đổi TST và HA khi thực hiện CPT lần 1 (bảng 1-3)

Bảng 1. Sự thay đổi TST khi làm CPT lần 1.

Thời điểm (giây thứ)	TST nhóm 1 (lần/phút)	TST nhóm 2 (lần/phút)	Giá trị p	Nhóm 1	Nhóm 2	Giữa hai nhóm
0	73,4 $\pm$ 7,41	75,50 $\pm$ 7,95				
30	86,53 $\pm$ 11,28	83,73 $\pm$ 9,10	0-30	<0,05	<0,05	>0,05
60	86,97 $\pm$ 11,31	83,47 $\pm$ 10,96	0-60	<0,05	<0,05	>0,05
90	85,90 $\pm$ 12,75	85,47 $\pm$ 13,14	0-90	<0,05	<0,05	>0,05
120	83,47 $\pm$ 11,36	86,80 $\pm$ 13,97	0-120	<0,05	<0,05	>0,05
150	81,90 $\pm$ 10,81	84,60 $\pm$ 12,40	0-150	<0,05	<0,05	>0,05
180	83,47 $\pm$ 11,36	83,10 $\pm$ 13,35	0-180	<0,05	<0,05	>0,05
210	77,93 $\pm$ 8,74	78,83 $\pm$ 11,51	0-210	<0,05	<0,05	>0,05
240	75,23 $\pm$ 9,59	76,97 $\pm$ 11,21	0-240	>0,05	>0,05	>0,05
270	74,93 $\pm$ 9,15	76,03 $\pm$ 9,74	0-270	>0,05	>0,05	>0,05
300	73,10 $\pm$ 8,21	74,40 $\pm$ 9,64	0-300	>0,05	>0,05	>0,05
330	71,33 $\pm$ 7,98	74,27 $\pm$ 9,56	0-330	>0,05	>0,05	>0,05
360	72,47 $\pm$ 6,52	74,50 $\pm$ 8,50	0-360	>0,05	>0,05	>0,05

Nhận xét:

- Trong từng nhóm: Trong quá trình làm CPT lần 1 (ngâm chân trong nước đá liên tục), TST tăng liên tục có ý nghĩa thống kê từ giây 0 đến giây 210 từ khi bắt đầu làm CPT ($p < 0,05$). Sau khi kết thúc CPT lần 1 được 1 phút (giây 240) thì TST trở về giá trị gần với giây 0 ban đầu trước khi làm CPT (khác biệt không có ý nghĩa thống kê với TST giây 0 ($p > 0,05$)).

- Giữa hai nhóm: Sự thay đổi TST trong và sau CPT lần 1 giữa hai nhóm khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 2. Sự thay đổi HATT trước, trong và sau CPT lần 1.

Thời điểm (mmHg)	Nhóm 1 (mmHg)	Nhóm 2 (mmHg)	Giá trị p	Nhóm 1	Nhóm 2	Giữa hai nhóm
T10	107,63 $\pm$ 7,20	108,83 $\pm$ 10,93				
T25	121,73 $\pm$ 10,72	119,20 $\pm$ 13,23	T10-T25	<0,05	<0,05	>0,05
T28	114,47 $\pm$ 9,56	112,77 $\pm$ 11,36	T10-T28	<0,05	<0,05	>0,05
T33	107,90 $\pm$ 7,12	107,13 $\pm$ 10,49	T10-T33	>0,05	>0,05	>0,05
T42	107,23 $\pm$ 5,77	106,80 $\pm$ 11,24	T10-T42	>0,05	>0,05	>0,05

T10: Thời điểm lúc nghỉ, T25: Thời điểm khi bắt đầu CPT lần 1, T28: Thời điểm kết thúc CPT lần 1 ở giây 180, T33: Thời điểm 5 phút sau CPT lần 1, T42: Thời điểm trước khi làm CPT lần 2.

Bảng 3. Sự thay đổi HATTr trước, trong và sau CPT lần 1.

Thời điểm	Nhóm 1 (mmHg)	Nhóm 2 (mmHg)	Giá trị p	Nhóm 1	Nhóm 2	Giữa hai nhóm
T10	66,03 $\pm$ 4,82	67,34 $\pm$ 5,86				
T25	78,60 $\pm$ 8,67	79,00 $\pm$ 6,94	T10-T25	<0,05	<0,05	>0,05
T28	70,33 $\pm$ 7,37	73,30 $\pm$ 7,43	T10-T28	<0,05	<0,05	>0,05
T33	65,97 $\pm$ 5,16	68,37 $\pm$ 5,90	T10-T33	>0,05	>0,05	>0,05
T42	66,17 $\pm$ 4,58	67,00 $\pm$ 5,66	T10-T42	>0,05	>0,05	>0,05

Nhận xét:

- Trong từng nhóm: HATT và HATTr ở các phút 25 (T25) và phút 28 (T28) tăng có ý nghĩa thống kê so với thời điểm phút 10 (T10) ($p < 0,05$). HATT và HATTr giảm dần từ phút 25 (T25), trở về bình thường ở phút 33 (T33) ($p > 0,05$). Ở phút 42 (T42) (trước khi nhĩ áp), HATT và HATTr khác nhau không có ý nghĩa thống kê so với lúc nghỉ (T10) ($p > 0,05$).

- Giữa hai nhóm: Sự thay đổi HATT và HATTr trong và sau CPT lần 1 giữa hai nhóm khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Sự thay đổi TST và HA trong giai đoạn nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tại tại huyết Tâm (bảng 4-6)

Bảng 4. TST trong giai đoạn nhĩ áp huyết Tâm.

Thời điểm	TST Nhóm 1 (lần/phút)	TST Nhóm 2 (lần/phút)	Giá trị p	Nhóm 1	Nhóm 2	Giữa hai nhóm
T10	73,07 $\pm$ 8,01	76,13 $\pm$ 8,37				
T43t	72,80 $\pm$ 7,25	74,53 $\pm$ 8,01				
T43s	63,70 $\pm$ 7,14	65,73 $\pm$ 7,09				
T48t	71,37 $\pm$ 7,37	71,30 $\pm$ 8,71				
T48s	65,3 $\pm$ 8,671	66,03 $\pm$ 7,23	T43t-T10	>0,05	>0,05	>0,05
T53t	68,20 $\pm$ 6,33	69,70 $\pm$ 7,63	T43t-T43s	<0,05	<0,05	>0,05
T53s	64,23 $\pm$ 7,07	65,83 $\pm$ 6,41	T48t-T48s	<0,05	<0,05	>0,05
T58t	67,20 $\pm$ 6,52	70,00 $\pm$ 7,66	T53t-T53s	<0,05	<0,05	>0,05
T58s	64,30 $\pm$ 6,83	66,30 $\pm$ 7,90	T58t-T58s	<0,05	<0,05	>0,05
T60	67,10 $\pm$ 6,70	70,90 $\pm$ 8,44	T43t-T60	<0,05	<0,05	>0,05

T10: Thời điểm lúc nghỉ; T43t, T43s: Thời điểm trước và sau kích thích huyết lần 1; T48t, T48s: Thời điểm trước và sau kích thích huyết lần 2; T53t, T53s: Thời điểm trước và sau kích thích huyết lần 3; T58t, T58s: Thời điểm trước và sau kích thích huyết lần 4; T60: Thời điểm kết thúc nhĩ áp, bắt đầu CPT lần 2.

Nhận xét:

- Trong từng nhóm: TST thời điểm trước kích thích huyết Tâm (T43t) khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lúc nghỉ (T10). TST sau mỗi lần kích thích huyết thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với trước kích thích ($p < 0,05$). TST thời điểm phút 60 (T60) so với phút 43 (T43t) (sau nhĩ áp so với

trước nhĩ áp) thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Giữa hai nhóm: Sự thay đổi TST trước và sau mỗi lần kích thích huyết Tâm giữa hai nhóm khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sự thay đổi TST trước và sau nhĩ áp huyết Tâm giữa hai nhóm khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 5. HATT trước và sau nhĩ áp huyết Tâm.

Thời điểm	Nhóm 1 (mmHg)	Nhóm 2 (mmHg)	Giá trị p	Nhóm 1	Nhóm 2	Giữa hai nhóm
T42	107,23±5,77	107,13±11,03				
T59	106,47±5,75	106,97±10,39	T42-T59	>0,05	>0,05	>0,05

T42: Thời điểm trước nhĩ áp, T59: Thời điểm sau nhĩ áp.

Bảng 6. HATTr trước và sau nhĩ áp huyết Tâm.

Thời điểm	Nhóm 1 (mmHg)	Nhóm 2 (mmHg)	Giá trị p	Nhóm 1	Nhóm 2	Giữa hai nhóm
T42	66,17±4,58	67,00±5,66				
T59	66,57±7,73	68,07±5,82	T42-T59	>0,05	>0,05	>0,05

Nhận xét:

- Trong từng nhóm: HATT và HATTr thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Giữa hai nhóm: Sự thay đổi HATT và HATTr trước và sau nhĩ áp huyết Tâm giữa hai nhóm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Sự thay đổi của TST khi làm CPT lần 2 (sau nhĩ áp) so với CPT lần 1 (bảng 7-9)

Bảng 7. TST trong hai lần CPT.

Thời điểm	Nhóm 1		Nhóm 2		Giá trị p Nhóm 1	Giá trị p Nhóm 2	Giá trị p giữa hai nhóm
	TST trong CPT1 (lần/phút)	TST trong CPT2 (lần/phút)	TST trong CPT1 (lần/phút)	TST trong CPT2 (lần/phút)			
0	73,40±7,41	67,1±6,70	75,50±7,95	70,90±8,44	<0,05	<0,05	>0,05
30	86,53±11,28	80,70±9,36	81,73±9,10	78,53±9,38	<0,05	<0,05	>0,05
60	86,97±11,31	83,93±10,60	83,47±10,96	80,47±10,38	<0,05	<0,05	>0,05
90	85,90±12,75	83,93±10,60	85,47±13,14	82,77±12,60	<0,05	<0,05	>0,05
120	83,47±11,36	80,37±11,99	86,80±13,97	83,23±12,12	<0,05	<0,05	>0,05
150	81,90±10,81	79,47±9,92	84,60±12,40	81,93±11,39	<0,05	<0,05	>0,05
180	83,47±11,36	78,23±9,96	83,10±13,35	79,23±11,84	<0,05	<0,05	>0,05
210	77,93±8,74	74,60±9,55	78,83±11,51	75,73±9,46	<0,05	<0,05	>0,05
240	75,23±9,59	71,40±8,56	76,97±11,21	74,27±8,14	<0,05	<0,05	>0,05
270	74,93±9,15	71,60±7,59	76,03±9,747	72,70±8,36	<0,05	<0,05	>0,05
300	73,10±8,21	70,00±7,12	74,40±9,64	70,53±8,50	<0,05	<0,05	>0,05
330	71,33±7,98	68,90±7,38	74,27±9,56	70,77±8,58	<0,05	<0,05	>0,05
360	72,47±6,52	69,33±7,69	73,17±8,09	69,90±8,33	<0,05	<0,05	>0,05

Nhận xét:

- Trong từng nhóm: TST trong CPT lần 2 so với CPT lần 1 thấp hơn có ý nghĩa thống kê từ giây 0 đến giây 360 ($p < 0,05$).

- Giữa hai nhóm: Sự thay đổi TST giữa hai lần CPT giữa hai nhóm khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 8. HATT trong hai lần CPT.

Thời điểm	Nhóm 1 (mmHg)	Nhóm 2 (mmHg)	Giá trị p	Nhóm 1	Nhóm 2	Giữa hai nhóm
T25	121,73±10,72	119,20±13,23				
T60	120,83±10,81	116,77± 1,69				
T28	114,47± 9,56	112,77±11,36	T25-T60	>0,05	>0,05	>0,05
T63	112,13±7,30	109,33± 1,47	T28-T63	>0,05	>0,05	>0,05

T25: Thời điểm khi bắt đầu CPT lần 1, T60: Thời điểm khi bắt đầu CPT lần 2, T28: Thời điểm kết thúc CPT lần 1 ở giây 180, T63: Thời điểm kết thúc CPT lần 2 ở giây 180.

Bảng 9. HATTr trong hai lần CPT.

Thời điểm	Nhóm 1 (mmHg)	Nhóm 2 (mmHg)	Giá trị p	Nhóm 1	Nhóm 2	Giữa hai nhóm
T25	78,60±8,67	79,00±6,94				
T60	77,67±8,35	77,70±8,47				
T28	70,33±7,37	73,30±7,43	T25-T60	>0,05	>0,05	>0,05
T63	69,53±7,35	70,33±9,07	T28-T63	>0,05	>0,05	>0,05

Nhận xét:

- Trong từng nhóm: HATT và HATTr ở CPT lần 2 so với CPT lần 1 khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Giữa hai nhóm: Sự thay đổi HATT và HATTr giữa hai lần CPT khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bàn luận

Sự thay đổi TST và HA trước và sau nhĩ áp huyết Tâm

Trong nghiên cứu của chúng tôi, mỗi khi kích thích huyết Tâm, TST giảm rõ rệt, có ý nghĩa thống kê. TST nền kết thúc nhĩ áp so với trước nhĩ áp khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). HATT và HATTr trước và sau nhĩ áp huyết Tâm không thay đổi. Vì vậy, cả 2 phương pháp thử nghiệm đều có hiệu quả làm giảm TST, nhưng không ảnh hưởng đến HA. So sánh với nghiên cứu khác khảo sát về ảnh hưởng lên huyết động học khi dùng dụng cụ ấn huyết Tâm ở tai của tác giả X.Y. Gao và cộng sự cũng cho kết quả tương tự: Giảm TST và không ảnh hưởng đến HA [8]. Tuy nhiên, một bài tổng quan của tác giả Campos Filipe và cộng sự đã kết luận rằng, tác động lên các nhánh X ở tai làm giảm cả TST và HA [9]. Ngoài ra, nghiên cứu về nhĩ châm huyết Tâm ở chuột của tác giả X.Y. Gao và cộng sự cho kết quả: TST, HA giảm có ý nghĩa thống kê, trong đó diện châm làm giảm TST, HA nhiều hơn [4]. Qua đó có thể thấy, sự thay đổi các chỉ số huyết động khi kích thích nhánh X ở tai (thông qua huyết Tâm) phụ thuộc vào rất nhiều yếu

tổ. Liệu pháp nhĩ áp hoặc kích thích huyết Tâm bằng lực có hiệu quả làm giảm TST nhưng không làm thay đổi HA như các phương pháp khác.

Sự thay đổi TST và HA giữa kích thích dây X trái và phải

Trong nghiên cứu chúng tôi, so sánh về sự thay đổi TST, HATT và HATTr trước và sau nhĩ áp huyết Tâm giữa hai nhóm khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Từ đó cho thấy hiệu quả nhĩ áp huyết Tâm hai bên, một bên trái hoặc một bên phải đều có hiệu quả tương đương. Tim kiểm các bài báo so sánh kích thích dây X trái và phải cho kết quả không nhiều, chủ yếu là nghiên cứu trên động vật. Lý do của việc này là vì tính an toàn trên người [7]. Tác động lên dây X trái hoặc phải trực tiếp ở cổ có tác động khác nhau trong từng nghiên cứu. Theo tác giả Harald, có thể đó là do sự khác nhau về loài có thể dẫn đến phần nào sự khác nhau về giải phẫu dây X [7]. Bên cạnh đó còn thấy có sự khác nhau giữa kích thích dây X trực tiếp ở cổ so với các nhánh ở tai, theo tác giả M. Chen, các nhánh dây X ở tai chỉ là các nhánh ngoại vi của dây thần kinh X. Các sợi hướng tâm từ dây tiếp nhận nhận tín hiệu, dẫn truyền tín hiệu vào nhân đơn độc để phân tích và điều chỉnh. Sau đó tín hiệu sẽ gửi đến tim thông qua các sợi ly tâm của dây X cổ hai bên. Vì thế, không giống như kích hoạt dây X ở tai, kích hoạt trực tiếp dây X ở cổ có thể truyền các tín hiệu điện không đối xứng đến tim và có thể dẫn đến các đáp ứng tim mạch khác nhau. Kích thích các nhánh dây X ở tai an toàn hơn, kích thích ở tai trái hoặc tai phải an toàn và hiệu quả như nhau [10].

Sự thay đổi TST và HA giữa CPT lần 1 và CPT lần 2

Qua so sánh giữa hai lần CPT cho thấy, nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tai huyết Tâm có thể làm tăng trương lực hệ phó giao cảm và làm giảm tác động của hệ giao cảm lên tim mạch biểu hiện ở sự giảm TST trong CPT lần 2. Hiệu quả giảm TST giữa hai nhóm là tương đương, điều này đã được giải thích ở phần trước. Theo tác giả J. Schwartz Peter, kích thích sợi hướng tâm phó giao cảm (như trong nghiên cứu của nhóm chúng tôi) có thể ức chế dòng giao cảm [11]. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong nhiều bệnh lý rối loạn hệ thần kinh tự chủ, đặc biệt trong bệnh lý tim mạch [9]. Với mục đích tác động lên nhánh dây X ở tai qua huyết Tâm, chọn huyết bên tai trái hoặc tai phải có hiệu quả tương đương. Vì vậy, trong điều trị lâm sàng có thể chỉ cần kích thích huyết một bên.

An toàn của CPT và nhĩ áp huyết Tâm

Không ghi nhận tác dụng không mong muốn nào trong quá trình thực hiện CPT và nhĩ áp sử dụng hạt dán loa tai huyết Tâm. Điều này cũng phù hợp với ghi nhận trong các nghiên cứu trước [12, 13].

Kết luận

- TST giảm, HATT và HATTr không thay đổi sau sử dụng hạt dán loa tai tại huyết Tâm tai trái trên người bình thường khi thực hiện CPT.

- TST giảm, HATT và HATTr không thay đổi sau sử dụng hạt dán loa tai tại huyết Tâm tai phải trên người bình thường khi thực hiện CPT.

- Sự thay đổi TST sau sử dụng hạt dán loa tai tại huyết Tâm tai trái và tai phải trên người bình thường khi thực hiện CPT là tương đương.

- Không ghi nhận tác dụng không mong muốn khi thực hiện CPT và khi sử dụng hạt dán loa tai tại huyết Tâm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Van Wormer Arin, Lindquist Ruth, E. Sendelbach Susan (2008), "The effects of acupuncture on cardiac arrhythmias: a literature review", *Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care*, **37**(6), pp.425-431.
- [2] W. He, X. Wang, H. Shi, H. Shang, L. Li, et al. (2012), "Auricular Acupuncture and Vagal Regulation", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/786839/>.
- [3] J. Shen, D.P. Zipes (2014), "Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias", *Circulation Research*, **114**(6), pp.1004-1021.
- [4] X.Y. Gao, S.P. Zhang, B. Zhu, H.Q. Zhang (2008), "Investigation of specificity of auricular acupuncture points in regulation of autonomic function in anesthetized rats", *Autonomic Neuroscience*, **138**(1), pp.50-56.
- [5] A. Strong Roger, M. Georges Jane, D. Connelly Cynthia (2016), "Pilot evaluation of auricular acupressure in end-stage lung cancer patients", *Journal of Palliative Medicine*, **19**(5), pp.556-558.
- [6] J. Vas, M. Modesto, I. Aguilar, S. Gonçalo Cda, F. Rivas-Ruiz (2014), "Efficacy and safety of auriculopressure for primary care patients with chronic non-specific spinal pain: a multicentre randomised controlled trial", *Acupuncture in Medicine*, **32**(3), pp.227-235.
- [7] M. Stauss Harald (2017), "Differential hemodynamic and respiratory responses to right and left cervical vagal nerve stimulation in rats", *Physiological Reports*, **5**(7), pp.e13244.
- [8] X.Y. Gao, L. Wang, I. Gaischek, Y. Michenthaler, B. Zhu, et al. (2012), "Brain-modulated effects of auricular acupressure on the regulation of autonomic function in healthy volunteers", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/714391/>.
- [9] V. Campos Filipe, M. Neves Laura, Z. Da Silva Vinicius, F. Cipriano Graziella, R. Chiappa Gaspar, et al. (2016), "Hemodynamic effects induced by transcutaneous electrical nerve stimulation in apparently healthy individuals: a systematic review with meta-analysis", *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, **97**(5), pp.826-835.
- [10] M. Chen, L. Yu, F. Ouyang, Q. Liu, Z. Wang, et al. (2015), "The right side or left side of noninvasive transcutaneous vagus nerve stimulation: Based on conventional wisdom or scientific evidence?", *International Journal of Cardiology*, **187**, pp.44-45.
- [11] J. Schwartz Peter (2011), "Vagal stimulation for heart diseases: from animals to men", *Circulation Journal*, **75**(1), pp.20-27.
- [12] T.O. Kiviniemi, O. Tuomas, et al. (2011), "Cold pressor test safety - the incidence of vasovagal reactions", *American Journal of Cardiology*, **107**(3), pp.492-493.
- [13] J.Y. Tan, A. Molassiotis, T. Wang, L.K. Suen (2014), "Adverse events of auricular therapy: a systematic review", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**, <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/506758/>.

Nghiên cứu xây dựng quy trình đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng

Triệu Tiến Sang^{1*}, Trần Anh Đức², Trần Văn Khoa¹, Nguyễn Hà Anh¹
Nguyễn Thị Thanh Nga¹, Nguyễn Thị Trang³

¹Bộ môn Sinh học và di truyền y học, Học viện Quân y

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Bộ môn Y sinh học - di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 11/5/2018; ngày chuyển phản biện 15/5/2018; ngày nhận phản biện 13/6/2018; ngày chấp nhận đăng 20/6/2018

Tóm tắt:

Đứt gãy ADN tinh trùng hiện nay được biết đến là một trong những nguyên nhân chiếm tỷ lệ không nhỏ trong những ca điều trị vô sinh, khoảng 10% những bệnh nhân có kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ bình thường nhưng có mức độ đứt gãy ADN cao, giảm hiệu quả điều trị vô sinh. Phương pháp xét nghiệm đứt gãy ADN tinh trùng phổ biến nhất hiện nay là đếm số lượng tinh trùng sau xử lý với bộ Kit Halotech và thiết lập chỉ số đứt gãy ADN tinh trùng (DFI) để đánh giá nhằm tiên lượng cho các biện pháp hỗ trợ sinh sản. Nghiên cứu này nhằm mục đích xây dựng một quy trình phù hợp về thời gian và công thức các dung dịch xử lý mẫu từ hóa chất thô nhằm tiết kiệm về mặt tài chính so với việc sử dụng bộ Kit thương mại. Mẫu tinh dịch được xử lý song song bằng bộ Kit và phương pháp này để so sánh và đánh giá mức độ tin cậy. Kết quả thu được cho thấy, phương pháp này mang lại hiệu quả xử lý tương đối đồng nhất với kết quả nhận được từ bộ Kit.

Từ khóa: Đứt gãy ADN tinh trùng, hỗ trợ sinh sản, quy trình mới.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Vô sinh hiện nay là một vấn đề phổ biến và nhận được sự quan tâm ngày càng cao của xã hội. Theo thống kê, từ năm 1997 đến nay, trên toàn thế giới có khoảng 5% các cặp vợ chồng gặp những vấn đề vô sinh nghiêm trọng và chưa giải quyết được. Bên cạnh đó, khoảng 12 đến 28% các cặp đôi gặp khó khăn trong việc có con trong ít nhất 1 năm sau kết hôn [1]. Có khoảng 20-30% số ca được chuẩn đoán là do người chồng, 20-35% là do người vợ và 25-40% là do cả hai, trong đó có khoảng 10-20% không xác định được nguồn nguyên nhân [2]. Tỷ lệ vô sinh theo thống kê của các nhà nghiên cứu trên thế giới ở các thời điểm khác nhau là khác nhau. Theo thống kê trên thế giới tỷ lệ vô sinh chiếm 8-18%, cũng có nghiên cứu thống kê lên tới 40% [3]. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, cứ 6 cặp vợ chồng lại có một cặp có vấn đề về khả năng sinh sản. Ở Australia, theo nghiên cứu của Kildea (2000), tỷ lệ vô sinh chiếm 26,3% ở nam giới độ tuổi 20-45, còn tại Mỹ theo Wysahk (2001) tỷ lệ này là 17,1% [4], trong khi ở giai đoạn 2006-2010 là 9,4% ở nam giới độ tuổi 15-44 và 12% ở độ tuổi 25-44 [5].

Theo A. Hellani và cs (2006) [6], ở Ả Rập có khoảng

10-15% cặp vợ chồng vô sinh, trong đó nguyên nhân do nam giới chiếm tỷ lệ 50%. Vấn đề vô sinh cho đến nay còn rất phổ biến ở nhiều nước trên thế giới. Tỷ lệ vô sinh trên thế giới có xu hướng ngày càng gia tăng [7]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có gần 48,5 triệu cặp vợ chồng trên thế giới không thể có con sau 5 năm điều trị [8].

Ở Việt Nam, theo một nghiên cứu trên toàn quốc do Bệnh viện Phụ sản Trung ương và Trường Đại học Y Hà Nội tiến hành với 14.300 cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ đại diện cho 8 vùng sinh thái cho thấy, tỷ lệ vô sinh của dân số Việt Nam đang ở mức 7,7%. Bên cạnh đó, có đến 50% cặp đôi vô sinh có độ tuổi dưới 30. Đây là những con số rất đáng báo động vì tỷ lệ vô sinh đang gia tăng rất nhanh theo thời gian [9].

Hiện nay để xét nghiệm vô sinh với nam giới, bệnh nhân thường được chỉ định xét nghiệm tinh dịch đồ. Đây là xét nghiệm cần thiết, không quá phức tạp cũng như không tốn kém để đánh giá sơ bộ khả năng sinh sản của nam giới. Xét nghiệm tinh dịch đồ có thể cho biết các chỉ số như mật độ tinh trùng, tỷ lệ sống, tỷ lệ di động, hình thái của tinh trùng... Tuy nhiên, hiện nay có nhiều trường hợp có kết quả tinh dịch đồ bình thường nhưng vẫn bị vô sinh. Nhiều

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

Building a procedure for testing level of sperm DNA fragmentation

Tien Sang Trieu^{1*}, Anh Duc Tran², Van Khoa Tran¹,
Ha Anh Nguyen¹, Thi Thanh Nga Nguyen¹,
Thi Trang Nguyen³

¹Department of Biology and Medical Genetic, Military Medical University

²Faculty of Biology, University of Natural Sciences, Vietnam National University, Ha Noi

³Department of Medical Biology and Genetic, Ha Noi Medical University

Received 11 May 2018; accepted 20 June 2018

Abstract:

DNA fragmentation is known as a common reason contributing a noticeable proportion in infertility treatment, approximately 10% of patients who have normal semen parameters possesses a high level of DNA fragmentation which significantly reduces infertility treatment effect. The most common method of testing is counting number of sperm processed by Halotech Kit and then setting up DNA fragmentation index (DFI) to evaluate and anticipate useful assisted reproductive technology. This research worked on building up a suitable process of timing and required chemical solution formula from raw separated chemicals to reduce financial cost compared with the commercial Kit. Samples were handled parallel by this working process and the given DNA Halotech Kit to compare and evaluate reliability. Results exhibited that this method brought up a processing effect in similar pattern with the commercial Kit.

Keywords: Assisted reproduction, new procedure, sperm DNA fragmentation.

Classification number: 3.2

ngiên cứu đã chỉ ra rằng, không chỉ những đặc điểm hình thái của tinh trùng đóng góp vào khả năng thụ tinh mà còn bao gồm cả những đặc tính về mặt vật chất di truyền [10].

Đứt gãy ADN tinh trùng là một trong những rối loạn vật chất di truyền dẫn tới khả năng thụ tinh kém, thai kém phát triển hoặc thai dị tật bẩm sinh, dễ sảy thai. Thông thường trong trạng thái tự nhiên, đứt gãy ADN thường liên quan đến các rối loạn trong hoạt động chết theo chương trình hoặc do sự thành thực không thành công của tế bào tinh

trùng. Bên cạnh đó, các yếu tố bên ngoài cơ thể như chế độ dinh dưỡng, hút thuốc, trầm cảm, ma túy, độ tuổi... cũng là những nguyên nhân gây ra đứt gãy ADN tinh trùng. Cơ chế chính của đứt gãy ADN tinh trùng bao gồm: 1) Quá trình tái tổ hợp không hoàn chỉnh khi hình thành tinh trùng; 2) Bất thường trong quá trình đóng gói chất nhiễm sắc của tinh trùng; 3) Lỗi trong quá trình chết theo chương trình của tế bào; 4) Tác động oxy hoá bất lợi [11-15].

Người ta ước tính rằng, khoảng 25% bệnh nhân nam vô sinh có mức độ đứt gãy ADN tinh trùng cao [16]. Có rất nhiều mối liên hệ giữa đứt gãy ADN tinh trùng và kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ. Nam giới với kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ cho tinh trùng có khả năng di động kém thường có tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng cao [17]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, khoảng 10% bệnh nhân vô sinh có kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ bình thường có vấn đề với đứt gãy ADN tinh trùng [18]. Đứt gãy ADN tinh trùng có hậu quả đặc biệt nghiêm trọng trong việc điều trị vô sinh do làm giảm khả năng thụ tinh và chất lượng phôi thai [19, 20]. Khi ADN đứt gãy tại những vị trí chứa gen liên quan đến khả năng sinh sản hay sự phát triển, làm tổ của phôi thì tỷ lệ đẻ có được một đứa con là rất thấp. Để đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng, người ta sử dụng chỉ số DFI làm thông số chuẩn, với: DFI <15% là tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng thấp; DFI 15-30% là tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng trung bình; DFI >30% là tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng cao [21, 22].

Tỷ lệ đứt gãy này càng cao thì khả năng có con sau khi sử dụng các phương pháp hỗ trợ sinh sản càng thấp. Do đó, xét nghiệm đứt gãy ADN tinh trùng có vai trò vô cùng quan trọng vì chi phí cho các phương pháp hỗ trợ sinh sản là tương đối cao.

Trong xét nghiệm đứt gãy ADN tinh trùng có rất nhiều phương pháp đánh giá đứt gãy đã được xây dựng và công bố như: Sử dụng chất nhuộm acridine orange (AO), khảo sát cấu trúc chromatin tinh trùng (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA), sử dụng chất nhuộm aniline blue (AB), sử dụng chất nhuộm toluidine blue (TB), đánh dấu đứt gãy ADN bằng các dUTP (Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling - TUNEL), điện di tế bào đơn (COMET).

Phương pháp xét nghiệm phổ biến nhất hiện nay là khảo sát mức độ phân tán chất nhiễm sắc của tinh trùng (Sperm Chromatin Dispersion - SCD) được xây dựng bởi C. Wegner [22] do đây là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện với chi phí thấp so với những phương pháp khác và hiệu quả cao, phù hợp với điều kiện hiện nay. Tuy nhiên, chi phí cho xét nghiệm này ở nước ta hiện còn tương đối cao do phải nhập khẩu bộ Kit xử lý từ nước ngoài. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất “Nghiên cứu xây dựng quy trình đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng” theo

phương pháp SCD cho kết quả tương đương bộ Kit với độ tin cậy cao nhưng giá thành rẻ hơn.

Vật liệu và phương pháp

Thu thập mẫu

Mẫu tinh trùng được thu nhận từ Bệnh viện Nam học và hiếm muộn Hà Nội và Trung tâm Mô phôi - Học viện Quân y. Tinh dịch cần được lấy bằng tay sau khi vệ sinh bộ phận sinh dục (như thủ dâm). Không được dùng bao cao su vì trong bao cao su có thể chứa chất diệt tinh trùng. Mẫu thu nhận cần được xử lý trong vòng 1 giờ để đảm bảo kết quả xét nghiệm tốt nhất. Trong trường hợp cần lưu mẫu lâu dài, có thể sử dụng hóa chất bảo quản cung cấp cùng bộ Kit.

Hóa chất và dụng cụ

Hóa chất: Bộ kit Halosperm (bao gồm dung dịch lysis, dung dịch acid HCl, agarose, lame kính); nước cất, PBS; cồn 70 độ, cồn 90 độ, cồn 100 độ; dung dịch Giemsa 30%; các loại hóa chất khác gồm NaCl, EDTA, Tris base, Sodium N-Lauroyl Sarcosine (SLS), Dithiothreitol (DTT).

Máy móc và dụng cụ: Pipet, đầu côn, khay ngâm lam; lò vi sóng, tủ lạnh, cân điện tử; kính hiển vi quang học độ phóng đại 40X; máy đo pH.

Xử lý mẫu với bộ Kit Halosperm Test Kit (Hãng Halotech, Anh)

Mẫu tinh dịch sau khi thu nhận và bảo quản được xử lý với bộ Kit Halosperm [23] theo quy trình như sau:

Bước 1 - Chuẩn bị thạch: Đun agarose 1% trong lò vi sóng 3 phút, cho đến khi hóa lỏng hoàn toàn agarose, mỗi eppendorf chứa 100 μ l thạch agarose được sử dụng đo độ đứt gãy ADN cho một mẫu tinh dịch. Pha loãng mẫu tinh dịch bằng dung dịch PBS sao cho nồng độ khoảng 10 triệu tinh trùng/ml tinh dịch. Giữ ống agarose ở nhiệt độ 92°C bằng máy ủ eppendorf.

Bước 2 - Chuẩn bị hỗn hợp tinh dịch - thạch: Cho 30 μ l tinh dịch vào ống 100 μ l agarose và trộn đều bằng pipet. Nhanh chóng thực hiện bước kế tiếp, tránh agarose bị đông. Nhỏ một giọt 30 μ l hỗn hợp tinh dịch - thạch lên vị trí được khoanh tròn trên lam kính, đặt lam, ấn nhẹ, tránh bọt khí xuất hiện. Lam kính được đặt nằm ngang trong suốt quá trình thao tác. Đặt tiêu bản vào tủ lạnh 4°C trong 20 phút để agarose đông lại.

Bước 3 - Sau khi hỗn hợp tinh dịch - thạch đông lại: Lấy tiêu bản ra khỏi tủ lạnh, bỏ lam bằng cách trượt nhẹ ra, để tiêu bản ở nhiệt độ phòng trong 3-5 phút cho đến khi khô hoàn toàn.

Bước 4 - Biến tính ADN tinh trùng bằng dung dịch biến

tính từ bộ Kit: Đặt tiêu bản vào khay chứa dung dịch biến tính trong vòng 7 phút.

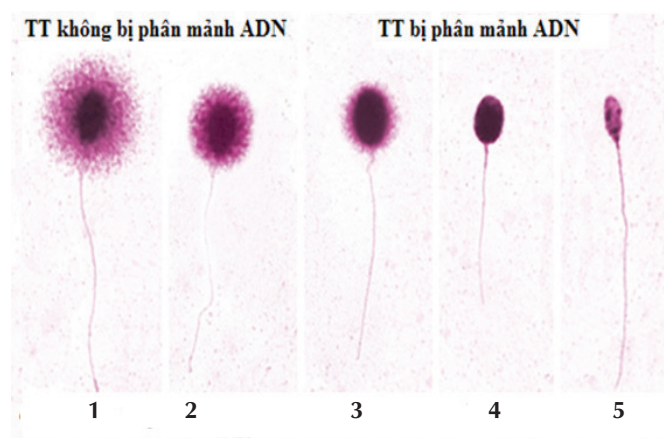
Bước 5 - Ly giải (lysis) tế bào: Lấy tiêu bản từ dung dịch biến tính và đặt vào khay chứa 10 ml dung dịch lysis trong 25 phút.

Bước 6 - Rửa dung dịch lysis: Sau khi kết thúc bước lysis, đặt tiêu bản vào khay chứa nước cất trong 5 phút để rửa dung dịch lysis.

Bước 7 - Khử nước: Khử nước bằng cách lần lượt cho tiêu bản vào dung dịch cồn 70, 90 và 100% trong vòng 2 phút mỗi dung dịch, sau đó để khô tự nhiên.

Bước 8 - Nhuộm tiêu bản: Đặt tiêu bản nằm ngang, nhỏ dung dịch Giemsa 30% phủ lên trên bề mặt tiêu bản, để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút rồi rửa qua nước từ vòi, chú ý tránh rửa quá mạnh làm nhạt màu quang halo.

Bước 9 - Đánh giá kết quả: Quan sát lam kính dưới kính hiển vi quang học, đếm ít nhất 500 tế bào tinh trùng có đuôi trong tinh dịch để xác định độ đứt gãy ADN của tinh trùng. Độ đứt gãy ADN tinh trùng được xác định bằng quang halo của tinh trùng theo Fernandez và cs (hình 1).



Hình 1. Tiêu chí phân loại tinh trùng (TT) sau khi xử lý [23]. 1: Tinh trùng có quang halo lớn (big halo): Kích thước quang halo $\geq$ đường kính ngang của nhân; 2: Tinh trùng có quang halo vừa (medium halo): $1/3$ đường kính ngang của nhân $<$ kích thước quang halo $<$ đường kính ngang của nhân; 3: Tinh trùng có quang halo nhỏ (small halo): Kích thước quang halo $\leq 1/3$ đường kính ngang của nhân; 4: Tinh trùng không có quang halo (without halo); 5: Tinh trùng thoái hóa (degraded): Tinh trùng có nhân bất màu kém, không đều.

Xử lý mẫu với phương pháp nghiên cứu

Bước 1: Chuẩn bị mẫu, quan sát mẫu trực tiếp dưới kính hiển vi và pha loãng nếu cần thiết với dung dịch PBS (tới khi đạt mật độ 10-20 tinh trùng/vi trường hiển vi).

Bước 2: Chuẩn bị gel agarose 1%, đun trong lò vi sóng trong 3 phút tới khi hóa lỏng hoàn toàn. Lấy 100 μ l agarose

vào ống eppendorf, ủ trong máy ủ eppendorf tới 96°C.

Bước 3: Mix đều 30 µl mẫu vào ống eppendorf: Nhanh tay thực hiện để tránh bị đông gel.

Bước 4: Trải đều 30 µl hỗn hợp đã mix lên lam kính, đập lamen và làm lạnh ở 4°C trong 30 phút.

Bước 5: Bóc lamen bằng cách miết nhẹ, ngâm lam trong denature solution trong 6 phút.

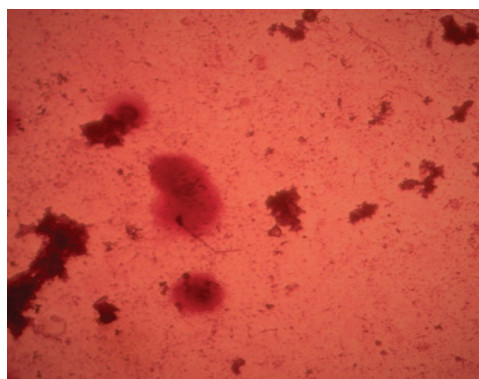
Bước 6: Loại bỏ denature solution, ngâm mẫu trong lysis solution trong 16 phút.

Bước 7: Rửa denature solution bằng cách ngâm trong nước 5 phút.

Bước 8: Khử nước bằng cồn trong 5 phút. Sau đó để khô tự nhiên.

Bước 9: Nhuộm tiêu bản bằng Giemsa (pha loãng tỷ lệ 1:2) trong 17 phút, rửa Giemsa với nước và để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng.

Bước 10: Soi tiêu bản và đếm tỷ lệ tinh trùng dưới kính hiển vi. Đếm ít nhất 500 tinh trùng để xác định độ đứt gãy ADN. Tiêu chuẩn đánh giá được xác định bằng quảng Halo theo Fernandez và cs [23] (hình 2).



Hình 2. Tinh trùng bị ly giải màng tế bào do xử lý lysis solution trong 17 phút.

Thống kê số lượng và so sánh tiêu bản

Các mẫu được xử lý với bộ Kit và phương pháp nghiên cứu được đếm số lượng tinh trùng theo tiêu chuẩn, sau đó được thống kê số lượng và so sánh với phương pháp thống kê sinh học bằng Microsoft Excel. Sau khi tính chỉ số DFI, hai dãy chỉ số này của 40 mẫu đã xử lý được kiểm tra sai số phương sai và áp dụng phương pháp kiểm định t-test với phương sai không bằng nhau.

Kết quả và bàn luận

Kết quả

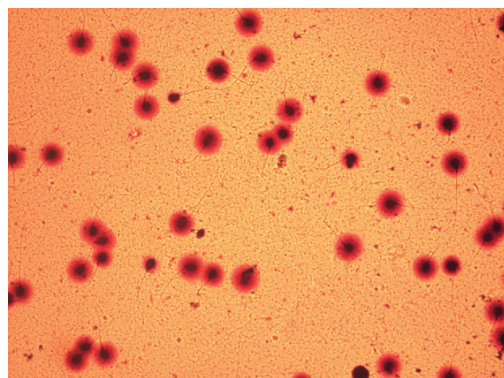
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng được quy

trình mới dựa trên nền tảng quy trình cung cấp cùng bộ Kit. Các bước xử lý đều được kiểm tra và thử nghiệm với các mốc thời gian khác nhau nhằm tìm ra thời gian phù hợp mới với các loại dung dịch hóa chất được nghiên cứu của chúng tôi.

Quy trình xử lý gồm hai dung dịch chính là denature solution và lysis solution. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tham khảo và xây dựng công thức pha hóa chất phù hợp cho hai dung dịch trên [6] được trình bày như sau:

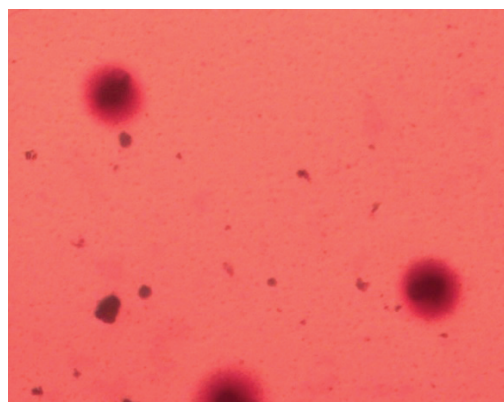
Dung dịch denature solution: HCl pha loãng (pha 80 µl HCl với 10 ml nước cất để thu được dung dịch denature solution).

Dung dịch lysis solution: 1,25M NaCl, 50mM EDTA, 100mM Tris base, điều chỉnh pH đến 10, thêm 0,01% SLS, 2 mg/ml DTT, bảo quản lạnh.



Hình 3. Tinh trùng được xử lý 6 phút với denature solution và 16 phút với lysis solution.

Chúng tôi đã thử nghiệm và đưa ra mức đề xuất thời gian xử lý với 2 dung dịch trên gồm 6 phút với denature solution và 16 phút với lysis solution (hình 3). Bất kỳ xử lý nào nhiều hơn ít nhất 1 phút so với mức đề xuất trên sẽ cho kết quả tinh trùng bị ly giải màng tế bào hoặc đứt đuôi số lượng lớn (hình 2 và 4).

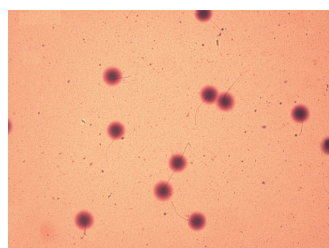


Hình 4. Tinh trùng bị đứt đuôi số lượng lớn.

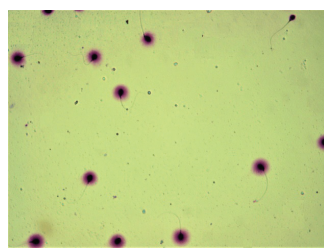
Bàn luận

Đối với dung dịch denature solution (bản chất là HCl pha loãng), chúng tôi đã tham khảo về ảnh hưởng của việc tiền xử lý với dung dịch có tính acid đối với tinh trùng trong xét nghiệm SCD. Trong nghiên cứu của Fernandez và cs, việc xử lý với dung dịch có tính acid trước khi ly giải giúp phân biệt rõ ràng sự khác nhau ở quãng Halo của tinh trùng đứt gãy và không đứt gãy. Nghiên cứu này đã khẳng định lại vai trò của dung dịch acid loãng trong xét nghiệm đứt gãy ADN.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình xử lý Sperm Chromatin Dispersion với hiệu quả tương đương như bộ Kit nhưng có giá thành rẻ hơn rất nhiều, góp phần làm giảm chi phí xét nghiệm đứt gãy ADN tinh trùng. Như trình bày, có thể thấy không có quá nhiều sự khác biệt về kích thước và chất lượng quãng Halo giữa tiêu bản xử lý bằng bộ Kit và bằng phương pháp nghiên cứu này (hình 5 và 6).



Hình 5. Tiêu bản được xử lý bằng bộ Kit.



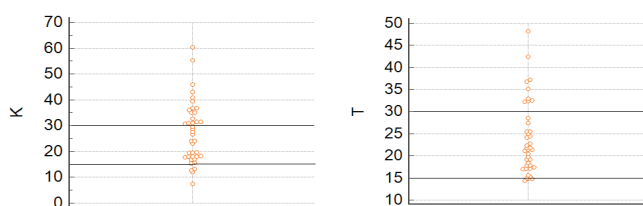
Hình 6. Tiêu bản được xử lý bằng phương pháp nghiên cứu.

Để kiểm chứng lại bằng số liệu thực tế, các mẫu sau khi được xử lý với hai phương pháp trên được đếm số lượng tinh trùng theo tiêu chí trình bày ở hình 1 tối thiểu 500 tế bào tinh trùng.

Chỉ số DFI được sử dụng như tiêu chí so sánh giữa hai phương pháp vì nó thể hiện tỷ lệ giữa số lượng tinh trùng có ADN bị đứt gãy và tổng số tinh trùng. Sau đó số liệu được thống kê số lượng và xử lý với phương pháp kiểm định thống kê sinh học. Chỉ số DFI được tính như sau:

$$DFI = \frac{\text{Halo nhỏ} + \text{Không có Halo} + \text{Bị ly giải}}{\text{Tổng}} (\%)$$

Mẫu được thống kê số lượng theo tiêu chí trình bày ở hình 1 với hai phương pháp (K - Tiêu bản xử lý bằng bộ Kit; T - Tiêu bản xử lý bằng phương pháp nghiên cứu). Phân bố dữ liệu được thống kê trong hình 7.



Hình 7. So sánh phân bố dữ liệu số lượng hai phương pháp.

Bảng 1. Tiêu bản xử lý với hai phương pháp được đếm số lượng tinh trùng theo tiêu chí đã trình bày và thống kê số lượng.

STT	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K
1	154	237	134	59	93	43	83	51	36	110
2	233	323	105	33	23	20	43	26	96	98
3	314	241	99	143	33	42	26	31	28	43
4	145	124	114	74	47	12	34	46	160	244
5	290	345	73	57	23	24	3	25	111	49
6	229	208	87	116	26	7	17	36	141	133
7	235	236	153	88	45	21	23	15	44	140
8	203	189	121	81	26	53	44	52	106	125
9	252	254	83	49	25	18	17	45	123	134
10	286	299	51	20	7	13	18	29	138	139
11	280	305	121	40	26	10	15	18	58	127
12	335	237	91	171	10	39	6	14	58	39
13	332	346	40	94	14	10	50	2	64	48
14	360	273	66	70	12	33	10	24	52	100
15	316	228	78	118	20	63	26	21	60	70
16	301	275	90	87	23	10	21	46	65	82
17	303	310	72	70	14	11	23	20	88	89
18	374	320	40	60	12	10	2	2	72	108
19	297	303	81	40	17	11	15	22	90	124
20	333	270	46	75	18	27	15	38	88	90
21	304	259	82	151	28	28	23	11	63	51
22	233	214	106	102	23	61	43	35	95	88
23	215	329	178	81	27	29	13	7	67	54
24	398	202	24	21	18	5	9	10	51	262
25	284	238	30	47	3	23	8	17	175	175
26	323	305	49	11	3	3	24	10	101	171
27	181	228	176	108	15	15	17	11	111	138
28	329	311	75	41	21	32	26	9	49	107
29	337	311	61	99	30	17	15	1	57	72
30	368	344	36	78	3	20	18	12	75	46
31	411	390	14	11	2	5	4	0	69	94
32	386	357	22	79	1	1	6	1	85	62
33	311	240	80	127	14	11	14	17	81	105
34	349	367	44	49	4	13	6	9	97	62
35	405	250	18	152	1	6	3	9	73	83
36	329	310	86	113	26	21	17	32	42	24
37	374	397	40	37	9	9	33	28	44	29
38	288	371	123	40	23	3	15	5	51	81
39	381	393	30	22	9	6	44	63	36	16
40	413	421	15	42	5	3	7	17	60	17

Vì $P(\text{Ftest})$ bằng $0,0228 < 0,05$ nên phương pháp kiểm định t-test với phương sai không bằng nhau được sử dụng.

Vi t Critical two-tail > t Stat nên giả thiết H0 được chấp nhận		
Kiểm định với dãy DFI		
Đặt H0 là: Sai khác giữa hai dãy số không mang ý nghĩa thống kê		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	Variable 1	Variable 2
Mean	23,875	27,42
Variance	66,945	140,5636923
Observations	40	40
Hypothesized Mean Difference	0	
df	69	
t Stat	-1,556424607	
P(T<=t) one-tail	0,062091154	
t Critical one-tail	1,667238549	
P(T<=t) two-tail	0,124182309	
t Critical two-tail	1,994945415	
Vi t Critical two-tail > t Stat nên giả thiết H0 được chấp nhận		

Hình 8. Kết quả kiểm định phương sai của hai phương pháp.

Như kết quả thống kê, có thể kết luận được rằng sau khi kiểm tra với số lượng tinh trùng và chỉ số DFI, không thấy có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp này (bảng 1, hình 8). Do đó, phương pháp nghiên cứu của chúng tôi có tiềm năng cao thay thế cho bộ Kit nhằm tiết kiệm chi phí xét nghiệm.

Kết luận

Đã xây dựng thành công quy trình đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] W. Himmel, et al. (1997), "Voluntary Childlessness and being Childfree", *British Journal of General Practice*, **47(415)**, pp.111-118.
- [2] ART fact sheet (2014), *European Society of Human Reproduction and Embryology*.
- [3] Nguyễn Liêu (1998), "Mấy nét bàn về vô sinh", *Tạp chí Nghiên cứu y học*, **7**, pp.28-39.
- [4] G. Whysahk (2001), "Infertility in American college alumnae", *Int. J. Gynaecology Obstet.*, **73(3)**, pp.237-242.
- [5] A. Chandra, et al. (2013), "Infertility and Impaired Fecundity in the United States, National Survey of Family Growth", *Natl. Health Stat. Report.*, **14(67)**, pp.1-18.
- [6] A. Hellani, S. Hassan (2006), "Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia", *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*, doi:10.1186/1743-1050-3-1.
- [7] S. Tan, H. Jacobs (1999), *Hỏi đáp vô sinh*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội (Trần Thị Phương Mai dịch).
- [8] M. Mascarenhas, et al. (2012), *National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 227 Health Surveys*, WHO.

[9] Bệnh viện Phụ sản Trung ương (2009), *Nghiên cứu thực trạng vô sinh ở Việt Nam theo các vùng sinh thái*.

[10] Sheena Lewis (2013), "The place of sperm DNA fragmentation testing in current day fertility management", *Middle East Fertility Society Journal*, **18(2)**, pp.78-82.

[11] J. Erenpresis, et al. (2006), "Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects", *Asian J. Androl.*, **8(1)**, pp.11-29.

[12] H. Azita, et al. (2009), "Sperm chromatin integrity: Etiologies and Mechanisms of Abnormality, Assays, Clinical Importance, Preventing and Repairing Damage", *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, **1(3)**, pp.147-160.

[13] A. Roxani, P. Konstantina, M. Pavlos (2007), "Spermatozoa sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA", *Reproductive Biology and Endocrinology*, **30**, pp.5-36.

[14] T. Said, et al. (2004), "Role of Caspases in male infertility", *Hum. Reprod. Update*, **10(1)**, pp.39-51.

[15] T. Kelton (2008), "Oxidative stress and male infertility a clinical perspective", *Human Reproduction Update*, **14(3)**, pp.243-258.

[16] E. Duran, et al. (2002), "Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: A prospective cohort study", *Human Reproduction Update*, **17(12)**, pp.3122-3128.

[17] S. Belloc, et al. (2014), "Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation", *The Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **31(5)**, pp.527-532.

[18] Phan Hoan (2015), *Đánh giá tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng ở nam giới vô sinh*, Bộ môn Y sinh học - di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội.

[19] L. Muriel, et al. (2006), "Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection", *Fertil. Steril.*, **85(2)**, pp.371-383.

[20] L. Muriel, et al. (2006), "Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: A blind prospective study", *Human Reproduction*, **21(3)**, pp.738-744.

[21] D. Evenson, et al. (2002), "Sperm chromatin structural assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques", *Journal of Andrology*, **23(1)**, pp.25-43.

[22] C. Wegner (2001), *Your insider's guide to high tech infertility treatments and taking back control of your healthcare*, Fertility Lab Insider.

[23] J. Fernandez, et al. (2003), "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation", *Journal of Andrology*, **24(1)**, pp.59-66.

Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Helicobacter pylori* của một số dịch chiết thảo dược Việt Nam

Đỗ Thị Thanh Trung¹, Phạm Thị Vui¹, Nguyễn Huyền Trang², Phạm Vinh Hoa²,
Nguyễn Thị Thanh Thi¹, Phạm Thị Lương Hằng¹, Phạm Bảo Yên^{3*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Khoa Y học cơ sở, Trường Đại học Y tế công cộng

³Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ enzyme và protein, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 2/1/2018; ngày chuyển phản biện 5/1/2018; ngày nhận phản biện 2/2/2018; ngày chấp nhận đăng 8/2/2018

Tóm tắt:

Cao chiết methanol và ethyl acetat của 30 thảo dược, đạt hàm lượng 3,43-35,29%, được đánh giá khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Helicobacter pylori* (HP). Khảo sát sự có mặt của 3 chất đã được chứng minh có tác dụng ức chế HP gồm quercetin, berberin và acid glycyrrhizic bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng cho thấy berberin phổ biến hơn 2 chất còn lại (20/30 loài thảo dược). 10/30 thảo dược ức chế mạnh sự phát triển của vi khuẩn HP với đường kính vòng kháng khuẩn 12-42 cm, trong đó, 8/10 loài chứa berberin và 7/10 loài chứa quercetin. Trong đó, cao chiết đỗ rùng và trầu không chứa nhiều chất khác quercetin, berberin và acid glycyrrhizic nên được lựa chọn để chiết tách và phân lập các hợp chất tiềm năng cho thử nghiệm tác dụng ức chế HP trong các nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: Dịch chiết, *helicobacter pylori*, thảo dược, ức chế.

Chỉ số phân loại: 3.4

Evaluation of inhibitory effects of Vietnamese medicinal plant extracts on *Helicobacter pylori*

Thi Thanh Trung Do¹, Thi Vui Pham¹, Huyen Trang Nguyen², Vinh Hoa Pham²,
Thi Thanh Thi Nguyen¹, Thi Luong Hang Pham¹, Bao Yen Pham^{3*}

¹Biology Department, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²Faculty of Basic Medicine, Hanoi University of Public Health

³The Key laboratory of enzyme protein technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 2 January 2018; accepted 8 February 2018

Abstract:

Ethyl acetate and methanol extracts of 30 Vietnamese medicinal plants with dry weight contents ranging around 3.43-35.29% were evaluated for the inhibition ability on *Helicobacter pylori* (HP). Analyses regarding the presence of three previously identified anti-HP compounds including quercetin, berberine and glycyrrhizic acid by thin layer chromatography indicated that berberine was the most common compound (20/30 plants). Ten of these 30 plants showed anti-HP activities, with inhibition zones from 12 to 42 cm, 8 of which contained berberine, and 7 of which comprised quercetin. Two plants, wild-bean and *Piper betle* showed significant activities against HP; therefore, they were identified to be further extracted and isolated to find potential compounds for HP inhibitory effect.

Keywords: Extract, HP, inhibitor, medicinal plants.

Classification number: 3.4

Đặt vấn đề

HP là xoắn khuẩn gram âm có liên quan chặt chẽ với các bệnh đường tiêu hóa. Đặc biệt, Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã phân loại HP là nguyên nhân loại I dẫn đến ung thư dạ

dày [1]. Phác đồ điều trị HP thường kết hợp các loại thuốc khác nhau như: Thuốc kháng sinh, ức chế bơm proton, khóa thụ thể H2 và các muối bismuth mang lại hiệu quả lên đến 90% [2-3]. Tuy nhiên, khi điều trị theo các phác đồ kháng

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

sinh dẫn đến một số tác dụng phụ không mong muốn, như loạn khuẩn đường ruột, nhiễm khuẩn các cơ quan, đặc biệt là hiện tượng kháng kháng sinh của các chủng HP ngày càng tăng [4]. Những liệu pháp điều trị thay thế phát triển từ việc sử dụng thảo dược trong y học dân gian được nghiên cứu để tìm ra chất ức chế HP mới. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra tác dụng ức chế HP của nhiều loại thực phẩm sử dụng trong đời sống hàng ngày như quế, việt quất, bông cải xanh và tỏi [5]. Đáng chú ý, nhiều dịch chiết từ những loài thực vật đã được chứng minh là có hoạt tính ức chế khuẩn như *Rheum palmatum*, *Rhus javanica*, *Coptis* và *Eugenia caryophyllata* ở Trung Quốc; *Myroxylon peruiferum* ở Brazil; *wasabi* ở Hàn Quốc và Nhật Bản [6]. Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo về kết quả tách chiết 30 loài thảo dược sử dụng trong chữa bệnh dạ dày và khả năng ức chế chủng HP của các dịch chiết này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu và hóa chất

Nguyên liệu: 30 mẫu thảo dược của Việt Nam được cung cấp bởi Viện Dược liệu ở dạng khô và bảo quản ở 4°C. Tên dược liệu và các bộ phận thu hái được thống kê ở bảng 1.

Hóa chất được sử dụng trong thí nghiệm này bao gồm các loại dung môi hữu cơ dùng cho tách chiết như ethyl acetat, methanol, n-hexan, dichlormethane và bản sắc ký lớp mỏng. Chất chuẩn quercetin-Q, berberin-B và acid glycyrrhizic-G được cung cấp bởi hãng Sigma.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chiết xuất: Các mẫu thảo dược được nghiền thành bột mịn rồi chiết lần lượt với 2 loại dung môi ethyl acetat và methanol [7]. Trước hết, 5 g bột khô của mỗi mẫu dược liệu được ngâm chiết trong 200 ml dung môi ethyl acetat ở nhiệt độ phòng. Sau 24 giờ, hỗn hợp được ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 5 phút để thu dịch nổi (dịch chiết ethyl acetat). Phần cặn được tiếp tục chiết với 200 ml dung môi methanol bằng cách lặp lại các bước ngâm chiết và ly tâm như trên để thu dịch chiết methanol. Mỗi loại dịch chiết ethyl acetat và methanol được làm bay hơi dung môi hoàn toàn bằng máy cô quay chân không đến cao chiết có khối lượng không đổi, rồi bảo quản ở -20°C cho đến khi thử hoạt tính.

Phương pháp điều chế tách chất béo của dịch chiết tràu không và đỗ rùng: Các dịch chiết ethyl acetate và methanol từ 5 g mỗi loại thảo dược bột tràu không hoặc đỗ rùng được gộp lại và cô quay đến khi còn khoảng 10 ml. 1 g silicagel được cho vào mỗi dịch chiết cô đặc và để khô hoàn toàn. Sau đó, 20 ml n-hexan được bổ sung vào hỗn hợp dịch chiết - silicagel và lắc đều trong 20 phút, ly tâm thu dịch trong được phân đoạn n-hexane. Phần cặn silicagel còn lại tiếp tục

Bảng 1. Kết quả hàm lượng cao chiết thu được từ 30 thảo dược.

STT	Tên khoa học	Tên thường gọi	Bộ phận dùng	Cao EtOAc (%)	Cao MeOH (%)	Tổng (%)
1	<i>Saussurea lappa Clarke</i>	Bắc mộc hương	Rễ	4,36	9,3	13,66
2	<i>Paonia lactiflora Pall</i>	Bạch thược	Rễ	1,09	6,03	7,12
3	<i>Atractylodes macrocephala Koidz</i>	Bạch truật	Thân rễ	2,25	5,69	7,94
4	<i>Taraxacum officinal Wig</i>	Bồ công anh	Thân, cành, lá, hoa	2,64	5,2	7,84
5	<i>Glycyrrhiza glabra L</i>	Cam thảo	Rễ	9,51	12,59	22,1
6	<i>Ampelopsis cantoniensis</i>	Chè dây	Cành, lá (chủ yếu)	13,11	7,58	20,69
7	<i>Oldenlandia eapitellata Kuntze</i>	Dạ cầm	Lá và ngọn	1,41	2,41	3,82
8	(Chưa xác định)	Đỗ rùng	Hạt	14,8	20,39	35,19
9	<i>Allium cepa L</i>	Hành tây tím	Thân rễ	1,64	6,31	7,95
10	<i>Allium ascalonicum</i>	Hành tím	Thân rễ	1,96	9,26	11,22
11	<i>Oroxylum indicum L</i>	Hoàng bá nam	Vỏ thân	0,91	10,42	11,33
12	<i>Astragalus membranaceus (Fisch)</i>	Hoàng kỳ	Rễ	3,64	8,25	11,89
13	<i>Coptis teeta Wall</i>	Hoàng liên	Rễ	4,56	16,84	21,4
14	<i>Lonicera japonica Thunb</i>	Kim ngân hoa	Hoa chớm nở	2,42	15,85	18,27
15	<i>Ardisia silvestris</i>	Lá khô	Lá	5,67	4,71	10,38
16	<i>Forsythia suspensa Vahl</i>	Liên kiều	Quả	13,11	13,29	26,4
17	<i>Aloe vera L var</i>	Lô hội	Nhựa cây	4,75	27,3	32,05
18	<i>Croton tonikensis Gagnep</i>	Nam khô sâm	Rễ	2,63	2,68	5,31
19	<i>Curcuma zedoaria Berg.Rosc.</i>	Nghệ đen	Rễ (củ)	2,04	9,71	11,75
20	<i>Curcuma longa L</i>	Nghệ vàng	Củ	8,38	24,98	33,36
21	<i>Cyrtomium fortunei J.Smi</i>	Quản chúng	Thân rễ	4,59	24,62	29,21
22	<i>Cinnamomum loureiroi</i>	Quế	Cành	4,37	7,89	12,26
23	<i>Amonum Xanthiodes Wall</i>	Sa nhân	Quả	3,05	7,58	10,63
24	<i>Pophora subprosrlata Chu etT. Chen</i>	Sơn đậu căn	Rễ	1,5	5	6,5
25	<i>Cimicifuga foetida L</i>	Thăng ma	Rễ	1,04	2,39	3,43
26	<i>Smilax grabra</i>	Thỏ phục linh	Rễ	1,54	15,57	17,11
27	<i>Caesalpinia sappan</i>	Tô mộc	Gỗ thân	4,55	10,38	14,93
28	<i>Strobilanthes flaccidifolius Nees</i>	Trâm	Lá và thân rễ	4,62	14,92	19,54
29	<i>Pericarpium Citri deliciasae</i>	Trần bì	Vỏ quả	1,23	20,39	21,62
30	<i>Piper betle L</i>	Trầu không	Lá	4,3	11,42	15,72

được hòa tan trong 20 ml dichloromethane và ly tâm để thu phân đoạn dichloromethane. Phần cặn silicagel còn lại được lặp lại tương tự, liên tiếp với ethyl acetate và methanol để thu tiếp hai phân đoạn ethyl acetate và methanol.

Phương pháp sắc ký bản mỏng: Cao dịch chiết được hòa tan lại trong dung môi ethyl acetat hoặc methanol ở nồng độ 30 mg/ml. Các chất chuẩn được hòa tan trong dung môi methanol ở nồng độ 3 mg/ml. Các dịch chiết và dung dịch chất chuẩn được chấm lên bản sắc ký silicagel pha thuận với các hệ dung môi khai triển gồm: (1) toluen:ethyl acetat:aceton:acid formic (TEAF-5:3:1:1); (2) butanol-acid

acetic-H₂O; (3) cloroform-acid acetic-methanol-H₂O. Sắc ký đồ được quan sát dưới đèn UV ở bước sóng 254 nm và 365 nm để phát hiện và so sánh các băng chất với các chất chuẩn.

Phân lập chủng vi khuẩn và phương pháp nuôi cấy: Mẫu sinh thiết được nhuộm Giemsa xác định sự có mặt của vi khuẩn HP. Mẫu dương tính được nghiền nát bằng chày nghiền và được cấy vào môi trường thạch máu cừu 5% và kháng sinh chọn lọc cho phân lập HP (Helicobacter pylori Selective Supplement) [8]. Các đĩa thạch được ủ ở 37°C trong điều kiện vi hiếu khí tạo bởi túi tạo môi trường GasPak™ (BD). Kết quả được đọc sau 7 ngày với sự xuất hiện của các khuẩn lạc nhỏ, trong suốt, đường kính 1-2 mm. Các thử nghiệm được sử dụng để tiếp tục xác định vi khuẩn HP bao gồm nhuộm Gram, khả năng sinh các enzym urease, catalase, oxidase và PCR với cặp mồi đặc hiệu mã hóa cho gen lipase của HP.

Thử nghiệm khả năng ức chế H. pylori của các dịch chiết: Cao chiết khô được hòa tan vào dung môi DMSO để thu được dung dịch có nồng độ là 200 mg/ml. Trước khi thử hoạt tính, 20 µl dịch chiết (nồng độ 200 mg/ml) được nhỏ lên trên khoanh giấy thấm và để bay hơi dung môi trong 3 giờ. Vi khuẩn HP được pha thành huyền dịch có độ đục McFarland là 2 (OD₆₂₅ = 0,451, khoảng 6x10⁸ tế bào) và cấy trên đĩa thạch máu. Sau đó, các khoanh giấy được đặt lên đĩa đã cấy vi khuẩn rồi ủ trong điều kiện vi hiếu khí ở 37°C. Kết quả vòng kháng khuẩn có thể quan sát sau 5 ngày.

Kết quả nghiên cứu

Lượng cao chiết tổng số từ các mẫu thảo dược

Với 30 mẫu thảo dược dùng trong nghiên cứu, sau khi chiết trong 2 dung môi thu được 60 loại cao chiết khác nhau. Sau khi làm khô, tổng lượng cao khô methanol và ethyl acetat của các mẫu nằm trong khoảng 0,19-1,76 g (tương đương 3,43-35,29%). Với hàm lượng cao khô của hai loại dịch chiết chỉ đạt 3,43% cho thấy, 2 dung môi ethyl acetat và methanol không phù hợp để chiết xuất các hợp chất từ rễ cây thăng ma. Ngược lại, hai loại dung môi này phù hợp để chiết xuất các hợp chất từ các mẫu đỗ rùng, nghệ vàng và quán chúng với hàm lượng cao khô lần lượt đạt 35,29%; 33,36% và 29,21%. Kết quả điều chế cao được chỉ ra ở bảng 1.

Khảo sát sự có mặt của chất chuẩn trong dịch chiết

3 chất quercetin-Q, berberin-B và acid glycyrrhizic-G đã được chứng minh là có hoạt tính ức chế HP hoặc enzym cần thiết cho sự phát triển HP và là thành phần có trong các dược liệu cổ truyền Việt Nam [9]. Sự có mặt của 3 hợp chất này trong dịch chiết thảo dược được xác định bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Kết quả sắc ký cho thấy, 5/30 thảo dược chứa acid glycyrrhizic (bảng 2). Tương tự, khi khảo

sát sự có mặt của berberin cho thấy 9/30 thảo dược xuất hiện băng cùng vị trí với mẫu đối chứng cho thấy mẫu hoàng liên có băng berberin đậm nhất. Chất quercetin xuất hiện phổ biến hơn ở 20/30 thảo dược, hàm lượng chất này nhiều nhất ở dịch chiết từ tô mộc và hoàng bá nam.

Bảng 2. Sự có mặt của các chất chuẩn trong dịch chiết thảo dược.

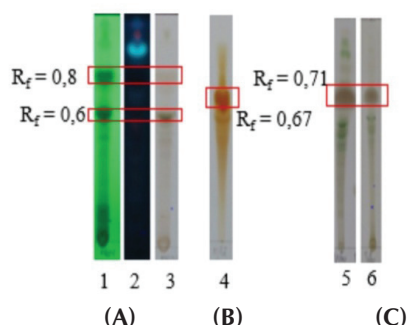
Mẫu	Dung môi Ethyl acetate (EtOAc)			Dung môi Methanol (MeOH)		
	B	G	Q	B	G	Q
Bắc mộc hương	-	-	-	+	-	-
Bạch thược	-	-	-	+	-	-
Bạch truật	-	-	-	-	-	-
Bồ công anh	-	-	-	-	-	-
Cam thảo	-	+	+	-	+	-
Chè dây	-	-	+	+	-	+
Dạ cẩm	-	-	+	-	-	+
Đỗ rùng	-	-	-	-	-	-
Hành tây tím	-	-	-	-	-	-
Hành tím	-	-	+	-	-	+
Hoàng bá nam	+	-	+	-	+	-
Hoàng kỳ	-	-	-	-	-	-
Hoàng liên	+	-	-	-	-	+
Kim ngân hoa	+	-	+	-	-	-
Lá khô	-	-	+	-	-	+
Liên kiều	-	+	+	+	-	+
Lô hội	-	+	-	-	-	-
Nam khỗ sâm	-	-	+	+	+	+
Nghệ đen	-	-	-	+	-	+
Nghệ vàng	-	-	+	-	-	-
Quán chúng	-	-	+	-	-	-
Quế	-	-	+	+	-	-
Sa nhân	-	-	-	-	-	-
Sơn đậu căn	-	-	-	-	-	+
Thăng ma	-	-	-	-	-	-
Thỏ phục linh	-	-	+	-	+	+
Tô mộc	-	-	+	-	-	+
Trâm	-	-	-	-	-	-
Trần bì	-	-	+	-	-	-
Trầu không	-	-	-	+	+	+

+: Có; -: Không.

Phân tích thành phần dịch chiết bằng các phương pháp sắc ký

Ngoài việc so sánh để xác định sự có mặt của các chất chuẩn, tất cả các dịch chiết được phân tích thành phần bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Các mẫu sau khi thấm lên bản mỏng được chạy trong hệ dung môi khai triển TEAF (5:3:1:1) và soi dưới ánh sáng khả kiến. Một số ví dụ về

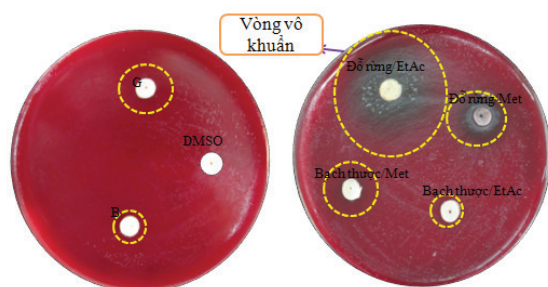
dịch chiết có băng điểm hình được thể hiện qua hình 1. Dịch chiết EtOAc nghệ vàng có băng màu vàng đậm, hệ số $R_f = 0,67$ (hình 1A), tương tự trong một nghiên cứu, băng này là curcumin [10]. Dịch chiết hoàng bá nam/EtOAc xuất hiện 2 băng màu nâu đen, với hệ số $R_f = 0,6$ và $R_f = 0,8$ (hình 1B), các chất này có thể thuộc nhóm sterol.



Hình 1. Sắc ký đồ một số dịch chiết hoặc phân đoạn. (A) Dịch chiết hoàng bá nam/EtOAc: 1) Bước sóng 254 nm, 2) Bước sóng 366 nm, 3) Ánh sáng thường; (B) 4) Dịch chiết nghệ vàng/EtOAc dưới ánh sáng thường; (C) 5) Dịch chiết trầu không/EtOAc dưới ánh sáng thường, 6) Dịch chiết trầu không/MeOH dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ (hệ dung môi TEAF-5:3:1:1) có thể nhận thấy dịch chiết trầu không trong EtOAc và MeOH đều có 1 băng rất lớn, dưới ánh sáng thường có màu xám đậm, hệ số $R_f = 0,71$, thành phần cao chiết này cần được nghiên cứu thêm.

Kết quả thử vòng kháng khuẩn

Hình 2 cho thấy, khả năng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn sử dụng phương pháp khoan giấy khuếch tán thể hiện bởi vòng vô khuẩn với đường kính khác nhau chứng tỏ khả năng ức chế khác nhau của các loại dược liệu so với đối chứng âm (dung môi) và đối chứng dương (B, G, Q). Kết quả đánh giá khả năng kháng HP cho thấy 26 dịch chiết từ 16/30 loại thảo dược có khả năng ức chế vi khuẩn HP (không quan sát thấy khuẩn lạc vi khuẩn xung quanh khoan giấy). Đáng chú ý, một số loài như nghệ đen, trầu không, chè dây, đỗ rừng có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của vi khuẩn HP (bảng 3).



Hình 2. Hoạt độ ức chế vi khuẩn HP của một số thảo dược.

Đặc biệt, khi thử nghiệm cách tách chiết phối hợp nhiều dung môi để loại chất béo đối với 2 mẫu trầu không và đỗ rừng cho thấy dịch chiết trong dung môi ethyl acetat có khả

năng ức chế vi khuẩn mạnh nhất và tăng lên nhiều sau khi tách chất béo (đường kính vòng vô khuẩn của đỗ rừng tăng từ $15,3 \pm 2,3$ mm lên 26 mm).

Bảng 3. Đường kính vòng vô khuẩn của một số dịch chiết trong ethyl acetat.

TT	Dịch chiết	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
1	Nghệ đen	42
2	Quế chi	36
3	Bắc mộc hương	36
4	Trầu không	35
5	Đỗ rừng	26
6	Kim ngân hoa	24
7	Tô mộc	24
8	Sa nhân	24
9	Chè dây	22
10	Dạ cẩm	12
11	Đối chứng âm (dung môi)	0

Bàn luận

Lượng cao khô thu được từ dịch chiết phụ thuộc vào độ phân cực của các loại dung môi sử dụng. Dung môi càng phân cực càng có khả năng hòa tan nhiều hợp chất thứ cấp của thực vật. Trong đó, nhìn chung, dịch chiết bằng dung môi methanol cho hiệu suất chiết cao hơn chiết bằng dung môi ethyl acetat với lượng cao khô trung bình tương ứng là 11,2% so với 4,4% từ 5 g bột thảo dược. Nhiều nghiên cứu đã giải thích dung môi methanol có độ phân cực cao nên có khả năng hòa tan nhiều chất thứ sinh hơn các dung môi khác [11]. Ngoài ra, lượng chất thu được phụ thuộc rất nhiều vào bộ phận thu hái gồm thân, lá, rễ. Nhiều nghiên cứu cho thấy, các hợp chất thứ sinh thường tập trung ở rễ và quả, tuy nhiên, lá lại là bộ phận dễ thu hái hơn.

Trong số 30 mẫu thảo dược nghiên cứu, 10 mẫu có hoạt tính kháng HP mạnh, trong đó có một số loài như đỗ rừng, nghệ đen và trầu không. Theo nghiên cứu của Ronita De và cộng sự (2009), curcumin tách chiết từ cây nghệ Ấn Độ ức chế vi khuẩn HP với nồng độ tối thiểu 5-50 $\mu\text{g/ml}$ [10]. Ở trong nước, Vũ Nam và cs. đã công bố chè dây có tác dụng tiêu diệt HP trên 40% [12]. Nhóm nghiên cứu này cũng nghiên cứu tác dụng ức chế HP bởi lá trầu không và đưa ra nhận định rằng dịch chiết toàn phần lá trầu không có khả năng tiêu diệt HP trên 50% [13]. Như vậy, kết quả sàng lọc ban đầu của nghiên cứu này phù hợp với các công bố trước đó về tác dụng ức chế HP mạnh của các thảo dược nêu trên.

Điểm đáng lưu ý là hầu hết các dược liệu có hoạt tính ức chế mạnh trong thành phần đều chứa berberin (8/10 loài) và quercetin (7/10 loài). Kết quả phân tích này thống nhất với một số thử nghiệm chứng tỏ khả năng kháng HP của berberin, đặc biệt là khi kết hợp với curcumin trong

nghe vàng [14]. Riêng hoàng liên, dù đã được chỉ ra thành phần có chứa nhiều berberin nhưng không nằm trong số 10 dịch chiết có hoạt tính mạnh nhất. Tương tự, dịch chiết từ cam thảo khi phân tích cho thấy xuất hiện bằng của acid glycyrrhizic cũng không nằm trong danh sách này, mặc dù hợp chất này đã được chứng minh có hoạt tính ức chế vi khuẩn. Ngược lại, một số dịch chiết dù không có hoặc có bằng chất chuẩn rất mờ nhưng vẫn cho đường kính vòng kháng khuẩn lớn như sa nhân, trầu không và đỗ rùng, có thể khả năng kháng HP là do một số hợp chất khác, cần được nghiên cứu thêm.

Kết luận

Trong đề tài này, việc sử dụng dung môi methanol cho hiệu suất chiết cao hơn (lượng cao khô nhiều hơn ở hầu hết các dược liệu), nhưng dịch chiết từ dung môi ethyl acetat có tác dụng ức chế vi khuẩn HP cao hơn. Dịch chiết của 10/30 thảo dược có khả năng ức chế vi khuẩn mạnh, trong đó bao gồm đỗ rùng, đây là nghiên cứu đầu tiên được tiến hành trên loài dược liệu dân gian này. Khi phân tích thành phần các dịch chiết, một số dược liệu chứa các chất kháng khuẩn đã biết, phổ biến là berberin và quercetin, có thể liên quan đến khả năng ức chế HP của 8/10 loài. Cao chiết đỗ rùng (bằng cả 2 loại dung môi ethylacetate và methanol) và trầu không (bằng ethylacetate) không chứa các chất B, Q, G và có khả năng ức chế mạnh được tiếp tục nghiên cứu để tìm ra hoạt chất tiềm năng kháng HP khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Forman, D.G. Newek, F. Fullerton, J.W.G. Yarnell, A.R. Stacey, N. Wald, F. Sitas (1991), "Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: Evidence from a prospective investigation", *British Medical Journal*, **302**(6788), pp.1302-1305.
- [2] J.B. Park, L.L. Imamur and K. Kobashi (1996), "Kinetic studies of *Helicobacter pylori* urease inhibition by a novel proton pump inhibitor, rabeprazole", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **19**(2), pp.182-187.
- [3] G. Sorba, M. Bertinaria, A.D. Stilo, A. Gasco, M.M. Scaltrito, M.L. Brenciaglia, F. Dubini (2001), "Anti-*Helicobacter pylori* agents endowed with H2-antagonist properties", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **11**(3), pp.403-406.
- [4] T.B. Tran, S. Shiota, L.T. Nguyen, D.D.Q. Ho, H.H. Hoang, L. Ta, D.T. Trinh, T. Fujioka, Y. Yamaoka (2013), "The incidence of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam",

Journal of Clinical Gastroenterology, **47**(3), pp.233-238.

- [5] L. Cellini, E.D. Campi, M. Masulli, S.D. Bartolomeo, N. Allocati (1996), "Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*)", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **13**(4), pp.277-279.
- [6] E.A. Bae, M.J. Han, N.J. Kim, D.H. Kim (1998), "Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **21**(9), pp.990-992.
- [7] Tran Thanh Ha, Nguyen Van Dau, Nguyen Thi Minh Nguyet, Do Thi Ha, Nguyen Dinh Tuan (2016), "Chemical constituents of n-butanol extract of *Polygonum barbatum* L. collected in Vietnam", *Journal of Medicinal Materials*, **21**(3), pp.189-193.
- [8] J.M. Whitmire, D.S. Merrell (2012), "Successful culture techniques for *Helicobacter* species: general culture techniques for *Helicobacter pylori*", *Methods in Molecular Biology*, **921**, pp.17-27.
- [9] R. Krausse, J. Bielenberg, W. Blaschek and U. Ullmann (2004), "In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of extractum liquiritiae, glycyrrhizin and its metabolites", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **54**(1), pp.243-246.
- [10] R. De, P. Kundu, S. Swarnakar, T. Ramamurthy, A. Chowdhury, G.B. Nair and A.K. Mukhopadhyay (2009), "Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(4), pp.1592-597.
- [11] R. Murugan, T. Parimelazhagan (2014), "Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. - An in vitro approach", *Journal of King Saud University - Science*, **26**(4), pp.267-275.
- [12] Vũ Nam (1995), *Góp phần nghiên cứu tác dụng của Chè dây trong điều trị loét hành tá tràng*, Luận án phó tiến sĩ khoa học y dược, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [13] Vũ Nam (2000), "Bước đầu nghiên cứu tác dụng diệt *Helicobacter pylori* bằng hoạt chất toàn phần của lá trầu không trên thực nghiệm và trong viêm dạ dày mạn tính", *Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học*, Viện Y học cổ truyền Việt Nam.
- [14] K. Pundarikakshudu and H.N. Dave (2010), "Simultaneous determination of curcumin and berberine in their pure form and from the combined extracts of *Curcuma longa* and *Berberis aristata*", *International Journal of Applied Science and Engineering*, **8**(1), pp.19-26.

Nghiên cứu khả năng ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây trong điều kiện *in vitro*

Lương Hiền Minh¹, Huỳnh Thanh Trang¹, Nguyễn Đức Bách², Phí Thị Cẩm Miện^{2*}

¹Trường THPT Chu Văn An, Hà Nội

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 28/5/2018; ngày chuyển phản biện 31/5/2018; ngày nhận phản biện 27/6/2018; ngày chấp nhận đăng 2/7/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích đánh giá hiệu quả tách thu cao dịch chiết rễ chùm ngây của 7 loại dung môi khác nhau, đồng thời đánh giá hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người (ung thư vú - MCF7, gan - HepG2, phổi - SK-LU-1, máu - Jurkat và da - SK-Mel-2) của cao dịch chiết rễ chùm ngây trong điều kiện *in vitro*. Kết quả cho thấy, hiệu quả tách chiết của 7 loại dung môi là khác nhau, trong đó sử dụng dung môi ethanol 96% cho hiệu quả tách chiết cao nhất (đạt 19,66%). Ngoài ra, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% cũng cho hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người cao hơn hẳn so với cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng nước cất. Ở nồng độ 500 µg/ml, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% có khả năng ức chế và diệt được 96,38% tế bào ung thư máu, 86,39% tế bào ung thư vú, 74,28% tế bào ung thư da, 73,89% tế bào ung thư phổi và 66,22% tế bào ung thư gan.

Từ khoá: Dịch chiết rễ chùm ngây, dung môi, HepG2, Jurkat, MCF7, SK-LU-1, SK-Mel-2.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Ngày nay, bệnh ung thư đã trở thành một vấn đề nhức nhối của toàn xã hội khi tỷ lệ người mắc bệnh ngày một gia tăng. Theo Tổ chức Y tế thế giới - WHO, tới năm 2020, số ca mắc ung thư trên toàn cầu có thể tăng lên đến 15 triệu ca mới mỗi năm. Tỷ lệ chết do ung thư có thể chiếm 25% tổng số ca tử vong [1]. Theo số liệu công bố tại Hội thảo quốc gia phòng chống ung thư, năm 2010 Việt Nam có 126.300 ca mắc mới.

Chùm ngây (*Moringa oleifera*) là một loại cây được trồng khá phổ biến và có giá trị dinh dưỡng cao. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, dịch chiết lá, thân, rễ chùm ngây có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan [2-6]. Theo báo cáo từ Trung tâm Thông tin sinh học quốc gia của Chính phủ Mỹ, dịch chiết từ lá chùm ngây có thể tiêu diệt 93% tế bào ung thư phổi ở người trong vòng 48 giờ, đồng thời có công dụng ngăn ngừa ung thư di căn [1].

Trên thế giới đã có những nghiên cứu khẳng định khả năng ức chế ung thư của cao chiết từ rễ cây chùm ngây [7]. Ở Việt Nam, cũng đã có một số nghiên cứu về khả năng chống oxy hóa của dịch chiết chùm ngây. Benzyliso thiocyanate là hợp chất có tác dụng ức chế mạnh sự phát triển của tế bào

ung thư có trong rễ chùm ngây. Hiệu suất quá trình tách chiết các hợp chất thứ cấp, đặc biệt là benzylisothiocyanate phụ thuộc vào loại dung môi sử dụng. Trong nghiên cứu này, nhằm thu được cao chiết chùm ngây có hàm lượng benzylisothiocyanate cao nhất, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tách chiết thu cao chiết rễ chùm ngây bằng 7 loại dung môi khác nhau, đồng thời đánh giá hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây thu được.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

- Rễ cây chùm ngây 3-5 năm tuổi.

- 5 dòng tế bào ung thư ở người gồm: MCF7, HepG2, SK-LU-1, Jurkat và SK-Mel-2 được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách, thu cao dịch chiết rễ chùm ngây:

Rễ chùm ngây sau khi thu được rửa sạch, thái nhỏ và xay nhỏ thành bột. Bột rễ chùm ngây được chiết với 7 loại dung môi có độ phân cực khác nhau (nước cất, methanol 80%,

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

Study on the ability to inhibit five cancer cell lines of the moringa root extract in *in vitro* conditions

Hien Minh Luong¹, Thanh Trang Huynh¹,
Duc Bach Nguyen², Thi Cam Mien Phi^{2*}

¹Chu Van An High School, Ha Noi

²Biotechnology Faculty, Vietnam National University of Agriculture

Received 28 May 2018; accepted 2 July 2018

Abstract:

This study was conducted to evaluate the effect of moringa root extraction from seven different solvents and to evaluate the inhibition ability against five human cancer cell lines (breast cancer - MCF7, hepatic cancer - HepG2, lung cancer - SK-LU-1, blood cancer - Jurkat, and skin cancer - SK-Mel-2) *in vitro*. The results showed that the extraction efficiency of 7 different solvents was different, using the 96% ethanol solvent resulted in the highest extracting efficiency (19.66%). In addition, the root extraction using ethanol (96% ethanol) gave significantly higher levels of inhibitory effect on five human cancer cell lines than the root extraction using distilled water. At a concentration of 500 µg/ml, the root extracts with ethanol (96% ethanol) can inhibit and kill 96.38% of leukemia cells, 86.39% of breast cancer cells, 74.28% of skin cancer cells, 73.89% of lung cancer cells, and 66.22% of liver cancer cells.

Keywords: HepG2, Jurkat, MCF7, moringa root extract, SK-LU-1, SK-Mel-2, solvent.

Classification number: 3.4

ethanol 70%, ethanol 96%, n-hexan, aceton 100% và aceton nitril 100%) bằng phương pháp ngâm chiết ở nhiệt độ phòng với cùng một tỷ lệ (50 g bột rễ khô/500 ml dung môi), mỗi ngày được lắc đảo 2 lần. Sau 72h, thu dịch chiết, lọc qua vải màn và giấy lọc Whatman No.1. Dịch chiết được đem cô quay hút chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi tới khi khối lượng không đổi thu được cao khô, đem cân cao khô để tính hiệu suất tách chiết.

Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ung thư của dịch chiết rễ chùm ngây trong điều kiện *in vitro*:

Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD - Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn.

Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- Pha chất thử thành các dải nồng độ thích hợp.

- Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.

- Cho chất thử đã pha ở các nồng độ vào các giếng của đĩa 96 giếng, thêm tế bào đã điều chỉnh nồng độ phù hợp ở trên vào các giếng.

- Ủ trong tủ ấm 48h. Giếng không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (180 ml), được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1h, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloroacetic acid - TCA.

- Sau 48h, tế bào được cố định bằng TCA trong 1h, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37°C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.

- 10mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút.

- Đọc kết quả OD ở bước sóng 515-540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad).

- Khả năng ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ức chế} = 100\% - \frac{[\text{OD}(\text{chất thử}) - \text{OD}(\text{ngày 0})] \times 100}{\text{OD}(\text{đối chứng âm}) - \text{OD}(\text{ngày 0})}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10; 2; 0,4; 0,08 mg/ml được sử dụng như là chất đối chứng dương.

- DMSO 10% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

- Theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), căn chiết được coi có hoạt tính tốt với IC₅₀ ≤ 20 µg/ml, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt (hit compound) khi IC₅₀ ≤ 5µM [8].

Kết quả và thảo luận

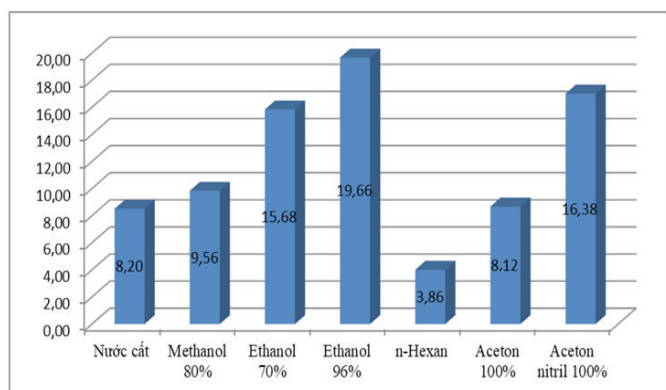
Hiệu suất thu cao dịch chiết rễ chùm ngây bằng 7 dung môi khác nhau

Tiến hành ngâm bột rễ chùm ngây trong 7 loại dung môi có độ phân cực khác nhau trong 72h, lọc sơ bộ qua vải màn và giấy lọc. Dịch chiết sau khi thu được đem cô quay hút chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi tới khi khối lượng không đổi. Kết quả thu được ở bảng 1 và hình 1 cho thấy, cùng một phương pháp chiết xuất nhưng hiệu quả chiết xuất khi sử dụng các loại dung môi là khác nhau. Khối lượng cao khô thu được (từ 50 g bột rễ chùm ngây) dao động từ 1,93 g (dung môi n-hexan) đến 9,83 g (dung môi ethanol 96%), tương đương với hiệu suất tách chiết dao động từ 3,86% đến 19,66%. Dung môi ethanol 96% cho hiệu quả tách chiết cao nhất (19,66%) do ethanol hòa tan được các alkaloid, tinh dầu, glycosid và benzylisothiocyanate, tiếp đến là 2 dung môi aceton nitril 100% và ethanol 70%, dung môi n-hexan cho hiệu suất tách chiết thấp nhất (3,86%). Trong 7 loại dung môi sử dụng, chỉ có n-hexan là dung môi không phân cực và cũng là dung môi cho hiệu suất tách chiết thấp nhất (3,86%), do đó có thể sơ bộ kết luận rằng các hoạt chất trong rễ chùm ngây tan chủ yếu trong dung môi phân cực.

Bảng 1. Khối lượng cao khô thu được từ 50 g bột rễ chùm ngây khi sử dụng các loại dung môi khác nhau.

	Loại dung môi					
	Nước cất	Methanol 80%	Ethanol 70%	Ethanol 96%	n-hexan	Aceton 100% Aceton nitril 100%
Khối lượng cao khô (g)	4,10 ^b	4,78 ^c	7,84 ^d	9,83 ^e	1,93 ^a	8,19 ^d

Ghi chú: a, b, c, d, e chỉ sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê $P < 0,05$.



Hình 1. Hiệu suất thu cao khô dịch chiết rễ chùm ngây bằng các loại dung môi khác nhau (%).

Kết quả xác định khả năng ức chế tế bào ung thư của cao chiết rễ chùm ngây trên 5 dòng tế bào ung thư ở người

Trong nghiên cứu này, thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Monks và cộng sự để đánh giá hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây [9]. Để đánh giá về hiệu suất tách chiết, chúng tôi lựa chọn 2 loại cao dịch chiết là cao dịch chiết bằng dung môi

ethanol 96% và cao dịch chiết bằng nước cất (đối chứng) để xác định hiệu quả ức chế sự phát triển của tế bào ung thư của cao chiết. Kết quả thu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây.

		Hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư (%)				
		MCF7	HepG2	SK-LU-1	Jurkat	SK-Mel-2
Nồng độ dịch chiết bằng ethanol 96% (µg/ml)	500	86,39	66,22	73,89	96,38	74,28
	100	62,67	51,96	52,67	72,77	56,98
	20	46,52	37,06	38,20	48,39	39,06
	4	28,97	26,65	25,64	32,27	25,72
	IC ₅₀	>500	>500	>500	>500	>500
		Hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư (%)				
		MCF7	HepG2	SK-LU-1	Jurkat	SK-Mel-2
Nồng độ dịch chiết bằng nước cất (µg/ml)	500	43,04	31,89	36,24	48,03	35,32
	100	30,86	26,05	22,18	31,80	28,02
	20	22,31	18,20	14,06	20,19	19,97
	4	16,49	16,64	10,52	16,22	11,27
	IC ₅₀	>500	>500	>500	>500	>500
		Hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư (%)				
		MCF7	HepG2	SK-LU-1	Jurkat	SK-Mel-2
Nồng độ Ellipticine (µg/ml)	10	97,31	96,40	92,86	107,34	98,73
	2	75,72	91,45	82,18	90,32	78,91
	0,8	49,92	46,25	49,62	51,16	48,72
	0,4	21,36	23,99	25,09	27,00	22,45
	IC ₅₀	0,45±0,02	0,37±0,04	0,39±0,05	0,30±0,07	0,42±0,03

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% cho hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người cao hơn hẳn so với cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng nước cất. Cụ thể, đối với cao dịch chiết rễ chùm ngây bằng dung môi nước cất, ở nồng độ 500 µg/ml có khả năng ức chế và diệt được 48,03% tế bào ung thư máu và 43,04% tế bào ung thư vú trong điều kiện in vitro, các dòng tế bào ung thư còn lại, dịch chiết rễ chùm ngây đều ức chế được >30%. Trong khi đó, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% ở nồng độ 500 µg/ml có khả năng ức chế và diệt được 96,38% tế bào ung thư máu, 86,39% tế bào ung thư vú, 74,28% tế bào ung thư da, 73,89% tế bào ung thư phổi và 66,22% tế bào ung thư gan. Nồng độ cao chiết giảm thì khả năng ức chế của tế bào ung thư giảm theo. Có thể thấy rằng, cao dịch chiết rễ chùm ngây có hiệu quả ức chế cao nhất đối

với tế bào ung thư máu và thấp nhất đối với tế bào ung thư gan.

Chất đối chứng tham khảo Elippticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm, các kết quả trên là chính xác với $r^2 \geq 0,99$. Các kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy, dịch chiết chùm ngây toàn phần từ ethanol và nước cất có khả năng gây độc cho tế bào thấp, do đó cần tiếp tục đánh giá tác dụng kháng ung thư của cao chiết từ các loại dung môi, các phân đoạn, và các hợp chất khác nhau.

Kết luận

- Trong các loại dung môi thí nghiệm, dung môi ethanol 96% cho hiệu suất tách thu cao dịch chiết rễ chùm ngây cao nhất (đạt 19,66%), dung môi n-hexan cho hiệu suất chiết thấp nhất (chỉ đạt 3,86%).

- Cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% có khả năng ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người cao hơn hẳn so với cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng nước cất ở tất cả các công thức thí nghiệm.

- Trong 5 loại tế bào ung thư ở người, cao dịch chiết rễ chùm ngây có khả năng ức chế mạnh nhất đối với tế bào ung thư máu và kém nhất đối với tế bào ung thư gan. Ở nồng độ 500 $\mu\text{g/ml}$, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% có khả năng ức chế 96,38% tế bào ung thư máu, trong khi đó con số này ở tế bào ung thư gan là 66,22%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D. Ahmedin Jemal, P. Freddie Bray, M. Melissa, M. Center, M. Jacques Ferlay, P. Elizabeth Ward, P. David Forman (2011), "Global Cancer Statistics", *Cancer Journal for Clinicians*, **61**, pp.69-90.

[2] Phí Thị Cẩm Miên, Trần Văn Thái, Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương, Đỗ Thị Thảo (2017), "Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết chùm ngây (*Moringa oleifera*) trên chuột gây tổn thương gan bằng Carbon tetrachloride (CCl_4)", *Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt Nam*, **15(2)**, tr.225-233.

[3] Phan Thị Bích Trâm và Nguyễn Thị Diễm My (2016), "Khảo sát hoạt tính các hợp chất kháng oxy hóa trong lá và thân cây chùm ngây (*Moringa oleifera*)", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **3**, tr.179-184.

[4] Nguyễn Bảo Trân, Trần Quang Vinh, Nguyễn Ngọc Khôi (2011), "Tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của lá cây chùm ngây (*Moringa oleifera*)", *Tạp chí Dược học*, **5**, tr.421-425.

[5] S. Mohanraj, B. Sangameswaran, K.C. Santhosh, K.S. Vinoth, N.C. Atul (2013), "Hepatoprotective effect of leaves of *Morinda tinctoria* Roxb. against paracetamol induced liver damage in rats", *Drug Invention Today*, **5(3)**, pp.223-228.

[6] N. Muhammad, H. Imtiaz, I. Saima (2013), "Antioxydant Potential of *Moringa oleifera* Leaf Extract for the Stabilisation of Butter at Refrigeration Temperature", *Czech Journal of Food Sciences*, **31(4)**, pp.332-339.

[7] Aliaa Hussein, Mohammad El-Sayed Osman, Khaled A. El-DougDoug, Reham Mostafa, Albaz, AlyFahmy Mohamed (2017), "Comparative Evaluation of Anticancer Potential of *Moringa oleifera*, *Ganoderma lucidum* and Silver Nanoparticles Against Breast and Liver Cancer Cell Lines and Related Pro and Anti Apoptotic Genes Profile", *International Journal of Scientific Research and Management (IJSRM)*, **03**, pp.5242-5252.

[8] J.P. Hughes, et al. (2011), "Principles of early drug discovery", *Br. J. Pharmacol.*, **162(6)**, pp.1239-1249.

[9] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd (1991), "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines", *Journal of National Cancer Institute*, **11(83)**, pp.757-766.

Nghiên cứu sự thích ứng của 4 giống/dòng lúa (*Oryza sativa* L.) trong điều kiện khô hạn nhân tạo giai đoạn sinh dưỡng

Nguyễn Thị Bích Vân*, Võ Công Thành

Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng,
Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 6/2/2018; ngày chuyển phân biện 15/2/2018; ngày nhận phân biện 19/3/2018; ngày chấp nhận đăng 27/3/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm hiểu sự thích ứng về biểu hiện sinh hóa của 4 giống/dòng lúa đáp ứng trong điều kiện hạn giai đoạn sinh dưỡng. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu thừa số hai nhân tố khối hoàn toàn ngẫu nhiên, nhân tố thứ nhất là 4 giống/dòng IR64, CTUS4, Nàng núa, LH01 (giống IR64 được sử dụng làm đối chứng nhạy cảm với hạn); nhân tố thứ hai là 2 điều kiện tưới (đủ nước, không tưới nước) với 3 lần lặp lại. Kết quả cho thấy, để thích ứng trong điều kiện hạn, 4 giống/dòng có sự tích lũy cao hàm lượng chlorophyll, đường tổng và proline trong lá. Hàm lượng chlorophyll a tăng từ 1,1-1,6 lần, chlorophyll b tăng từ 1,2-1,5 lần, chlorophyll tổng tăng từ 1,3-1,4 lần, đường tổng tăng từ 1,2-3 lần, proline tăng từ 2,2-9,5 lần. Hai dòng CTUS4 và LH01 có sự tích lũy hàm lượng đường tổng và proline thấp nhất. Đường tổng và proline có hệ số biến thiên kiểu gen (22%; 99,3%), hệ số di truyền (96,1%, 99,8%) cao cho thấy hiệu quả chọn lọc cao đối với khả năng chịu hạn.

Từ khóa: Chịu hạn, giai đoạn sinh dưỡng, hệ số di truyền, sinh hóa.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) từ năm 2000 đến nay hạn hán đã xảy ra vào các năm 2002, 2004, 2005, 2006, 2009, 2015 và 2016. Trong đó, đợt hạn hán và xâm nhập mặn vào mùa khô năm 2016 gây ảnh hưởng lớn nhất, toàn vùng ĐBSCL đã có đến 208.000 ha lúa bị thiệt hại, với hơn 60% bị thiệt hại nặng và nhiều vùng bị mất trắng. Do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu nên tình trạng hạn hán sẽ ngày càng nghiêm trọng [1].

Hạn được chia làm ba loại là hạn giai đoạn sinh dưỡng, hạn gián đoạn và hạn cuối vụ [2]. Hạn giai đoạn sinh dưỡng phổ biến ở khu vực Mekong, đặc biệt là ở Campuchia, nơi lượng mưa thường giảm vào đầu đến giữa mùa mưa, hạn giai đoạn sinh dưỡng được đề cập là mối quan tâm chính [3]. Phát triển các giống lúa có khả năng thích nghi và chống chịu hạn hán giai đoạn này được xem là vấn đề cấp thiết hiện nay.

Giống lúa IR64 (*Oryza sativa* var. indica) có nguồn gốc từ Viện Nghiên cứu lúa quốc tế (IRRI), được trồng rộng rãi ở Nam và Đông Nam Á, có hệ thống rễ nông [4]. IR64 là giống nhạy cảm với hạn [5], được sử dụng làm vật liệu trong

nhiều nghiên cứu về sự thích ứng của cây lúa trong điều kiện hạn, như sự thay đổi hàm lượng chlorophyll, đường tổng, proline trong lá, ảnh hưởng của hạn đến các đặc tính lá, rễ [6-8].

Điều chỉnh áp suất thẩm thấu là một trong những con đường quan trọng trong việc thích ứng của thực vật đối với sự thiếu nước bằng cách tổng hợp các chất có vai trò thẩm thấu như proline, đường tổng. Nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm hiểu biểu hiện về hình thái, sinh lý - sinh hóa của 4 giống/dòng đáp ứng trong điều kiện khô hạn giai đoạn sinh dưỡng sử dụng giống IR64 làm đối chứng nhạy cảm với hạn, từ đó làm tiền đề cho những nghiên cứu về công tác chọn tạo giống lúa chống chịu hạn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm nghiên cứu

Hạt của 3 dòng lúa CTUS4, LH01, Nàng núa nhận từ Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng - Trường Đại học Cần Thơ, giống IR64 nhận từ IRRI được trồng từ tháng 7-10/2017 tại nhà lưới có mái che thuộc Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenthibichvan.hg@gmail.com

The adaptation of four rice (*Oryza sativa* L.) varieties/lines at the vegetative stage in drought conditions

Thi Bich Van Nguyen*, Cong Thanh Vo

Department of Genetics and Plant Breeding,
College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University

Received 6 February 2018; accepted 27 March 2018

Abstract:

This study was conducted to investigate the biochemical adaptation of four rice varieties/lines under to vegetative stage drought stress. Experiment units were arranged in a two-factor randomized complete block design: the first factor was four rice varieties/lines (CTUS4, Nang niu, IR64, LH01), and the other was irrigation conditions (irrigated, drought stress), with three replications. The IR64 was used as a drought-sensitive control. The results show that, there was a high accumulation of chlorophyll, total sugar, and proline in leaves of the four rice varieties/lines to adapt to the drought conditions. Chlorophyll a content increased by 1.1-1.6 times, chlorophyll b content increased by 1.2-1.5 times, total chlorophyll content increased by 1.3-1.4 times, total sugar content increased by 1.2-3 times, and proline content increased by 2.2-9.5 times. The CTUS4 and LH01 had the lowest total sugar and proline accumulation. Total sugar and proline had a high genotypic coefficient of variation (GCV) and a high heritability (h^2), which shows that the selection for such characters could be fairly easy due to a high additive effect for drought tolerance.

Keywords: Biochemical, drought tolerance, heritability, vegetative stage.

Classification number: 4.1

Bảng 1. Danh sách các giống lúa được sử dụng.

Tên giống/dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Nguồn
IR64	95-100	IRRI
Nàng niu	95	Đột biến từ giống lúa mùa Nàng niu (Đỗ Tuấn Đạt (2013) [9])
CTUS4	110	Đột biến từ giống lúa mùa Sỏi (Quan Thị Ái Liên (2013) [10])
LH01	95	Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm:

Đất trồng được phơi khô, làm nhuyễn, loại bỏ các tạp chất, sau đó được bổ sung thêm cát (tỷ lệ 6 cát:4 đất). Đất được cho vào chậu (50x30x30 cm), các chậu sau đó được làm ẩm bằng cách tưới một lượng nước đồng nhất.

Bố trí thí nghiệm theo phương pháp Uga (2012) [11]. Hạt sau khi nảy mầm được gieo vào chậu, mỗi cây/chậu. Thí nghiệm bố trí theo kiểu thừa số hai nhân tố khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 giống/dòng, 2 điều kiện tưới (đủ nước, không tưới nước) với 3 lần lặp lại. Nghiệm thức đối chứng được tưới nước thường xuyên, nghiệm thức gây hạn nhân tạo sau khi gieo các chậu không được tưới nước cho đến khi cây có biểu hiện hạn.

Các chậu được bổ sung phân bón theo công thức 100 N - 60 P_2O_5 - 60 K_2O /ha bón vào các thời điểm: Bón lót, 7, 25 ngày sau khi gieo. Ở giai đoạn 7, 25 ngày sau khi gieo, phân bón được hòa tan với một lượng nước vừa đủ, sau đó tưới cho cây.

Chỉ tiêu theo dõi:

* Đo độ ẩm đất, phân tích hàm lượng chlorophyll, đường tổng, proline trong lá ở 21, 28, 35 và 40 ngày sau khi gieo.

- Độ ẩm đất (%): Đo bằng máy Takemura.

- Hàm lượng chlorophyll: Phân tích theo phương pháp Gross (1991) [12]. Hàm lượng chlorophyll tính theo công thức:

$$\text{Chlorophyll a} = (0,0127 \times \text{OD663}) - (0,00269 \times \text{OD645})$$

$$\text{Chlorophyll b} = (0,0229 \times \text{OD645}) - (0,00468 \times \text{OD663})$$

$$\text{Chlorophyll tổng} = (0,0202 \times \text{OD645}) + (0,00802 \times \text{OD663})$$

Trong đó: OD663, OD645 là giá trị hấp thụ đo ở bước sóng 663 và 645 nm.

- Hàm lượng đường tổng: Phân tích theo phương pháp Cagampang và Rodriguez (1980) [13].

- Hàm lượng proline: Phân tích theo phương pháp Bates, *et al.* (1973) [14].

* Đánh giá độ cuộn lá ở 40 ngày sau khi gieo theo phương pháp IRRI (1996) [15].

Phân tích thống kê:

* Số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel, phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS 21.0, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

* Phân tích phương sai theo Howell (2012) [16] cho thiết kế thừa số hai nhân tố khối hoàn toàn ngẫu nhiên. Phương sai kiểu gen (σ_g^2) và phương sai kiểu hình (σ_p^2) được tính theo công thức:

$$\sigma_g^2 = (MS_B - MS_E)/(r.a)$$

$$\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2$$

Trong đó: MS_B là trung bình bình phương kiểu gen, MS_E là trung bình bình phương sai số, r là số lần lặp lại, a là số mức độ của điều kiện tưới.

* Hệ số biến thiên kiểu gen (GCV), hệ số biến thiên kiểu hình (PCV) được tính theo công thức Burton và Devane (1953) [17]. Phân loại giá trị GCV và PCV theo Deshmukh, *et al.* (1986) [18]:

$$GCV = [(\sigma_g^2)^{1/2}/x] \times 100$$

$$PCV = [(\sigma_p^2)^{1/2}/x] \times 100$$

Trong đó: x là trung bình chung của từng đặc tính.

* Hệ số di truyền theo nghĩa rộng (h^2) tính theo Johnson, *et al.* (1995) [19]. Phân loại giá trị h^2 theo Singh (2001) [20]:

$$h^2 = \sigma_g^2 / \sigma_p^2$$

Kết quả và thảo luận

Diễn biến độ ẩm đất và khả năng chịu hạn của 4 giống/dòng lúa

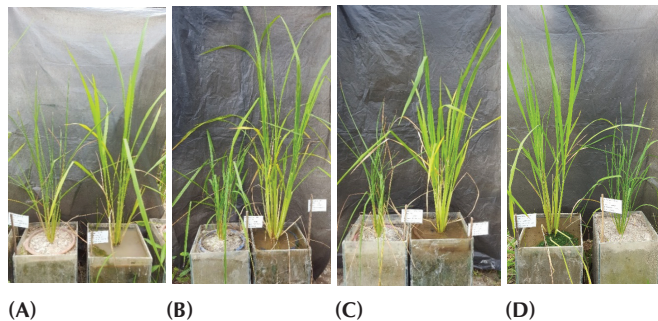
Kết quả theo dõi độ ẩm đất ở nghiệm thức hạn nhân tạo (bảng 2) cho thấy, ở 40 ngày sau khi gieo độ ẩm đất giảm xuống thấp còn 10-12,7%, với độ ẩm này cả 4 giống/dòng lúa không hút được nước trong đất, cây bị mất nước, lá bắt đầu cuộn lại. So với giống IR64 thì hai dòng CTUS4, LH01 bị hạn với độ ẩm đất thấp hơn. Độ ẩm đất có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát hạn hán, khi độ ẩm đất thấp hơn một giới hạn nào đó, thực vật không hút đủ nước thì sẽ bị hạn [1]. Bốn giống/dòng lúa đều có biểu hiện hạn với độ ẩm đất <14%, kết quả này phù hợp với kết quả thí nghiệm hạn của Trần Nguyên Tháp (2001) [21].

Bảng 2. Sự thay đổi độ ẩm đất (%) ở nghiệm thức hạn nhân tạo.

Giống/dòng	21 ngày sau gieo	28 ngày sau gieo	35 ngày sau gieo	40 ngày sau gieo
IR64	>80	>80	45	12,3
CTUS4	>80	>80	45	10,0
Nàng núa	>80	>80	40	12,7
LH01	>80	>80	45	11,0

Kết quả đánh giá độ cuộn lá cho thấy, từ 35-40 ngày sau khi gieo 4 giống/dòng lúa bị hạn ở những cấp độ khác nhau, khi giống IR64 có biểu hiện hạn sớm nhất lá cuộn chặt, thì dòng Nàng núa lá cuộn hình chữ O, dòng CTUS4 và LH01 có mức độ cuộn lá thấp nhất, lá cuộn hình chữ U.

Cuộn lá là một trong những cơ chế giúp cây thoát khỏi hạn hán [22] bằng cách điều chỉnh tiềm năng nước trong lá, cho phép cây hấp thụ nước trong đất tốt hơn trong điều kiện hạn, cuộn lá giúp làm giảm sự hấp thụ ánh sáng, thoát hơi nước và mất nước ở lá [23]. Điều này cho thấy, CTUS4 và LH01 có khả năng điều chỉnh tiềm năng nước trong lá để hấp thụ nước trong đất tốt hơn IR64 nên có mức độ cuộn lá thấp nhất, kết quả đánh giá cũng cho thấy hai dòng này có khả năng chống chịu hạn trung bình, IR64 chống chịu kém. Cuộn lá là một tiêu chí đánh giá khả năng chịu hạn [24], do đó có thể sử dụng chỉ tiêu này để sàng lọc nhanh chóng hàng trăm dòng [25].



Hình 1. Giống IR64 (A), dòng CTUS4 (B), LH01 (C) và Nàng núa (D) trong hai điều kiện khi cây có biểu hiện hạn.

Ảnh hưởng của hạn đến hàm lượng chlorophyll trong lá

Kết quả phân tích hàm lượng chlorophyll (bảng 3, 4) cho thấy ở 35-40 ngày sau khi gieo hàm lượng chlorophyll a, b và chlorophyll tổng tăng khác biệt với mức ý nghĩa thống kê 5% ở điều kiện hạn so với điều kiện đủ nước.

Khi bị hạn, có sự tích lũy cao hàm lượng chlorophyll a, b và chlorophyll tổng, hàm lượng chlorophyll a tăng từ 1,1-1,6 lần, chlorophyll b tăng từ 1,2-1,5 lần, chlorophyll tổng tăng từ 1,3-1,4 lần so với điều kiện đủ nước.

Khi lượng nước trong lá giảm vượt qua ngưỡng cho phép, khí khổng đóng lại để làm chậm quá trình thoát hơi nước, làm giảm hàm lượng CO_2 , ảnh hưởng đến quá trình quang hợp. Chlorophyll là một chỉ số thể hiện khả năng

quang hợp, liên quan trực tiếp đến quá trình tăng trưởng của cây [26]. Theo Yanqiong, *et al.* (2007) [27], hàm lượng chlorophyll dễ dàng tăng khi cây bị stress hạn. Trong điều kiện hạn nhân tạo, lá của 4 giống/dòng lúa có sự gia tăng hàm lượng chlorophyll so với điều kiện đủ nước. Theo Percival và Noviss (2008) [28], hàm lượng chlorophyll trong lá tăng cao đã tăng cường tính chịu hạn của cây, giúp cây nhanh phục hồi sau hạn. Sự gia tăng khối lượng lục lạp trong tế bào nhu mô lá giúp cây lúa hoàn thành chức năng quang hợp, duy trì sự sống, thích nghi với điều kiện khắc nghiệt của môi trường. Điều này cho thấy sắc tố quang hợp (chlorophyll a, b) trong lá được tăng cường, giúp cây thích nghi với điều kiện khô hạn.

Bảng 3. Hàm lượng chlorophyll a và b (ppm) trong lá ở hai điều kiện.

Điều kiện (A)	Giống (B)	21 NSG		28 NSG		35 NSG		40 NSG	
		Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b
Đủ nước	IR64	6,61 ^a	7,41 ^a	7,30 ^a	8,22 ^{ab}	7,21 ^d	8,65 ^b	7,24 ^c	8,72 ^{dc}
	Nàng niu	5,85 ^b	6,63 ^b	6,33 ^b	8,00 ^{ab}	5,47 ^c	7,25 ^c	6,90 ^c	7,85 ^c
	CTUS4	6,29 ^{ab}	7,50 ^a	6,01 ^b	7,73 ^b	7,95 ^c	8,26 ^b	7,99 ^d	8,99 ^d
	LH01	6,08 ^{ab}	7,37 ^a	6,55 ^b	7,67 ^b	7,29 ^d	8,78 ^b	7,23 ^c	8,34 ^{dc}
Hạn	IR64	6,49 ^a	7,78 ^a	7,36 ^a	8,76 ^a	9,54 ^a	10,05 ^a	11,39 ^a	12,55 ^a
	Nàng niu	5,79 ^b	6,57 ^b	6,21 ^b	7,98 ^{ab}	9,01 ^{ab}	10,54 ^a	10,03 ^b	11,71 ^{ab}
	CTUS4	6,21 ^{ab}	7,57 ^a	6,11 ^b	7,63 ^b	8,59 ^b	10,00 ^a	9,14 ^c	10,52 ^c
	LH01	6,05 ^{ab}	7,13 ^{ab}	6,52 ^b	7,85 ^b	9,29 ^a	10,78 ^a	10,26 ^b	11,04 ^{bc}
F _A		ns	ns	ns	ns	*	*	*	*
F _B		*	*	*	*	*	*	*	*
F _{AxB}		ns	ns	ns	ns	*	*	*	*
CV (%)		4,92	4,62	6,11	5,84	3,87	4,99	4,64	5,11

Chl a: Chlorophyll a; Chl b: Chlorophyll b; NSG: Ngày sau gieo. Trong cùng một cột, những số có chữ số theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; ns: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: Khác biệt với mức ý nghĩa 5%.

Bảng 4. Hàm lượng chlorophyll tổng (ppm) trong lá ở 2 điều kiện.

Điều kiện (A)	Giống (B)	21 NSG	28 NSG	35 NSG	40 NSG
Đủ nước	IR64	13,04 ^{ab}	14,97 ^a	15,65 ^c	15,75 ^c
	Nàng niu	11,16 ^{cd}	13,93 ^{bc}	14,24 ^d	14,77 ^c
	CTUS4	12,19 ^{abc}	13,34 ^c	15,73 ^c	15,48 ^c
	LH01	12,92 ^{ab}	13,52 ^c	15,96 ^c	15,87 ^c
Hạn	IR64	13,17 ^a	14,79 ^{ab}	20,66 ^a	22,38 ^a
	Nàng niu	11,01 ^d	13,84 ^{bc}	19,48 ^{ab}	21,16 ^a
	CTUS4	12,01 ^{bcd}	13,19 ^c	18,80 ^b	19,48 ^b
	LH01	12,76 ^{ab}	13,22 ^c	19,95 ^{ab}	21,02 ^{ab}
F _A		ns	ns	*	*
F _B		*	*	*	*
F _{AxB}		ns	ns	*	*
CV (%)		4,76	3,94	3,75	4,27

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

Ảnh hưởng của hạn đến sự tích lũy hàm lượng đường tổng trong lá

Hạn hán làm giảm hiệu quả quang hợp, lượng đường cung cấp cho các mô cũng bị ảnh hưởng. Đồng thời với việc đánh giá hàm lượng chlorophyll, hàm lượng đường tổng và proline cũng được đánh giá. Kết quả cho thấy ở 35-40 ngày sau khi gieo, hàm lượng đường tổng trong lá tăng cao khác biệt với mức ý nghĩa thống kê 5% so với điều kiện đủ nước (bảng 5).

Có sự tích lũy đường tổng trong lá khi độ ẩm đất giảm còn 40-45% và tăng cao khi cây bị hạn. Khi bị hạn, hàm lượng đường tổng trong lá tăng từ 1,2-3 lần so với điều kiện đủ nước. Nàng niu có sự tích lũy đường tổng trong lá tăng cao nhất, tiếp đến là IR64, LH01 và thấp nhất là CTUS4.

Trong điều kiện hạn, sự tích lũy các loại đường sẽ tăng lên [29], sự gia tăng hàm lượng đường là một trong những chỉ số về khả năng chịu hạn [30]. Các giống có khả năng chống chịu hạn thông qua việc tích lũy đường tổng lên gấp 2-3 lần so với điều kiện không hạn [7]. Trong thời gian bị hạn, đường hoạt động như hợp chất hòa tan điều chỉnh áp suất thẩm thấu, tiềm năng thẩm thấu tế bào được hạ xuống, thu hút nước vào tế bào, giúp duy trì sức trương tế bào, bảo vệ màng tế bào bằng cách tương tác với các phức hợp protein, enzyme và loại bỏ ROS [31], chính vì vậy hoạt động của các cơ quan và tế bào chất diễn ra với tốc độ bình thường [32]. Như vậy, trong điều kiện hạn, 4 giống/dòng lúa có sự gia tăng hàm lượng đường tổng trong lá, giúp điều hòa áp suất thẩm thấu, tăng khả năng chống chịu hạn.

Bảng 5. Hàm lượng đường tổng và proline (mg/g Weight fresh) trong lá ở 2 điều kiện.

Điều kiện (A)	Giống (B)	21 NSG		28 NSG		35 NSG		40 NSG	
		Đường tổng	Proline	Đường tổng	Proline	Đường tổng	Proline	Đường tổng	Proline
Đủ nước	IR64	74,7 ^c	0,91 ^a	75,1 ^b	0,84 ^a	113,4 ^d	0,79 ^c	120,1 ^d	0,79 ^c
	Nàng niu	102,4 ^b	0,75 ^b	78,2 ^b	0,78 ^{ab}	66,9 ^f	0,79 ^c	65,9 ^f	1,04 ^d
	CTUS4	76,2 ^c	0,93 ^a	97,9 ^a	0,80 ^{ab}	100,0 ^e	0,80 ^c	108,7 ^c	0,90 ^{dc}
	LH01	119,3 ^a	0,74 ^b	100,3 ^a	0,76 ^b	122,8 ^c	0,75 ^c	126,4 ^{cd}	0,84 ^{dc}
Hạn	IR64	75,0 ^c	0,92 ^a	75,0 ^b	0,84 ^a	144,5 ^b	2,27 ^b	184,8 ^b	7,49 ^a
	Nàng niu	101,7 ^b	0,75 ^b	78,9 ^b	0,80 ^{ab}	151,7 ^b	3,33 ^a	198,6 ^a	7,63 ^a
	CTUS4	75,4 ^c	0,92 ^a	98,5 ^a	0,80 ^{ab}	108,0 ^{dc}	0,97 ^d	133,7 ^c	1,99 ^c
	LH01	117,9 ^a	0,75 ^b	100,2 ^a	0,75 ^b	175,3 ^a	2,05 ^c	179,0 ^b	3,09 ^b
F _A		ns	ns	ns	ns	*	*	*	*
F _B		*	*	*	*	*	*	*	*
F _{AxB}		ns	ns	ns	ns	*	*	*	*
CV (%)		5,35	5,58	5,77	4,76	4,32	5,61	4,44	4,07

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

Ảnh hưởng của hạn đến sự tích lũy hàm lượng proline trong lá

Kết quả phân tích hàm lượng proline cho thấy, ở 35-40 ngày sau khi gieo hàm lượng proline trong lá tăng với mức ý nghĩa thống kê 5% so với điều kiện đủ nước (bảng 5).

Hàm lượng proline trong lá tăng cao khi cây bị hạn, tăng từ 2,2-9,5 lần so với điều kiện đủ nước. IR64 có sự tích lũy proline cao nhất, tiếp theo là Nàng núa, LH01 và CTUS4, mặc dù ở 35 ngày sau khi gieo Nàng núa có sự tích lũy proline cao nhất. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả cho rằng hàm lượng proline tăng đáng kể khi cây bị hạn [33, 34].

Proline là một trong những chỉ số về khả năng chống chịu hạn [35, 36]. Sự tích lũy proline trong điều kiện stress ở nhiều loài tương quan với khả năng chống chịu [37]. Ở thực vật, tổng hợp proline diễn ra trong bào tương và trong plastid. Tiền thân là glutamate, được chuyển thành proline bởi hai bước liên tiếp được xúc tác bởi pyrroline-5-carboxylatesynthetase (P5CS) và P5C reductase (P5CR). Sự suy giảm proline xảy ra trong ty thể do việc đảo ngược hoạt động của proline dehydrogenase (PDH) và pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDH) [38]. Các biểu hiện của gen này giúp tăng cường đáng kể hàm lượng proline nội sinh và làm tăng khả năng chịu hạn [36, 39]. Proline có vai trò đa năng trong việc bảo vệ thực vật khi gặp stress, tích trữ năng lượng điều chỉnh các quá trình oxy hóa khử tiềm ẩn, một chất loại bỏ ROS (Sharma và Dietz, 2006). Một số dẫn liệu cho thấy việc tăng cường tổng hợp proline giúp duy trì trạng thái cân bằng NADPH/NADP⁺, ổn định trạng thái oxy hóa khử, ngăn ngừa tổn thương bộ máy quang hợp [40]. Như vậy, 4 giống/dòng lúa có sự tích lũy cao hàm lượng proline trong lá để tăng khả năng chống chịu hạn.

Biến thiên kiểu gen (GCV), biến thiên kiểu hình (PCV) và hệ số di truyền (h²) của các đặc tính sinh hóa

Giá trị PCV của đường tổng và proline lần lượt là 22,5; 99,4% và giá trị GCV lần lượt là 22; 99,3% (bảng 6), theo phân loại của Deshmukh, *et al.* (1986) [18], đường tổng và proline có giá trị GCV và PCV cao (>20), trong khi chlorophyll a, b và chlorophyll tổng có GCV và PCV thấp (<10). Giá trị GCV gần bằng PCV cho thấy sự đóng góp cao của kiểu gen cho sự biểu hiện kiểu hình của đường tổng và proline.

Đường tổng, proline có h² lần lượt là 96,1 và 99,8%, kết quả cho thấy giá trị h² rất cao (>80%). Theo Singh (2001) [20], điều này cho thấy sự đóng góp cao của kiểu gen cho sự biểu hiện kiểu hình, đóng góp của môi trường đối với sự biểu hiện của các tính trạng này không đáng kể. Burton (1952) [41] cho rằng, GCV cao cùng với h² cao sẽ cho hiệu quả chọn lọc cao, điều này cho thấy đường tổng và proline

có hiệu quả chọn lọc cao, có thể được khai thác trong chương trình chọn tạo giống lúa chịu hạn.

Bảng 6. Phương sai kiểu gen (σ^2_g), phương sai kiểu hình (σ^2_p), phương sai môi trường (σ^2_e), hệ số biến thiên kiểu gen (GCV), hệ số biến thiên kiểu hình (PCV), hệ số di truyền (h²) của các đặc tính sinh hóa.

Đặc tính sinh hóa	σ^2_g	σ^2_p	σ^2_e	GCV (%)	PCV (%)	h ²
Chlorophyll a	0,46	0,62	0,16	7,7	9,0	0,737
Chlorophyll b	0,63	0,89	0,26	7,9	9,4	0,708
Chlorophyll tổng	1,42	2,03	0,61	6,5	7,8	0,702
Đường tổng	947,5	986	38,5	22	22,5	0,961
Proline	8,71	8,72	0,01	99,3	99,4	0,998

Kết luận

Đề thích ứng trong điều kiện hạn, 4 giống/dòng lúa có sự tích lũy cao hàm lượng chlorophyll, đường tổng và proline trong lá. Hàm lượng chlorophyll a tăng từ 1,1-1,6 lần, chlorophyll b tăng từ 1,2-1,5 lần, chlorophyll tổng tăng từ 1,3-1,4 lần, hàm lượng đường tổng tăng từ 1,2-3 lần, hàm lượng proline tăng từ 2,2-9,5 lần. So với IR64, hai dòng CTUS4 và LH01 có sự tích lũy hàm lượng đường tổng, proline thấp nhất.

Đường tổng và proline có giá trị GCV và h² cao, cho thấy sự đóng góp cao của kiểu gen cho sự biểu hiện của tính trạng nên có hiệu quả chọn lọc cao cho khả năng chịu hạn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lê Huy Bá, Lương Văn Liệt và Nguyễn Xuân Hoàn (2017), *Khó hạn, xâm nhập mặn ở Đồng bằng sông Cửu Long: Cơ sở lý luận và thực tiễn*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 523 trang.
- [2] T.T. Chang, B. Somrith (1979), "Genetic studies on the grain quality of rice", *Proceedings of the workshop on chemical aspects of rice grain quality*, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, pp.49-58.
- [3] A. Kamoshita, R. Rodriguez, A. Yamauchi, L.J. Wade (2004). "Genotypic variation in response of rainfed lowland rice to prolonged drought and rewetting", *Plant Production Science*, 7, pp.406-420.
- [4] Y. Uga, K. Sugimoto, S. Ogawa, J. Rane, M. Ishitani, N. Hara, H. Inoue (2013), "Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions", *Nature Genetics*, 45(9), pp.1097-1102.
- [5] A. Kumar, S. Dixit, T. Ram, R.B. Yadaw, K.K. Mishra, N.P. Mandal (2014), "Breeding high-yielding drought-tolerant rice: genetic variations and conventional and molecular approaches", *Journal of Experimental Botany*, 65(21), pp.6265-6278.
- [6] B. Courtois, G. McLaren, P.K. Sinha, K. Prasad, R. Yadav, L. Shen (2000), "Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice", *Molecular Breeding*, 6, pp.55-66.
- [7] C.M. Maisura, I. Lubis, A. Junaedinand, H. Ehara (2014), "Some physiological character responses of rice under drought conditions in a paddy

system", *J. Int. Soc. Southeast Asian Agric. Sci.*, **20**(1), pp.104-114.

[8] J.B. Passioura (2007), "The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives", *Journal of Experimental Botany*, **58**(2), pp.113-117.

[9] Đỗ Tuấn Đạt (2013), *Phá quang kỳ trên giống lúa Nàng nịu bằng phương pháp sốc nhiệt*, Luận văn tốt nghiệp đại học ngành công nghệ giống cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ.

[10] Quan Thị Ái Liên (2013), *Tạo giống lúa đột biến ngăn ngừa chịu mặn có năng suất và phẩm chất tốt*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

[11] Y. Uga (2012), *Quantitative measurement of root growth angle by using the basket method. Methodologies for root drought studies in rice*, International Rice Research Institute, pp.22-26.

[12] J. Gross (1991), *Pigment in vegetables*, Van Nostrand Reinhold, New York.

[13] G.B. Cagampang and F.M. Rodriguez (1980), *Methods of analysis for screening crops of appropriate qualities* (No. 2), Analytical Services Laboratory, Institute of Plant Breeding, University of the Philippines at Los Banos.

[14] L.S. Bates, R.P. Waldren and I.D. Teare (1973), "Rapid determination of free prolin for water-stress studies", *Plant and Soil*, **39**(1), pp.205-207.

[15] IRRI (1996), *International Network for Genetic E-valuation of Rice: standard evaluation system for rice*, Los Banos: IRRI.

[16] D.C. Howell (2012), *Statistical methods for psychology*, Cengage Learning.

[17] G.W. Burton, E.H. Devane (1953), "Estimating heritability in tall fescue (*Festuca arundinacea*) from replicated clonal material", *Agronomy Journal*, **45**(10), pp.478-481.

[18] S.N. Deshmukh, M.S. Basu and P.S. Reddy (1986), "Genetic variability, character association and path analysis of quantitative traits in Virginia bunch varieties of ground nut", *Indian Journal of Agriculture Science*, **56**, pp.816-821.

[19] H.W. Johnson, H.F. Robison and R.E. Comstock (1995), "Estimates of genetic and environmental variability in soybean", *Agron. J.*, **47**, p.314.

[20] B. Singh (2001), *Plant Breeding: Principles and Methods*, 6th ed., Kalyani Publishers, New Delhi, India.

[21] Trần Nguyên Thập (2001), *Nghiên cứu xác định một số đặc trưng của các giống lúa chịu hạn và chọn tạo giống lúa chịu hạn CH5*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp ngành chọn và nhân giống, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp, Hà Nội.

[22] M. Dingkuhn, R.T. Cruz, J.C. O'Toole, N.C. Turner, K. Doerffling (1991), "Responses of seven diverse rice cultivars to water deficits. III. Accumulation of abscisic acid and proline in relation to leaf water-potential and osmotic adjustment", *Field Crops Research*, **27**(1-2), pp.103-117.

[23] A. Kadioglu, R. Terzi (2007), "A dehydration avoidance mechanism: Leaf rolling", *Botanical Review*, **73**(4), pp.290-302.

[24] B. Singh, A. Bohra, S. Mishra, R. Joshi, S. Pandey (2015), "Embracing new-generation 'omics' tools to improve drought tolerance in cereal and food- legume crops", *Biol. Plant*, **59**, pp.413-428.

[25] R. Lafitte, A. Blum, G. Atlin (2003), "Using secondary traits to help identify drought-tolerant genotypes", *Breeding rice for drought-prone environments*, IRRI, pp.37-48.

[26] R.C. Nageswara Rao, H.S. Talwar, G.C. Wright (2001), "Rapid assessment of specific leaf area and leaf nitrogen in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using chlorophyll meter", *Journal of Agronomy and Crop Science*, **189**, pp.175-182.

[27] L. Yanqiong, L. Xingliang, Z. Shaowei, C. Hong, Y. Yongjie, M. Changlong, L. Jun (2007), "Drought-resistant physiological characteristics of four shrub species in arid valley of Minjiang River", *China Acta Ecologica Sinica*, **27**(3), pp.870-877.

[28] G.C. Percival, K. Noviss (2008), "Triazole induced drought tolerance in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*)", *Tree Physiol.*, **28**(11), pp.1685-92.

[29] Y. Kovtun, W.L. Chiu, G. Tena, J. Sheen (2000), "Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **97**, pp.2940-2945.

[30] B. Nohong (2015), "Effect of water stress on growth, yield, proline and soluble sugars contents of Signal grass and Napier grass species", *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, **9**, pp.14-21.

[31] D.E.W. Van, R. Valluru (2009), "Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging?", *J. Exp. Bot.*, **60**, pp.9-18.

[32] G.V. Subbarao, O. Ito, R. Serraj, J.J. Crouch, S. Tobita, K. Okada, C.T. Hash, R. Ortiz, W.L. Berry (2005), *Physiological perspectives on improving crop adaptation to drought-justification for a systematic component-based approach*, Handbook of Photosynthesis, New York.

[33] A.R. Abbasi, R. Sarvestani, B. Mohammadi, A. Bagheri (2014), "Drought Stress Induced Changes at Physiological and Biochemical Levels in Some Common Vetch (*Vicia sativa* L.) Genospecies", *Journal of Agricultural Science and Technology*, **16**, pp.505-516.

[34] M.S. Lum, M.M. Hanafi, Y.M. Rafii, A.S.N. Akmar (2014), "Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice", *J. Anim Plant Sci.*, **24**(5), pp.1487-1493.

[35] C.A. Jaleel, R. Gopi, B. Sankar, P. Manivannan, A. Kishorekumar, R. Sridharan, R. Panneerselvam (2007), "Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism", *South Afr. J. Bot.*, **73**, pp.190-195.

[36] A.C.G. Vendruscolo, I. Schuster, M. Pileggi, S. Scapim, H.B.C. Molinari, C.J. Marur, L.G.C. Vieira (2007), "Stress-induced synthesis of praline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat", *J. Plant Physiol.*, **164**(10), pp.1367-1376.

[37] M. Ashraf, M. Foolad (2007), "Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance", *Environmental and Experimental Botany*, **59**(2), pp.206-216.

[38] V. Kumar, V. Shriram, M.A. Hossain, P.K. Kishor (2015), "Engineering proline metabolism for enhanced plant salt stress tolerance", *Managing salt tolerance in plants: molecular and genomic perspectives*.

[39] J. Su, R. Wu (2004), "Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis", *Plant Sci.*, **166**, pp.941-948.

[40] Nguyễn Văn Mã (2015), *Sinh lý chống chịu điều kiện môi trường bất lợi của thực vật*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

[41] G.W. Burton (1952), "Quantitative inheritance in grasses", *Grassland Congr.*, **1**, pp.277-283.

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ kết hợp nấm *Trichoderma* tới bệnh chết héo *Phytophthora* spp. trên cây dâu tây

Nguyễn Duy Hạng*, Nguyễn Trọng Hoàng Phong, Lê Thị Thái Hòa,
Nguyễn Tấn Mân, Lê Hữu Tư, Lê Xuân Cường, Lê Văn Toàn

Viện Nghiên cứu hạt nhân

Ngày nhận bài 2/5/2018; ngày chuyển phản biện 4/5/2018; ngày nhận phản biện 12/6/2018; ngày chấp nhận đăng 18/6/2018

Tóm tắt:

Hiệu ứng của chitosan chiếu xạ kết hợp với nấm *Trichoderma* đối với *Phytophthora* spp. gây bệnh chết héo ở cây dâu tây đã được nghiên cứu. Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ đối với sự sinh trưởng cây dâu tây và khả năng phòng trừ bệnh *Phytophthora* spp. đã được thực nghiệm ở điều kiện nhà kính và *in vitro*. Kết quả cho thấy, *Phytophthora* spp. gây bệnh chết héo trên cây dâu tây rất nhạy cảm với chitosan chiếu xạ. Chitosan chiếu xạ có khối lượng phân tử 30 kDa với nồng độ 800 ppm đã ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. Tưới chitosan chiếu xạ vào đất trồng cây dâu tây đã được gây nhiễm *Phytophthora* spp., sau đó bổ sung thêm nấm *Trichoderma* làm giảm hoàn toàn tỷ lệ bệnh chết héo do nấm *Phytophthora* spp. gây ra và làm cho cây dâu tây sinh trưởng tốt hơn. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hiệu ứng của chitosan chiếu xạ và nấm *Trichoderma* đến khả năng sinh trưởng và phòng trừ bệnh chết héo ở cây dâu tây.

Từ khóa: Bệnh thối rễ, cây dâu tây, chitosan chiếu xạ, *Phytophthora*, *Trichoderma*.

Chỉ số phân loại: 4.1

Mở đầu

Dâu tây là loại cây ăn quả có giá trị dinh dưỡng, được trồng nhiều ở Đà Lạt với diện tích trên 117 ha. Một số loài vi nấm gây bệnh phát triển, làm cho hàng chục hecta dâu tây bị vàng lá, chết héo, đen rễ đỏ gốc, chủ yếu là do nấm *Phytophthora* spp. gây ra. Phòng trừ bệnh nấm *Phytophthora* spp. chủ yếu là vệ sinh đồng ruộng và sử dụng thuốc bảo vệ thực vật. Thuốc bảo vệ thực vật hóa học sử dụng thường xuyên sẽ làm tăng tính kháng thuốc và ảnh hưởng đến sức khỏe con người [1]. Giải pháp sinh học được xem là giải pháp thay thế để kiểm soát các bệnh lây truyền trong đất [2], trong đó, các hợp chất sinh học có nguồn gốc tự nhiên được sử dụng thay thế cho hợp chất hóa học tổng hợp, không gây độc cho người, gia súc và thân thiện với môi trường. Chitosan là hợp chất polysaccharide tự nhiên, là dẫn xuất deacetyl hoá của chitin có trong vỏ giáp xác tôm cua, có hoạt tính sinh học nhiều hứa hẹn nhất [3]. Chitosan ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh, và là một elicitor tăng cường các phản ứng tự vệ của cây trồng [4]. Ngoài ra, biện pháp sinh học còn sử dụng các vi sinh vật đối kháng các vi sinh vật gây bệnh thực vật. Nấm *Trichoderma* là nấm đối kháng, được sử dụng để kiểm soát, phòng ngừa một số loài nấm gây bệnh ở cây trồng như nấm *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Phytophthora*... [5, 6]. Sự kết hợp giữa các tác nhân sinh học làm giảm mức độ sử dụng thuốc

trừ nấm hóa học nhưng vẫn mang lại hiệu quả phòng bệnh rất cao [7]. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là xác định, đánh giá khả năng ức chế của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử thấp kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. đối với nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh đen rễ và khả năng sinh trưởng của cây dâu tây, làm cơ sở khoa học cho việc xây dựng giải pháp phòng trừ bệnh, thúc đẩy tăng trưởng cho cây dâu tây.

Nội dung nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

- Giống dâu tây: Giống dâu Mỹ đá (*Fragaria x ananassa*) sử dụng trong thực nghiệm được nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, sản xuất tại Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nông nghiệp Lâm Đồng.

- Chủng nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh đen rễ được phân lập trên cây dâu tây bị bệnh tại Đà Lạt.

- Chủng nấm *Trichoderma* spp. sử dụng trong thực nghiệm được phân lập tại vùng đất Đà Lạt và lưu trữ tại phòng thí nghiệm của Trung tâm Công nghệ bức xạ, Viện Nghiên cứu hạt nhân.

Phương pháp nghiên cứu

- Chitosan được sử dụng trong các thực nghiệm có khối

*Tác giả liên hệ: Tel: 84-63-3823222 ; Email: nguyenduyhang7@yahoo.com

The effect of irradiated chitosan combined with *Trichoderma* on the root rot pathogen *Phytophthora* spp. in strawberry

Duy Hang Nguyen*, Trong Hoanh Phong Nguyen,
Thi Thai Hoa Le, Tan Man Nguyen, Huu Tu Le,
Xuan Cuong Le, Van Toan Le

Nuclear Research Institute

Received 2 May 2018; accepted 18 June 2018

Abstract:

Antifungal effects of irradiated chitosan in combination with *Trichoderma* strain on the root rot disease *Phytophthora* spp. in strawberry were investigated. The effect of irradiated chitosan on the growth and the root rot control of *Phytophthora* spp. in strawberry was evaluated *in vitro* and under greenhouse conditions. The results showed that irradiated chitosan with the molecular weight of 30 kDa strongly inhibited the mycelial growth of *Phytophthora* spp. The soil treatment by irradiated chitosan in combination with *Trichoderma* spp. strain completely reduced the root rot disease and promoted the growth of strawberry. The aim of this study was to evaluate the effect of irradiated low-weight chitosan in combination with *Trichoderma* spp. strain on the growth promotion and control of the root rot disease in strawberry.

Keywords: Irradiated chitosan, *Phytophthora*, root rot, strawberry, *Trichoderma*.

Classification number: 4.1

lượng phân tử 100 kDa, 30 kDa và chitosan oligomer (C_T). Chitosan 30 kDa được điều chế từ chitosan 100 kDa trong dung dịch H_2O_2 3% theo tỷ lệ 1:3 (w/v), và chiếu tia gamma với liều xạ 10 kGy. Chitosan oligomer (C_T) được điều chế từ dung dịch 10% chitosan 30 kDa (hòa tan trong dung dịch acid acetic 3%), chiếu tia gamma với liều xạ 20 kGy. Khối lượng phân tử của chitosan được xác định bằng phương pháp sắc ký gel (GPC) trên máy LC-20AB Shimadzu, Nhật Bản. Chất chuẩn là Pullulan có khối lượng phân tử từ 738 đến 380000 Da.

- Xác định khả năng kháng nấm *Phytophthora* spp. của chitosan chiếu xạ có khối lượng phân tử (Mw) khác nhau

trong điều kiện *in vitro*: Nấm *Phytophthora* spp. (một mẫu thạch PDA có chứa hệ sợi nấm, kích thước 1 mm²) được nuôi cấy trên môi trường PDA (glucose, dịch chiết khoai tây, thạch Agar) có bổ sung chitosan Mw khác nhau với các hàm lượng: 0, 50, 100, 300, 500, 800, 1000, 1500 và 2000 ppm. Khả năng kháng nấm *Phytophthora* spp. của chitosan được đánh giá bằng phương pháp đo kích thước của hệ sợi nấm sinh trưởng theo thời gian khác nhau ở nhiệt độ 25°C.

- Khảo sát ảnh hưởng chitosan chiếu xạ kết hợp với nấm đối kháng *Trichoderma* spp. đối với sự sinh trưởng, tỷ lệ bệnh của cây dâu tây trồng trên đất đã gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp. trong điều kiện nhà kính. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần:

+ Nghiệm thức 1 (đối chứng): Cây dâu tây con 45 ngày tuổi được trồng trong chậu nhựa (Ø18 cm) với 1 kg đất được gây nhiễm 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. (tính theo khối lượng đất). Sinh khối hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. được nhân nuôi trên môi trường cám trấu sau 25 ngày ở nhiệt độ 25°C; sinh khối hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. được sử dụng gây nhiễm trực tiếp vào đất trồng dâu tây.

+ Nghiệm thức 2 (xử lý nấm *Trichoderma* spp.): Cây dâu tây trồng trong chậu nhựa với đất đã nhiễm 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. xử lý nấm *Trichoderma* spp. với số lượng bào tử là 10^8 bào tử/g đất.

+ Nghiệm thức 3 (xử lý chitosan): Cây dâu tây trồng trong chậu nhựa với đất đã nhiễm 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. xử lý dung dịch chitosan với hàm lượng phù hợp (mg/kg đất).

+ Nghiệm thức 4 (xử lý chitosan + nấm *Trichoderma* spp.): Cây dâu tây trồng trong chậu nhựa với đất đã nhiễm 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. xử lý dung dịch chitosan với hàm lượng phù hợp (mg/kg đất) và nấm *Trichoderma* spp. với số lượng bào tử là 10^8 bào tử/g đất.

Các chỉ tiêu về khối lượng tươi, khối lượng khô của rễ, thân và lá cây dâu tây, tỷ lệ bệnh, tỷ lệ ức chế được ghi nhận ở mỗi nghiệm thức.

Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm Excel 2013 để phân tích và tổng hợp các số liệu thu thập được từ các thí nghiệm. Dùng phần mềm SPSS 16.0 để phân tích thống kê các số liệu.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử khác nhau đến khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* spp.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, chitosan có khả năng ức chế sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. so với đối chứng không có chitosan. Nồng độ của chitosan càng tăng

cao thì khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm càng giảm.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử khác nhau đến khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh hại cây dâu tây.

Chitosan	Nồng độ (ppm)	Đường kính tần nấm <i>Phytophthora</i> spp. theo thời gian nuôi cấy (mm)			
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	144 giờ
C ₁₀₀	0	2,33±0,33 ^a	7,67±0,33 ^a	12,33±0,33 ^a	19,13±0,47 ^a
	50	2,33±0,33 ^a	6,33±0,33 ^b	12,03±0,32 ^a	18,33±0,33 ^a
	100	2,03±0,58 ^a	5,10±0,58 ^{bc}	10,17±0,49 ^b	16,37±0,32 ^b
	300	2,03±0,58 ^a	4,67±0,33 ^c	9,43±0,28 ^b	15,67±0,33 ^b
	500	1,33±0,33 ^a	3,33±0,33 ^d	7,33±0,33 ^c	14,13±0,49 ^c
	800	(-)	(-)	(-)	(-)
C ₃₀	50	2,33±0,33 ^a	5,47±0,32 ^b	10,67±0,35 ^b	16,67±0,33 ^b
	100	2,03±0,58 ^a	4,03±0,55 ^{bc}	9,33±0,27 ^c	13,10±0,49 ^c
	300	1,33±0,33 ^{ab}	3,10±0,58 ^c	8,67±0,58 ^c	12,33±0,33 ^c
	500	1,00±0,00 ^b	1,00±0,00 ^d	6,67±0,33 ^d	9,80±0,20 ^d
	800	(-)	(-)	(-)	(-)
	1500	(-)	(-)	(-)	(-)
C _T	50	2,33±0,33 ^a	6,33±0,33 ^b	12,10±0,49 ^a	18,67±0,33 ^a
	100	2,03±0,58 ^{ab}	6,07±0,55 ^b	12,03±0,55 ^a	16,10±0,49 ^b
	300	2,03±0,58 ^{ab}	5,33±0,33 ^b	10,33±0,33 ^b	15,67±0,33 ^b
	500	1,33±0,33 ^{ab}	5,10±0,55 ^b	10,07±0,52 ^b	14,07±0,52 ^c
	800	1,00±0,00 ^b	3,10±0,58 ^c	9,10±0,52 ^b	12,17±0,46 ^d
	1000	1,00±0,00 ^b	2,13±0,49 ^{cd}	7,33±0,33 ^c	11,67±0,33 ^d
	1500	1,00±0,00 ^b	1,73±0,27 ^d	6,03±0,12 ^d	8,20±0,41 ^e
	2000	1,00±0,00 ^b	1,67±0,33 ^d	4,10±0,18 ^e	7,33±0,33 ^e

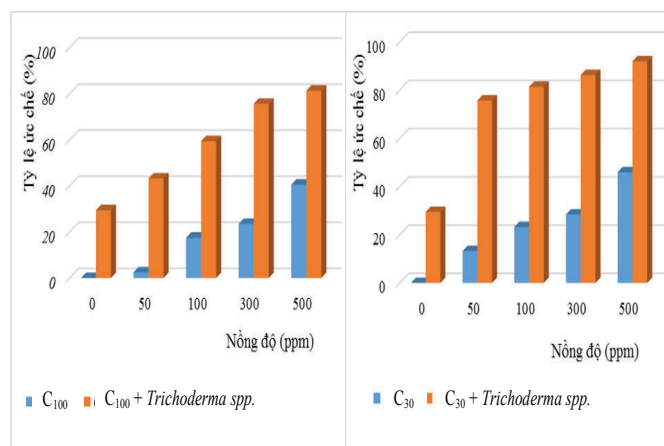
Ghi chú: (-) hệ sợi nấm không sinh trưởng. Trong cùng một cột, các giá trị có các chữ cái a,b,c,d,e theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$).

Trong ba loại chitosan được thử nghiệm thì chitosan 30 kDa (C₃₀) cho kết quả ức chế tốt hơn so với chitosan 100 kDa (C₁₀₀) và chitosan oligomer (C_T). Tỷ lệ ức chế hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. sau 144 giờ của C₃₀ ở nồng độ 500 ppm đối với *Phytophthora* đạt 48,77%, cao hơn hẳn so với C₁₀₀ và C_T là 26%; còn ở nồng độ 800 ppm của C₁₀₀ và C₃₀ đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của hệ sợi nấm *Phytophthora*. Sự ức chế phát triển hệ sợi nấm của C_T kém hơn so với C₁₀₀ và C₃₀, bằng chứng là sợi nấm vẫn phát triển tại mức nồng độ 2000 ppm tuy có giảm nhưng chưa ức chế được hoàn toàn.

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử khác nhau kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. đối với sự sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* spp.

Tỷ lệ ức chế của chitosan kết hợp với nấm *Trichoderma* đối với sự sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* được thể

hiện rất rõ trong biểu đồ 1 và biểu đồ 2. Khi sử dụng C₁₀₀ và C₃₀ ở nồng độ 500 ppm kết hợp với nấm *Trichoderma* thì tỷ lệ ức chế sinh trưởng đạt gấp 2 lần so với các nghiệm thức chỉ sử dụng chitosan đơn lẻ. Tỷ lệ ức chế của C₃₀ kết hợp với nấm *Trichoderma* cao hơn hoạt lực của C₁₀₀ kết hợp với nấm *Trichoderma*. Ở nồng độ từ 100 đến 500 ppm của chitosan C₃₀ kết hợp với nấm *Trichoderma* ức chế hơn 80% sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Phytophthora* gây bệnh hại cây dâu tây.



Biểu đồ 1. Tỷ lệ ức chế của C₁₀₀ kết hợp *Trichoderma* spp. đối với sự sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* spp.

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. đối với tỷ lệ bệnh do nấm *Phytophthora* spp. được gây nhiễm nhân tạo và khả năng sinh trưởng của cây dâu tây trồng trong điều kiện nhà kính

Sau khi bổ sung sinh khối nấm *Phytophthora* spp. vào đất trồng dâu tây thì tỷ lệ bệnh trên cây dâu tây trong các nghiệm thức là 100%, đồng thời xuất hiện những triệu chứng bệnh điển hình do nấm *Phytophthora* gây ra được trình bày ở bảng 2. Khi sử dụng nấm *Trichoderma* để xử lý nấm *Phytophthora* thì *Trichoderma* vẫn có tác dụng ức chế hoạt động của nấm *Phytophthora* nhưng cho hiệu quả không cao. Tỷ lệ bệnh giảm rõ rệt khi xử lý nấm *Phytophthora* bằng C₃₀ (300 mg/kg đất) hoặc C₃₀ (300 mg/kg đất) kết hợp với nấm *Trichoderma*. Trong 30 ngày thử nghiệm, nghiệm thức sử dụng C₃₀ đơn lẻ để xử lý nấm *Phytophthora* thể hiện khả năng kháng nấm tốt, cây phát triển bình thường, nhưng sau đó thì hiệu lực kháng nấm bắt đầu giảm. Trong khi đó, cây dâu được gây nhiễm nấm *Phytophthora* sau khi xử lý bằng C₃₀ kết hợp với nấm *Trichoderma* thì hoàn toàn không bị bệnh sau 30 ngày xử lý.

Bảng 2. Tỷ lệ bệnh của cây dâu được gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp. sau 30 ngày xử lý và tỷ lệ ức chế bệnh của chitosan khối lượng phân tử 30 kDa kết hợp nấm *Trichoderma* spp.

Nghiem thức	Triệu chứng bệnh	Tỷ lệ bệnh sau 30 ngày xử lý (%)	Tỷ lệ ức chế bệnh (%)
Đối chứng <i>Phytophthora</i> spp.	Cây bị đốm gốc, héo, lá quăn, số lá giảm, thối gốc	100	0
<i>Phytophthora</i> spp. + <i>Trichoderma</i> spp.	Cây bị đốm gốc, héo, lá quăn, số lá giảm	67	33
<i>Phytophthora</i> spp. + C ₃₀	Cây bị đốm gốc, héo, lá quăn	28	72
<i>Phytophthora</i> spp. + C ₃₀ + <i>Trichoderma</i> spp.	Cây phát triển bình thường	0	100

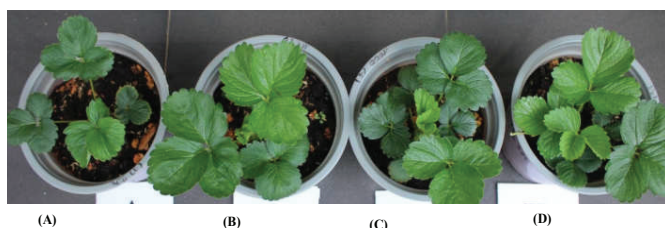
Bảng 3. Ảnh hưởng của chitosan khối lượng phân tử 30 kDa kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. đến khối lượng tươi và khối lượng khô của cây dâu được gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp.

Nghiem thức	Khối lượng tươi (g/cây)		Khối lượng khô (g/cây)	
	Rễ	Thân + Lá	Rễ	Thân + Lá
Đối chứng <i>Phytophthora</i> spp.	2,09 ^d	3,24 ^d	0,28 ^d	0,81 ^d
<i>Phytophthora</i> spp. + <i>Trichoderma</i> spp.	3,96 ^c	3,78 ^c	0,48 ^c	0,93 ^c
<i>Phytophthora</i> spp. + C ₃₀	5,74 ^b	6,38 ^b	0,66 ^b	1,49 ^b
<i>Phytophthora</i> spp. + C ₃₀ + <i>Trichoderma</i> spp.	6,80 ^a	7,19 ^a	1,08 ^a	2,37 ^a

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị có các chữ cái a, b, c, d theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, khối lượng tươi và khối lượng khô của rễ, thân và lá của cây dâu tây được gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp. khi xử lý bằng C₃₀ kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. cho kết quả là tốt nhất so với các nghiệm thức khác.

Dựa vào kết quả thực nghiệm sử dụng C₃₀ và C₃₀ kết hợp với *Trichoderma* spp. để xử lý nấm *Phytophthora* spp., chúng tôi nhận thấy việc bổ sung thêm nấm *Trichoderma* có



Hình 1. Ảnh hưởng của chitosan 30 kDa phối hợp với nấm *Trichoderma* đối với sự sinh trưởng của cây dâu tây được gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp. (A) Đối chứng (1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp.); (B) 0,1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. + 300 ppm C₃₀; (C) 0,5% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. + 300 ppm C₃₀; (D) 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. + 300 ppm C₃₀.

ảnh hưởng tích cực đến khả năng kháng nấm *Phytophthora* của C₃₀ và làm cho cây dâu tăng trưởng mạnh hơn (hình 1).

Kết luận

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử thấp phối hợp với nấm đối kháng *Trichoderma* đến sự sinh trưởng của cây dâu tây và khả năng phòng trừ bệnh nấm *Phytophthora* spp. đã được thực nghiệm ở điều kiện *in vitro* và trong điều kiện nhà kính. Nấm *Phytophthora* spp. rất nhạy cảm với chitosan chiếu xạ có khối lượng phân tử thấp. Chitosan có khối lượng phân tử 30 kDa được điều chế từ chitosan 100 kDa bằng phương pháp chiếu xạ ức chế mạnh sự phát triển hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. Khi phối hợp chitosan 30 kDa với nấm *Trichoderma* đã ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* trong điều kiện *in vitro*. Sự phối hợp giữa chitosan 30 kDa với nấm đối kháng *Trichoderma* để xử lý bệnh *Phytophthora* đã tác động trực tiếp đến sự sinh trưởng của cây dâu tây, khối lượng thân lá cao gấp 2,2 lần và khối lượng tươi rễ cao gấp 3,2 lần so với cây dâu tây không xử lý. Đất trồng cây dâu tây đã được gây nhiễm *Phytophthora* spp. sau đó tưới chitosan 30 kDa và bổ sung thêm nấm *Trichoderma* làm giảm tỷ lệ bệnh chết héo do nấm *Phytophthora* spp. gây ra và làm cho cây dâu tây sinh trưởng tốt hơn. Sự kết hợp giữa các tác nhân đối kháng sinh học và hợp chất polymer sinh học là một giải pháp an toàn, giúp kiểm soát hiệu quả bệnh *Phytophthora* spp. gây hại cây dâu tây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.K. Jones (1985), "Fungicides for bedding plants", *Bedding plants Inc.*, **16**(2), pp.3-4.
- [2] I.H. El-Abbasi, A.A. El-Wakil, M.M. Satour (2003), "Studies on the bioagent *Trichoderma* in Egypt: 1. In vitro determination of antagonistic potential of *Trichoderma harzianum* against some plant pathogenic fungi", *Egyptian Journal of Phytopathology*, **31**, pp.59-74.
- [3] L. Hadwiger, C. Chiang, S. Victory, D. Horovitz (1988), *The molecular biology of chitosan in plant-pathogen interactions and its application to agriculture*, Elsevier Applied Science, Amsterdam.
- [4] R. Muzzarelli and G.W. Goody (1986), *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York.
- [5] E. Monte (2001), "Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology", *International Microbiology*, **4**(1), pp.1-4.
- [6] N. Benhamou, P.J. Lafontaine, M. Nicole (1994), "Induction of systemic resistance of *Fusarium crown and root rot* in tomato plants by seed treatment with chitosan", *Phytopathology*, **84**, pp.1432-1444.
- [7] E.C. Tjamos, G.C. Papavizas, R.J. Cook (1992), *Biological control of plant diseases - Progress and challenges for the future*, Plenum Press, New York.

Đánh giá khả năng cung cấp lân của đất áp dụng phương pháp khuếch tán qua màng trên một số vùng đất canh tác lúa tại ĐBSCL

Vũ Văn Long^{1*}, Nguyễn Hoàng Kim Nương², Châu Minh Khôi²

¹Khoa Tài nguyên - Môi trường, Trường Đại học Kiên Giang

²Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 2/5/2018; ngày chuyển phản biện 4/5/2018; ngày nhận phản biện 29/5/2018; ngày chấp nhận đăng 11/6/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng cung cấp lân của đất đối với hấp thu lân của cây trồng áp dụng phương pháp khuếch tán qua màng (DGT - Diffusive Gradient in Thin Films), đánh giá tương quan giữa hàm lượng P hấp thụ phân tích bằng phương pháp DGT với P hữu dụng trong đất và P hòa tan trong dung dịch đất tại Bạc Liêu và Cần Thơ. Mẫu đất được thu thập trên các ruộng áp dụng bốn các liều lượng P khác nhau, bao gồm: Không bón lân, bón 40 kg P_2O_5 /ha và bón 60 kg P_2O_5 /ha. Công cụ DGT có cấu tạo gồm ba lớp gel được đặt trực tiếp lên bề mặt của đất trong vòng 24h để hấp thu P phóng thích ra từ trong dung dịch đất. Kết quả thí nghiệm cho thấy, nghiệm thức không bón lân và bón 40 kg P_2O_5 /ha có tốc độ cung cấp P nhanh hơn nghiệm thức bón 60 kg P_2O_5 /ha trên cả hai loại đất tại Bạc Liêu và Cần Thơ. Tuy nhiên, không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa tốc độ cung cấp P của đất ở các nghiệm thức không bón lân và bón 40 kg P_2O_5 /ha so với nghiệm thức bón theo liều lượng của nông dân ($P>0,05$). Kết quả cũng cho thấy có sự tương quan chặt giữa hàm lượng P phân tích bằng phương pháp DGT với hàm lượng P hữu dụng trong đất bằng phương pháp Olsen ($r>0,73$) và P hòa tan trong dung dịch đất ($r>0,95$). Phương pháp DGT có thể thay thế các phương pháp truyền thống như Olsen và Malachite Green để phân tích hàm lượng P hữu dụng trong đất. Áp dụng phương pháp DGT có thể đánh giá chính xác lượng P phóng thích từ dung dịch đất cho cây trồng hấp thu, qua đó tăng hiệu quả sử dụng phân P trong canh tác lúa.

Từ khóa: Khuếch tán qua màng, lân hòa tan, lân hữu dụng, tốc độ cung cấp lân.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Lân (P) là nguyên tố dinh dưỡng đa lượng cần thiết cho sự phát triển của cây trồng. Sự phát triển của cây trồng sẽ bị hạn chế nếu lượng P hữu dụng trong đất không đủ cung cấp cho cây trồng [1-4]. Hiện nay, có nhiều phương pháp xác định P hữu dụng trong đất như: Bray [5], Mehlich [6], Olsen [7]... Lân hữu dụng trích bằng các phương pháp này bao gồm các thành phần P hòa tan và P liên kết yếu với các dạng keo đất, do đó lượng P này thường cao hơn lượng P cây trồng thực sự hấp thu. Dựa vào hàm lượng P hữu dụng phân tích bằng các phương pháp này có thể không đánh giá chính xác khả năng và tốc độ cung cấp P từ đất. Các nghiên cứu trước đây ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) chủ yếu tập trung vào đánh giá ảnh hưởng của lượng phân P và hàm lượng P hữu dụng trong đất đối với sự sinh trưởng của cây trồng mà không quan tâm đến khả năng và tốc độ cung cấp P của đất đối với cây trồng [8-9].

Hiện nay, phương pháp khuếch tán qua màng (DGT - Diffusive Gradient in Thin Films) đã được nghiên cứu và áp dụng để đánh giá hàm lượng và tốc độ cung cấp P trong đất và trong nước [10-18]. Nguyên lý của phương pháp DGT tương tự phương pháp sử dụng resin trao đổi anion (AEM - Anion Exchange Membrane), DGT mô phỏng tiến trình lý - hóa học của sự hấp thu liên tục P từ đất của cây trồng và sự tái cung cấp P vào dung dịch đất từ các pha rắn [19]. Do đó, phương pháp DGT có thể đánh giá chính xác khả năng và tốc độ cung cấp P của đất.

Nghiên cứu được thực hiện để đánh giá khả năng cung cấp P của đất dưới các mức độ bón phân P với các liều lượng 0, 40 và 60 kg P_2O_5 /ha tại Bạc Liêu và Cần Thơ trên cơ sở áp dụng phương pháp DGT. Dựa vào sự khác biệt về tốc độ cung cấp P của đất có thể đánh giá được khả năng cung cấp P và liều lượng phân P cần thiết trong canh tác lúa tại ĐBSCL.

*Tác giả liên hệ: Email: vulong@vnkgu.edu.vn

Assessment of soil phosphorus supplying capacity in some rice paddy fields in the Mekong River Delta of Vietnam using deffusive gradient in thin films technique

Van Long Vu^{1*}, Hoang Kim Nuong Nguyen²,
Minh Khoi Chau²

¹College of Environment and Natural Resources,
Kien Giang University

²Department of Soil Science, College of Agriculture and Applied
Biology, Can Tho University

Received 2 May 2018; accepted 11 June 2018

Abstract:

The study aimed to evaluate the soil P-supply capacity for the crop uptake using the Deffusive gradient in thin films (DGT) technique and the P absorption interaction between two groups: soil available P and dissolving P in Bac Lieu and Can Tho provinces using the DGT method. Soil samples were collected in the experimental fields where were applied with different P fertilizer rates: no P fertilizer, 40 kg P_2O_5 /ha, and 60 kg P_2O_5 /ha. The DGT tool which was designed with three gel layers was directly put onto the soil surface within 24 hours. The results showed that the soil P availability rate in no P fertilizer and 40 kg P_2O_5 /ha treatments were higher than that in 60 kg P_2O_5 /ha treatment in both Bac Lieu and Can Tho provinces. However, there were no significant differences in the soil P availability rate in the treatments applied with 0 and 40 kg P_2O_5 /ha compared with the 60 kg P_2O_5 /ha treatment ($P>0.05$). The P which was analysed by DGT (P_{DGT}) has a close interaction with Olsen-P ($r>0.73$) and dissolving P in soil solution ($r>0.95$). The DGT technique could substitute for the Olsen and Malachite Green methods to determine the soil available P. Applying the DGT technique can evaluate exactly the P released from soil solution, thereby increasing the P use efficiency in the rice cultivation.

Keywords: Available P, deffusive gradient in thin films, dissolving P, soil P-supply rate.

Classification number: 4.1

Phương pháp nghiên cứu

Mô tả thí nghiệm đồng ruộng áp dụng bón giảm phân lân

Thí nghiệm được thực hiện trên hai vùng đất canh tác lúa ba vụ ở ĐBSCL gồm: Đất phù sa phát triển bị nhiễm mặn tại huyện Hòa Bình, tỉnh Bạc Liêu và đất phù sa đang phát triển tại quận Ô Môn, TP Cần Thơ. Thí nghiệm được bố trí khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 3 nghiệm thức và 3 lần lặp lại, bao gồm: Không bón P (P_0), bón 40 kg P_2O_5 /ha (P_{40}) và bón 60 kg P_2O_5 /ha tương ứng với liều lượng bón của nông dân (P_{60}).

Đất thí nghiệm tại Bạc Liêu có tên phân loại Eutric Gleysols [20]. Ở độ sâu tầng canh tác (0-20 cm), đất tại Bạc Liêu có sa cấu sét pha thịt với hàm lượng sét 55,0%, pH đất đạt 5,00 và độ dẫn điện của đất ($EC_{1:2,5}$) đạt 1,22 mS/cm (bảng 1). Hàm lượng chất hữu cơ trong đất Bạc Liêu đạt 4,70% và được đánh giá trung bình theo thang đánh giá của Metson [21]. Đất thí nghiệm tại Cần Thơ được phân loại Dystric Gleysols [20]. Đất tại Cần Thơ có sa cấu sét với hàm lượng sét 61,5%, pH 4,60 và $EC_{1:2,5}$ đạt 0,49 mS/cm. Hàm lượng chất hữu cơ trong đất Cần Thơ đạt 4,82% và được đánh giá trung bình theo thang đánh giá của Metson [21].

Bảng 1. Đặc tính đất tại Bạc Liêu và Cần Thơ ở độ sâu 0-20 cm trước khi tiến hành thí nghiệm vào vụ đông xuân 2011-2012.

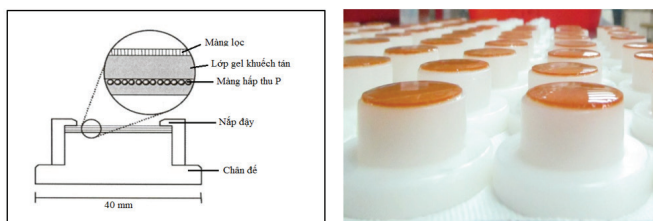
Đặc tính	Đơn vị	Bạc Liêu	Cần Thơ
Cát	%	0,80	0,20
Thịt	%	44,2	38,3
Sét	%	55,0	61,5
pH đất		5,00	4,60
$EC_{(1:2,5)}$ đất	mS/cm	1,22	0,46
Chất hữu cơ trong đất	%	4,70	4,82

Phương pháp thu thập mẫu đất

Mẫu đất sử dụng để đánh giá tốc độ cung cấp P của đất được thu thập vào giai đoạn thu hoạch vụ đông xuân 2013-2014 sau khi đã thực hiện bón giảm phân P trong 7 vụ. Mẫu đất cuối vụ cũng được sử dụng để đánh giá tương quan giữa nồng độ P hấp thu trên gel FeOOH với P hữu dụng trong đất. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng tiến hành đánh giá sự tương quan giữa hàm lượng P hấp thu trên gel FeOOH và P hòa tan trong dung dịch đất (chỉ thực hiện trên đất Bạc Liêu). Mẫu đất được thu ở độ sâu 0-20 cm trong mỗi ô thí nghiệm và được bảo quản trong thùng cách nhiệt ở nhiệt độ 4°C, sau đó được đưa về phòng thí nghiệm. Mẫu đất được phơi khô tự nhiên, sau đó được nghiền và qua rây 2 mm để tiến hành nghiên cứu.

Phương pháp đánh giá tốc độ cung cấp P của đất bằng phương pháp DGT

Cấu tạo DGT: Cấu tạo của DGT gồm 3 phần chính: (1) Chân đế, (2) Nắp đáy mở có đường kính 2,5 cm, (3) Màng lọc, màng khuếch tán và màng hấp phụ P (hình 1). Màng lọc có cấu tạo là nitrocellulose với độ dày 0,45 μm . Màng khuếch tán P và màng hấp thu P được cấu tạo bằng gel, trong đó màng hấp thu P có thành phần là Ferrihydrite (FeOOH). Cả 3 màng đều có diện tích 2,54 cm^2 , độ dày 0,063 cm và được cố định bằng nắp đáy có khoảng trống tiếp xúc với bề mặt đất.



Hình 1. Cấu tạo của DGT (bên trái) và DGT sau khi đặt lớp gel hấp thu P (màu vàng nâu) trên chân đế (bên phải).

Phương pháp thực hiện: Cân 20 g đất, thêm nước khử khoáng đến khi đất bão hòa nước và để trong 24 giờ nhằm tạo cân bằng P giữa pha rắn của đất và dung dịch đất. Sau đó, đặt DGT tiếp xúc với bề mặt đất thông qua màng lọc và ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 24 giờ, lấy DGT ra khỏi đất và phân tích lượng P hấp phụ và tích lũy trên gel FeOOH . Gel FeOOH được hòa tan trong 1 ml HCl 1M trong 24 giờ để phóng thích lượng P đã hấp phụ. Dung dịch hòa tan FeOOH sau đó được đem phân tích P bằng phương pháp so màu Malachite Green [22]. Để đánh giá khả năng cung cấp P của đất và lượng P được cây trồng hấp thu từ đất, nghiên cứu tiến hành đánh giá tốc độ cung cấp P của đất và lượng P hấp phụ trên gel FeOOH :

$$F (\text{mg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})) = P_{\text{mass}} / (A \cdot t)$$

$$C_{\text{dgt}} = (P_{\text{mass}} \cdot \Delta g) / (D \cdot A \cdot t) \cdot 1000$$

Trong đó: F là tốc độ khuếch tán P của đất, tương ứng tốc độ cung cấp P của đất [$\text{mg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$]; P_{mass} là lượng P hấp phụ trên lớp gel, tương ứng lượng P được rễ cây hấp thu (mg); A là diện tích của lớp gel (2,54 cm^2); t là thời gian cài đặt DGT = 86400 (s); C_{dgt} là nồng độ P hấp phụ trên lớp gel (mg/l); Δg là độ dày của lớp gel (0,063 cm); D là hệ số khuếch tán P từ dung dịch vào gel (cm^2/s); 1000 là hệ số đổi ra lít.

Phương pháp phân tích các chỉ tiêu hóa học khác

$\text{EC}_{1:2,5}$ đất (mS/cm) và pH đất được trích theo tỷ lệ đất:nước là 1:2,5, sau đó được đo bằng EC kế và pH kế. Chất hữu cơ trong đất (%) được xác định bằng phương pháp tro ướt hóa, carbon hữu cơ được oxy hóa bằng hỗn hợp $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{SO}_4$ và chuẩn độ lượng $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ thừa

bằng dung dịch FeSO_4 [23]. Lân hữu dụng trong đất được phân tích theo phương pháp Olsen, sử dụng dung dịch trích NaHCO_3 theo tỷ lệ 1:20 ở pH 8,5, sau đó so màu ở bước sóng 880 nm [7]. Lân hòa tan trong dung dịch đất được trích theo tỷ lệ đất:nước là 1:2,5, sau đó phân tích bằng phương pháp Malachite Green, so màu ở bước sóng 630 nm [22]. Thành phần cơ giới của đất được xác định bằng phương pháp hút pipette bằng ống hút Robinson [24].

Xử lý và đánh giá số liệu

Phần mềm Microsoft Excel được sử dụng để nhập, phân tích và vẽ đồ thị tương quan giữa các nồng độ P hấp thu trên gel với P hữu dụng và P hòa tan trong dung dịch đất dưới các liều lượng bón phân P khác nhau. Sử dụng phần mềm Minitab 16 để phân tích phương sai kết hợp kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5% nhằm đánh giá sự khác biệt ý nghĩa về tốc độ cung cấp P của đất và lượng P được rễ cây trồng hấp thu giữa các nghiệm thức không bón P, bón 40 kg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ha}$ và bón 60 kg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ha}$.

Kết quả và thảo luận

Lượng P được rễ cây trồng hấp thu và tốc độ cung cấp P của đất

Trên đất thí nghiệm tại Bạc Liêu, lượng P được rễ cây trồng hấp thu (tương ứng với lượng P hấp phụ trên gel FeOOH) dao động từ 0,164-0,170 μg (bảng 2). Kết quả thí nghiệm cho thấy, lượng P được rễ cây trồng hấp thu tại các nghiệm thức không bón P và bón 40 kg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ha}$ khác biệt không ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức bón 60 kg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ha}$. Tuy nhiên, nghiên cứu đã chỉ ra rằng, bón giảm lượng phân P trong canh tác có thể giúp rễ cây trồng hấp thu được nhiều P hơn so với bón phân P theo liều lượng của nông dân.

Sau mỗi 1 giây, tốc độ cung cấp P của đất (tương ứng với tốc độ P khuếch tán vào lớp gel FeOOH) đạt $7,49 \cdot 10^{-7}$ - $7,73 \cdot 10^{-7}$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$ trên đất thí nghiệm tại Bạc Liêu. Kết quả phân tích cho thấy, tốc độ cung cấp P ở các nghiệm thức không bón P hoặc bón 40 kg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ha}$ khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức bón theo liều lượng của nông dân. Tuy nhiên, bón giảm phân P giúp tăng tốc độ cung cấp P từ đất cho cây trồng so với duy trì bón phân P với liều lượng 60 kg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ha}$ trong thời gian dài. Nồng độ P hấp phụ trên gel ở 3 nghiệm thức dao động từ 4,30-6,26 μg P/l và khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa ba nghiệm thức bón phân P. Tuy vậy, kết quả đã chỉ ra rằng, không bón P hoặc bón 40 kg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ha}$ có thể giúp gia tăng khả năng cung cấp P của đất cho cây trồng so với duy trì lượng phân P cao trong canh tác lúa (60 kg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ha}$).

Trên đất Cần Thơ, kết quả ghi nhận lượng P được rễ cây trồng hấp thu dao động từ 0,162-0,198 μg và tốc độ cung cấp P của đất ở ba nghiệm thức dao động từ $7,38 \cdot 10^{-7}$ - $9,04 \cdot 10^{-7}$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$ trong thời gian 1 giây (bảng 2). Nhìn chung, lượng P được rễ cây trồng hấp thu và tốc độ

cung cấp P của đất ở các nghiệm thức không bón P hoặc bón 40 kg P_2O_5 /ha khác biệt không có ý nghĩa so với bón 60 kg P_2O_5 /ha. Tuy nhiên, bón giảm phân P trong canh tác lúa tại Cần Thơ giúp tăng tốc độ cung cấp P của đất cho cây trồng và giúp rễ cây trồng hấp thu P được nhiều hơn so với bón phân P ở mức 60 kg P_2O_5 /ha. Nồng độ P hấp phụ trên gel ở 3 nghiệm thức dao động từ 2,86-4,52 μg P/l và khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức không bón P hoặc bón 40 kg P_2O_5 /ha so với nghiệm thức bón 60 kg P_2O_5 /ha. Tương tự kết quả tại Bạc Liêu, bón giảm phân P trong canh tác lúa tại Cần Thơ có thể giúp gia tăng khả năng cung cấp P của đất cho cây trồng so với bón theo liều lượng của nông dân.

Kết quả của nghiên cứu này gần giống với nghiên cứu của Six và cộng sự (2013) sử dụng phương pháp DGT để đánh giá khả năng đáp ứng đối với phân P của cây lúa cũng cho thấy tốc độ cung cấp P của đất đạt $5,1 \cdot 10^{-7} \mu g/cm^2/s$ [25]. Theo Merckx và cộng sự, tốc độ cung cấp P của đất phụ thuộc vào khả năng đệm P của đất [26]. Điều này cho thấy rằng, khả năng đệm P của đất canh tác lúa tại Bạc Liêu và Cần Thơ có thể được đánh giá tương tự nhau do hai loại đất thí nghiệm có các tính chất đất gần giống nhau.

Bảng 2. Kết quả phân tích P sử dụng phương pháp DGT tại Bạc Liêu và Cần Thơ.

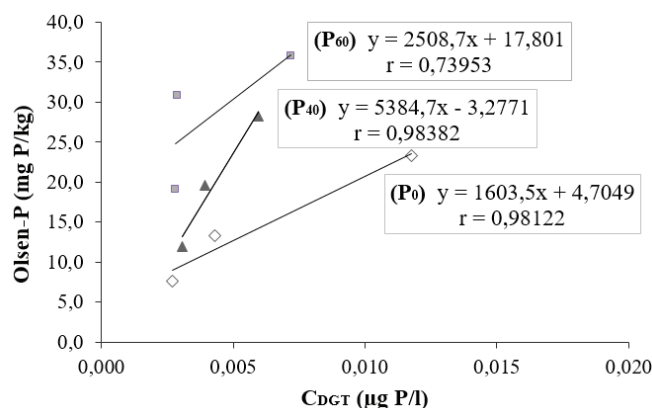
Địa điểm	Nghiệm thức	P hấp phụ trên gel FeOOH (μg)	Tốc độ cung cấp P của đất ($\mu g/cm^2/s$)	C_{dgt} -Nồng độ P hấp phụ trên gel (μg P/l)
Bạc Liêu (A)	P ₆₀	0,164	$7,49 \cdot 10^{-7}$	4,30
	P ₄₀	0,168	$7,66 \cdot 10^{-7}$	4,31
	P ₀	0,170	$7,73 \cdot 10^{-7}$	6,26
Cần Thơ (B)	P ₆₀	0,162	$7,38 \cdot 10^{-7}$	2,86
	P ₄₀	0,164	$7,48 \cdot 10^{-7}$	3,40
	P ₀	0,198	$9,01 \cdot 10^{-7}$	4,52
F-test (A)		ns	ns	ns
F-test (B)		ns	ns	ns

ns: Khác biệt không ý nghĩa thống kê.

Tương quan giữa nồng độ P hấp phụ trên gel FeOOH và P hữu dụng trong đất

Kết quả phân tích tương quan giữa nồng độ P hấp phụ trên gel FeOOH với lượng P hữu dụng trong đất phân tích bằng phương pháp Olsen cho thấy, có sự tương quan ở tất cả các nghiệm thức không bón P, bón 40 kg P_2O_5 /ha và nghiệm thức bón 60 kg P_2O_5 /ha trên đất Bạc Liêu (hình 2). Sự tương quan được đánh giá là rất chặt, với hệ số tương quan theo các nghiệm thức không bón P, bón 40 kg P_2O_5 /ha và bón 60 kg P_2O_5 /ha lần lượt là 0,98, 0,98 và 0,74 trên phương trình. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, duy trì bón 60 kg P_2O_5 /ha trong canh tác lúa có thể làm giảm khả năng cung cấp P

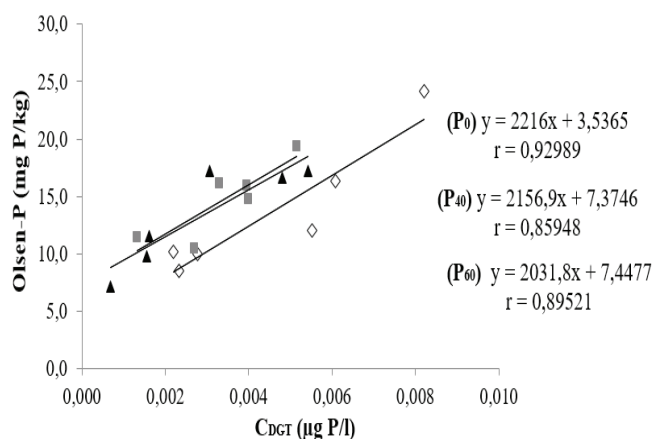
của đất cũng như khả năng hấp thu P của cây.



Hình 2. Mối tương quan giữa nồng độ P hấp phụ trên gel FeOOH và P hữu dụng trong đất phân tích bằng phương pháp Olsen tại Bạc Liêu.

Tương tự, kết quả phân tích cũng ghi nhận có sự tương quan về nồng độ P hấp phụ trên gel FeOOH và P hữu dụng trong đất phân tích bằng phương pháp Olsen trên đất thí nghiệm tại Cần Thơ. Hàm lượng P hữu dụng trong đất tại các nghiệm thức không bón P, bón 40 kg P_2O_5 /ha và bón 60 kg P_2O_5 /ha được đánh giá tương quan chặt với nồng độ P hấp phụ trên gel với hệ số tương quan lần lượt là 0,93, 0,86 và 0,90 trên phương trình (hình 3).

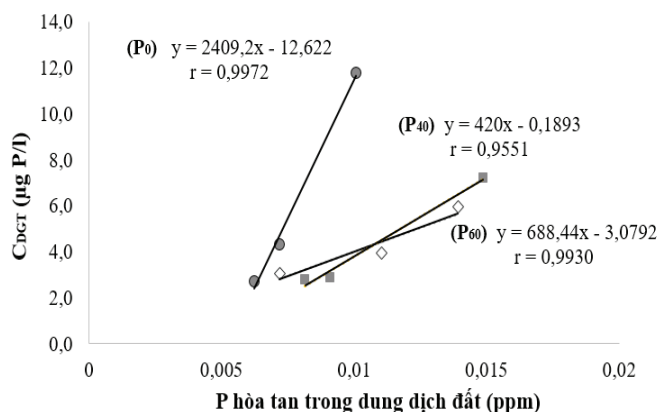
Lân hữu dụng trong đất được xem là một chỉ tiêu nhằm đánh giá lượng P mà cây trồng có thể hấp thu được cũng như phản ánh khả năng cung cấp P của đất [27]. Phương pháp Olsen có thể đánh giá được hàm lượng P hữu dụng trong đất cho cây trồng do hàm lượng P hữu dụng trích được có tương quan chặt với lượng P được cây trồng hấp thu và đáng tin cậy trên các loại đất hơi chua và các loại đất kiềm [28, 29]. Phương pháp DGT là phương pháp được áp dụng để dự đoán khả năng thiếu hụt dinh dưỡng cũng như có thể dự đoán được lượng phân yêu cầu trong canh tác [19]. Nghiên cứu của Hứa Hồng Nhã (2014) ứng dụng phương pháp DGT để ước lượng khả năng hấp thu P của tảo trong đất đáy ao nuôi Artemia tại huyện Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng cho thấy có sự tương quan chặt ($r = 0,87$) giữa hàm lượng P phân tích bằng phương pháp DGT và P Olsen [30]. Six và cộng sự (2013) nghiên cứu sử dụng phương pháp DGT để xác định đáp ứng lân của cây bắp và cây lúa cũng cho thấy phương pháp DGT có thể ước lượng năng suất bắp tốt hơn ($r = 0,92$) so với các phương pháp phân tích P khác như Olsen, Mehlich-3 và Bray-1 ($r = 0,73$) [25]. Đối với cây lúa, phương pháp DGT cũng có thể được sử dụng để xác định đáp ứng lân đối với năng suất với hệ số tương quan $r = 0,77$ so với các phương pháp Olsen, Mehlich-3 và Bray-1 ($r \approx 0,84$). Ngoài ra, một số nghiên cứu khác cho thấy phương pháp DGT có thể được sử dụng phân tích và đánh giá khả năng cung cấp P của đất tốt hơn các phương pháp phân tích P truyền thống [31].



Hình 3. Tương quan giữa nồng độ P hấp phụ trên gel FeOOH và P hữu dụng trong đất phân tích bằng phương pháp Olsen tại Cần Thơ.

Tương quan giữa nồng độ P hấp phụ trên gel FeOOH và P hòa tan trong dung dịch đất

Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng P hòa tan trong dung dịch đất được trích bằng phương pháp Malachite Green có tương quan chặt với nồng độ P được hấp phụ trên gel FeOOH ở cả ba nghiệm thức không bón P, bón 40 kg P_2O_5 /ha và bón 60 kg P_2O_5 /ha trên đất thí nghiệm tại Bạc Liêu với hệ số tương quan dao động từ 0,955-0,997 (hình 4). Kết quả trong nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu của Hứa Hồng Nhã (2014) cho thấy có sự tương quan chặt giữa hàm lượng P phân tích bằng phương pháp DGT và P hòa tan trong dung dịch đất phân tích bằng phương pháp so màu Malachite Green ($r = 0,927$). Lân hòa tan trong dung dịch đất được xem là lượng P hữu dụng được rễ cây trồng có thể dễ dàng hấp thu trực tiếp từ đất. Vì vậy, phương pháp DGT có thể giúp đánh giá chính xác lượng P hữu dụng được cây trồng hấp thu thông qua mô phỏng các chức năng tương tự của rễ cây trồng.



Hình 4. Tương quan giữa nồng độ P hấp phụ trên gel FeOOH và P hòa tan trong dung dịch đất phân tích bằng phương pháp Malachite Green tại Bạc Liêu.

Kết luận

Không bón hoặc bón phân P với liều lượng 40 kg P_2O_5 /ha giúp gia tăng tốc độ cung cấp P của đất và giúp rễ cây trồng hấp thu P cao hơn so với duy trì bón 60 kg P_2O_5 /ha trên cả hai điểm Bạc Liêu và Cần Thơ. Nồng độ P hấp phụ trên gel FeOOH tương quan chặt với hàm lượng P hữu dụng trong đất và hàm lượng P hòa tan trong dung dịch đất. Phương pháp DGT có thể xác định được chính xác lượng P hữu dụng trong đất mà cây trồng có thể hấp thu so với các phương pháp phân tích P khác như Bray, Olsen... trên các loại đất canh tác lúa và rau màu. Cần có thêm các nghiên cứu sử dụng phương pháp DGT để đánh giá đáp ứng với phân P của các loại cây trồng và đánh giá tương quan giữa lượng P phân tích bằng phương pháp DGT với khả năng đệm P của đất trên các vùng đất canh tác khác như đất phèn, đất mặn ở ĐBSCL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.P.S. Tanwar, M.S. Shaktawat (2003), "Influence of phosphorus sources, levels and solubilizers on yield, quality and nutrient uptake of soybean (Glycine max)-wheat (Triticum aestivum) cropping system in southern Rajasthan", *Indian Journal of Agricultural Science*, **73**(1), pp.3-7.
- [2] J. Li, A.E. Eneji, L. Duan, S. Inanaga, Z. Li (2005), "Saving irrigation water for winter wheat with phosphorus application in the North China Plain", *Journal of Plant Nutrition*, **28**(11), pp.2001-2010.
- [3] W. Yu, X. Ding, S. Xue, S. Li, X. Liao, R. Wang (2013), "Effects of organic-matter application on phosphorus adsorption of three soil parent materials", *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **13**(4), pp.1003-1017.
- [4] A. Zhang, L. He, H. Zhao, Z. Wu, Z. Guo, S. Li (2009), "Effect of organic acids on inorganic phosphorus transformation in soil with different phosphorus sources", *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, **15**(4), pp.474-478.
- [5] R.H. Bray, L.T. Kurtz (1945), "Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils", *Soil Science*, **59**, pp.39-45.
- [6] A. Mehlich (1953), *Determination of P, Ca, Mg, K, Na, and NH_4* , North Carolina Soil Test Division.
- [7] S.R. Olsen, L.E. Sommers, A.L. Page (1982), *Methods of soil analysis, Part 2: Chemical and Microbiological properties*.
- [8] T.Q. Tuyen (2013), "Influence of long-term application of N, P and K levels on soil properties and rice yield in the Cuu Long Delta, Viet Nam", *Omon Rice*, **19**, pp.131-144.
- [9] T.Q. Tuyen, C. Phung, T.K. Tinh (2006), "Influence of long term application of N, P, K fertilizer on soil pH, organic matter, CEC, exchangeable cations and some trace elements", *Omon Rice*, **14**, pp.144-148.
- [10] H. Zhang, W. Davison, S. Miller, W. Tych (1995), "In situ high resolution measurements of fluxes of Ni, Cu, Fe, and Mn and concentrations of Zn and Cd in porewaters by DGT", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**(20), pp.4181-4192.

- [11] H. Zhang, W. Davison (2000), "Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films", *Analytical Chemistry*, **72**(18), pp.4447-4457.
- [12] H. Zhang, F.J. Zhao, B. Sun, W. Davison, S.P. McGrath (2001), "A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants", *Environmental Science & Technology*, **35**(12), pp.2602-2607.
- [13] M.R. Sangi, M.J. Halstead, K.A. Hunter (2002), "Use of the diffusion gradient thin film method to measure trace metals in fresh waters at low ionic strength", *Analytica Chimica Acta*, **456**(2), pp.241-251.
- [14] F. Degryse, E. Smolders, I. Oliver, H. Zhang (2003), "Relating soil solution Zn concentration to diffusive gradients in thin films measurements in contaminated soils", *Environmental Science & Technology*, **37**(17), pp.3958-3965.
- [15] J. Gimpel, H. Zhang, W. Davison, A.C. Edwards (2003), "In situ trace metal speciation in lake surface waters using DGT, dialysis, and filtration", *Environmental Science & Technology*, **37**(1), pp.138-146.
- [16] A.J. Peters, H. Zhang, W. Davison (2003), "Performance of the diffusive gradients in thin films technique for measurement of trace metals in low ionic strength freshwaters", *Analytica Chimica Acta*, **478**(2), pp.237-244.
- [17] A.L. Nolan, H. Zhang, M.J. McLaughlin (2005), "Prediction of zinc, cadmium, lead, and copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffusive gradients in thin films, extraction, and isotopic dilution techniques", *Journal of Environmental Quality*, **34**(2), pp.496-507.
- [18] J.O. Agbenin, S.O. Igbokwe (2006), "Effect of soil-dung manure incubation on the solubility and retention of applied phosphate by a weathered tropical semi-arid soil", *Geoderma*, **133**(3), pp.191-203.
- [19] S.D. Mason (2007), *Diffusive Gradient in Thin Films (DGT) as a technique to predict nutrient availability to plants*, The University of Adelaide, Australia. pp.25-35.
- [20] FAO (2014), *World Reference Base for Soil Resources 2014: International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps*, World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome. 181 pages.
- [21] A.J. Metson (1961), *Methods of chemical analysis for soil survey samples*, Soil Bulletin, 12 GVT Printer Wellington, DSIR, New Zealand. 207 pages.
- [22] P.P. Van Veldhoven, G.P. Mannaerts (1987), "Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range", *Analytical Biochemistry*, **161**(1), pp.45-48.
- [23] A. Walkley, I.A. Black (1934), "An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method", *Soil Science*, **37**(1), pp.29-38.
- [24] D. Kroetsch, C. Wang (2008), "Particle size distribution", *Soil sampling and methods of analysis*, CRC Press and Taylor and Francis Group: Boca Raton, Florida. pp. 713-725.
- [25] L. Six, E. Smolders, R. Merckx (2013), "The performance of DGT versus conventional soil phosphorus tests in tropical soils-maize and rice responses to P application", *Plant and Soil*, **366**(1-2), pp.49-66.
- [26] R. Merckx, L. Six, P. Pypers, E. Smolders (2012), *Isotopic techniques and their role in designing new P-availability tests for weathered, P-fixing soils*, Paper presented at the International Symposium on Managing Soils for Food Security and Climate Change Adaptation and Mitigation, 23-26 July 2012, Vienna, Austria.
- [27] N. Ziadi, J.K. Whalen, A.J. Messiga, C. Morel (2013), "Assessment and modeling of soil available phosphorus in sustainable cropping systems", *Advances in Agronomy*, **122**, pp.85-126.
- [28] S.D. Mason, R. Hamon, H. Zhang, J. Anderson (2008), "Investigating chemical constraints to the measurement of phosphorus in soils using diffusive gradients in thin films (DGT) and resin methods", *Talanta*, **74**(4), pp.779-787.
- [29] S.D. Mason, A. McNeill, M.J. McLaughlin, H. Zhang (2010), "Prediction of wheat response to an application of phosphorus under field conditions using diffusive gradients in thin-films (DGT) and extraction methods", *Plant and Soil*, **337**(1-2), pp.243-258.
- [30] Hứa Hồng Nhã (2014), *Ứng dụng phương pháp DGT (Diffusive gradient in thin film technique) ước lượng khả năng hấp thu lân của tảo trong môi trường ao nuôi Artemia ở Vĩnh Châu, Sóc Trăng*, Luận văn thạc sỹ khoa học đất, Trường Đại học Cần Thơ.
- [31] S. Tandy, S. Mundus, J. Yngvesson, T.C. Bang, E. Lombi, J.K. Schjørring, S. Husted (2011), "The use of DGT for prediction of plant available copper, zinc and phosphorus in agricultural soils", *Plant and Soil*, **346**(1-2), pp.167-180.

Nghiên cứu khả năng diệt một số loài vi khuẩn và nấm của lá hẹ (*Allium tuberosum*)

Trương Thị Mỹ Hạnh^{1*}, Nguyễn Thị Nguyễn¹,
Trương Thị Thành Vinh², Huỳnh Thị Mỹ Lệ³, Phan Thị Vân¹

¹Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I

²Đại học Vinh

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 2/4/2018; ngày chuyển phản biện 6/4/2018; ngày nhận phản biện 14/5/2018; ngày chấp nhận đăng 22/5/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng diệt khuẩn và nấm của nước ép lá hẹ (*Allium tuberosum*). Vi khuẩn gây bệnh cho cá rô phi bao gồm *Aeromonas hydrophila* (3 chủng là CED04-008, CED05-004, CED05-005), *Streptococcus* sp. (CEDMA05-043) và nấm gây bệnh (*Saprogenia* sp.) được thử với dịch chiết lá hẹ ở nồng độ và thời gian khác nhau. Kết quả cho thấy, nước ép lá hẹ ở nồng độ 100 µl có khả năng diệt các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. với đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK) lần lượt là 27-31 và 30 mm. Nấm *Saprogenia* sp. bị diệt ở nồng độ 15.000 và 13.000 ppm với thời gian ngâm tương ứng là 6 và 24 giờ. Kết quả này là cơ sở khoa học quan trọng tạo tiền đề phát triển sản phẩm thuốc thảo dược có hiệu quả phòng trị bệnh ở cá rô phi nuôi theo hướng an toàn sinh học và thân thiện với môi trường.

Từ khóa: *Aeromonas hydrophila*, *Allium tuberosum*, hẹ, rô phi, *Saprogenia* sp., *Streptococcus* sp..

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Với mục tiêu phát triển nuôi cá rô phi trở thành ngành sản xuất hàng hóa lớn, chủ lực, hiệu quả, bền vững với sản phẩm đa dạng, giá trị cao nhằm đáp ứng thị trường tiêu thụ trong nước và xuất khẩu, kế hoạch đã đề ra là đến năm 2030 diện tích nuôi đạt 400.000 ha và 1,8 triệu m³ lồng nuôi trên hệ thống sông và hồ chứa lớn, sản lượng đạt 400.000 tấn, trong đó 45-50% phục vụ xuất khẩu [1]. Để đạt được kế hoạch này, hai yếu tố then chốt cần triển khai hiệu quả là sản xuất con giống có chất lượng cao và kiểm soát tốt dịch bệnh trong quá trình nuôi [2].

Cũng như các loại cá nuôi khác, cá rô phi có thể nhiễm các tác nhân như ký sinh trùng, nấm, và vi rút, đặc biệt là vi khuẩn. Vi khuẩn *Streptococcus* sp. đã gây ra dịch bệnh ở cá rô phi năm 2009 trên diện rộng tại hầu hết các tỉnh/thành phố miền Bắc (Hải Dương, Bắc Ninh, Bắc Giang và Hà Nội...), với tỷ lệ cá nuôi chết 80-100% [3]. Bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* sp. vẫn tiếp tục diễn ra tại hộ nuôi trên hầu hết các tỉnh thành cả nước, đặc biệt tại các tỉnh miền Bắc với tỷ lệ chết 50-80%, cá bị bệnh có biểu hiện bệnh lý dễ nhận thấy như lồi mắt, xuất huyết, bơi không định hướng... [4]. Bên cạnh đó, vi khuẩn *A. hydrophila*, nấm *Saprogenia* sp. và *Branchiomyces* đã được báo cáo là có ảnh hưởng đến cá rô phi trong suốt quá trình nuôi, đặc biệt giai đoạn 0,5-100 g

[5, 6]. Trong thực tế, thiệt hại và mất mát lớn nhất của người nuôi khi cá bị bệnh là do cá bội nhiễm đa tác nhân gây bệnh hơn là do đơn lẻ một tác nhân gây ra [7], vì vậy, giải pháp đưa ra có hiệu quả để kiểm soát đa tác nhân gây bệnh cho cá rô phi, tạo ra sản phẩm mang tính an toàn vệ sinh thực phẩm, đồng thời thân thiện với môi trường đang là điều cần hướng tới [8].

Sản phẩm có nguồn gốc từ thảo dược đã và đang được quan tâm phát triển trong nuôi trồng thủy sản với vai trò tăng sức đề kháng, kích thích tăng trưởng, tiêu hóa [9], thay thế thuốc kháng sinh nhằm hạn chế rủi ro do hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn, tạo an toàn vệ sinh cho sản phẩm [10, 11], tăng khả năng miễn dịch [12], kháng nấm [8, 13].

Các nghiên cứu hiệu quả và ứng dụng thảo dược trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam còn rất nhiều hạn chế so với các nước trên thế giới, đến nay loại thảo dược được ứng dụng rộng rãi có tính hiệu quả diệt khuẩn, nấm cao là tỏi, hẹ - loại thảo dược thuộc họ hành cùng với tỏi. Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định hiệu quả diệt vi khuẩn, nấm của hẹ, làm cơ sở cho việc nghiên cứu tạo sản phẩm thuốc có nguồn gốc từ thảo dược với hiệu quả diệt vi khuẩn và nấm có thể ứng dụng phù hợp ở mô hình nuôi cá rô phi tại Việt Nam.

*Tác giả liên hệ: tmhanh@ria1.org

The anti-bacterial and anti-fungal effects of garlic chives (*Allium tuberosum*)

Thi My Hanh Truong^{1*}, Thi Nguyen Nguyen¹,
Thi Thanh Vinh Truong², Thi My Le Huynh³,
Thi Van Phan¹

¹Research Institute for Aquaculture No 1

²Vinh University

³Vietnam National University of Agriculture

Received 2 April 2018; accepted 22 May 2018

Abstract:

The study was conducted to evaluate the bacterial and fungal inhibitions of the leaf extract from galic chives (*Allium tuberosum*). The bacteria and fungi that caused the diseases on tilapia included 3 strains of *Aeromonas hydrophila* (CED04-008, CED05-004, and CED05-005), 1 strain of *Streptococcus* sp., and they (CEDMA05-043), and fungi of *Saprolegnia* sp., and they were exposed to the leaf extract at different concentrations and durations. The results showed that the garlic chives leaf juice (100 µl) killed *A. hydrophila* and *Streptococcus* sp. by the sterile round of 27-31 mm and 30 mm, respectively. *Saprolegnia* sp. was killed at the concentrations of 15,000 ppm and 13,000 ppm after 6 and 24 hours, respectively. This finding is an important scientific evidence to develop herbal products for the prevention and treatment of diseases during tilapia farming towards biosafety and environmental friendliness.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Allium tuberosum*, garlic chives, *Saprolegnia* sp., *Streptococcus* sp., Tilapia.

Classification number: 4.5

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn và nấm phân lập từ cá rô phi bị bệnh và lưu giữ tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA) thuộc Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I (RIA1). Vi khuẩn bao gồm *A. hydrophila* (với 3 chủng có ký hiệu lần lượt là CED04-008, CED05-004, CED05-005), *Streptococcus* sp. (CED05-043) và nấm *Saprolegnia* sp.

Lá hẹ (*A. tuberosum*), thuốc kháng sinh Oxytetracycline

(30 µg), Streptomycine (500 µg) và các khoan giấy chưa tẩm kháng sinh đạt tiêu chuẩn (CODE 1334-OXOID) được sản xuất bởi Công ty Nam Khoa.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị nước ép lá hẹ: Lá hẹ được rửa sạch, để ráo nước tự nhiên ở nhiệt độ phòng, thái nhỏ cho vào máy xay ép lấy nước và bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Sử dụng lần lượt 50, 70 và 100 µl nước ép lá hẹ nhỏ lên khoan giấy. Các khoan giấy đã được tẩm nước ép lá hẹ được sử dụng trong bước lập kháng sinh đồ nhằm xác định hiệu quả diệt khuẩn.

Chuẩn bị vi khuẩn: Vi khuẩn được nuôi lắc trong môi trường nutrient broth ở nhiệt độ 29°C, với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 16h. Mật độ vi khuẩn được đo bằng phương pháp so màu quang điện với bước sóng $\lambda = 600$ nm có giá trị OD = 1, tương ứng với mật độ vi khuẩn dao động trong khoảng 10^8 - 10^9 cfu/ml.

Đánh giá khả năng kháng khuẩn của nước ép lá hẹ: Xác định hiệu quả diệt khuẩn của nước ép lá hẹ bằng phương pháp lập kháng sinh đồ của Kirby-Bauer. Sử dụng môi trường Mueller-Hinton Agar (MHA, Merck) đổ lên đĩa lòng, hút khoảng 10^8 - 10^9 khuẩn lạc/ml/đĩa, trang đều lên bề mặt đĩa, đặt khoan Oxytetracycline 30 µg (OX); Streptomycine 500 µg (ST) và các khoan giấy tẩm nước ép lá hẹ tương ứng lượng 50, 70 và 100 µl/khoan lên mặt đĩa thạch. Sau 24h ủ ở nhiệt độ 28-30°C đọc kết quả ĐKVVK trên đĩa thạch MHA, kết quả sẽ phản ánh khả năng nhạy, nhạy trung bình hay kháng của nước ép lá hẹ đối với vi khuẩn, đồng thời có thể so sánh hiệu quả diệt khuẩn đối với thuốc kháng sinh sử dụng.

Đánh giá khả năng kháng nấm của nước ép lá hẹ: Tác dụng diệt nấm được thực hiện như sau: Nước ép lá hẹ được pha loãng trong nước cất khử trùng lần lượt với tỷ lệ tương ứng nước ép lá hẹ trong nước cất là 5, 6,25, 12,5, 25, 50 và 100%. *Saprolegnia* sp. được nuôi cấy trên môi trường tăng sinh sau 24h được rửa sạch trong nước cất 3 lần, sau đó cho vào dung dịch nước ép lá hẹ với các độ pha loãng % tương ứng nêu trên trong 10 phút, 30 phút, 1h, 2h, 3h, 4 h và 24h. Lấy ra rửa qua nước cất 3 lần, rồi cấy lên môi trường nuôi cấy, theo dõi sự phát triển của sợi nấm sau 24, 48, 72... 168h.

Nghiệm thức đối chứng được bố trí như sau: Chủng nấm sẽ được nuôi cấy trong môi trường yeast extract agar (GYA) không ngâm qua dịch chiết thảo mộc mà chỉ rửa qua nước cất.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu của nước ép lá hẹ: Nấm *Saprolegnia* sp. được ngâm trong nước ép lá hẹ được pha loãng với nồng độ lần lượt 5.000, 10.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 20.000, 30.000, 35.000, 45.000 và 50.000 ppm trong thời gian 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24

và 48h. Sau thời gian ngâm ở nồng độ tương ứng, sợi nấm được lấy ra cấy trên môi trường tăng sinh GYA và theo dõi sự phát triển của nấm trong 7 ngày.

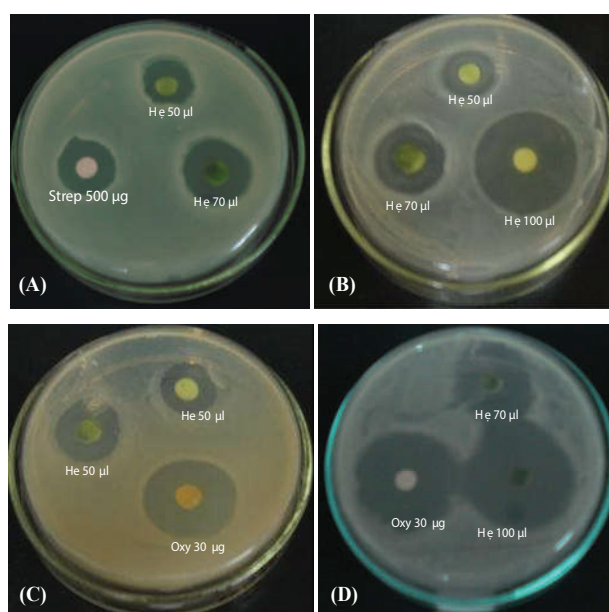
Xử lý số liệu: Dùng phần mềm Microsoft Excell (2007).

Kết quả và thảo luận

Tác dụng diệt khuẩn của nước ép lá hẹ đối với vi khuẩn gây bệnh ở cá rô phi

Nước ép lá hẹ có tính diệt khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. gây bệnh cho cá rô phi nuôi được thể hiện rõ ở bảng 1 và hình 1. ĐKVVK tăng lên theo hàm lượng nước ép lá hẹ sử dụng trên khoanh giấy từ 50, 70 và 100 μ l. Với hàm lượng 100 μ l nước ép lá hẹ có khả năng diệt *A. hydrophila* với ĐKVVK dao động trong khoảng 27,2-31 mm, cao hơn so với thuốc Oxytetracycline (20,5-28,3 mm). Trong khi đó chỉ với lượng 70 μ l nước ép lá hẹ có tính diệt *Streptococcus* sp. với ĐKVVK đạt từ 18,9 đến 28,4 mm, cao hơn thuốc Streptomycin (21,9 mm) (bảng 1). Qua đó nhận thấy, hẹ có tính diệt khuẩn mạnh, đặc biệt với vi khuẩn gram dương như *Streptococcus* sp.. Kết quả ở bảng 1 cũng đã thể hiện, chỉ với nước ép lá hẹ (100 μ l), chưa qua tách chiết thô hay tinh nhưng đã có hiệu quả diệt vi khuẩn lớn hơn Oxytetracycline và Streptomycin, đây là 2 loại kháng sinh có phổ rộng đối với nhóm vi khuẩn gram âm và gram dương, đồng thời chúng được sử dụng phổ biến [14]. Tính hiệu quả về diệt khuẩn của thảo dược đã được xác nhận và có xu thế sử dụng rộng rãi, do thảo dược có nhiều ưu điểm vượt trội như nguồn nguyên liệu dễ kiếm, chi phí thấp, thân thiện với môi trường, không ảnh hưởng đến người sử dụng và cho ra sản phẩm đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm. Một số loại có hiệu quả diệt khuẩn tốt ngay cả khi vi khuẩn đã có hiện tượng kháng với thuốc kháng sinh, như cây lô hội (*Aloe barbadensis*), mướp đắng (*Momordica charantia*) có tính diệt khuẩn cao với tác nhân gây bệnh *A.*

hydrophila, *Cellobiococcus* sp., *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Streptobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, khi các chủng vi khuẩn này đã kháng với thuốc kháng sinh nitrofurantoin, amoxycillin, bacitracin, cephalothin, erythromycin, novobiocin, vancomycin, ampicillin, oxacillin và colistin [15]. Nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất là thảo dược thuộc nhóm hành tỏi (Allium), bên cạnh kết quả nghiên cứu bằng lập kháng sinh đồ có hiệu quả ức chế sự phát triển của vi khuẩn gram âm (*Vibrio harveyi*, *Vibrio* spp., *Vibrio parahaemolyticus* và *Aeromonas* spp.) gây bệnh cho động vật thủy sản nuôi [16, 17], còn có các sản phẩm thương mại như KN04-12, TD1-Becanor, TD2-Becanor... với thành phần chính là tỏi [4].



Hình 1. ĐKVVK của nước ép lá hẹ lên vi khuẩn. (A, B) là *Streptococcus* sp; (C, D) là *Aeromonas hydrophila*.

Bảng 1. ĐKVVK của các nồng độ nước ép lá hẹ đối với vi khuẩn gây bệnh ở cá rô phi nuôi.

Chủng vi khuẩn thử nghiệm	ĐKVVK (mm)				
	Nước ép lá hẹ			Khoanh giấy tẩm kháng sinh	
	50 μ l	70 μ l	100 μ l	Oxy (30 μ g)	Str (500 μ g)
<i>A. hydrophila</i> (CED04-008)	17,2 $\pm$ 0,10 ^a	26,4 $\pm$ 0,11 ^b	28,7 $\pm$ 0,09 ^c	20,5 $\pm$ 0,04 ^d	-
<i>A. hydrophila</i> (CED05-004)	19,1 $\pm$ 0,09 ^a	25,3 $\pm$ 0,14 ^b	31,0 $\pm$ 0,04 ^c	28,3 $\pm$ 0,03 ^d	-
<i>A. hydrophila</i> (CED05-005)	15,9 $\pm$ 0,12 ^a	18,9 $\pm$ 0,08 ^b	27,1 $\pm$ 0,10 ^c	25,7 $\pm$ 0,04 ^d	-
<i>Streptococcus</i> sp. (CED05-043)	20,1 $\pm$ 0,03 ^a	28,4 $\pm$ 0,16 ^b	30,3 $\pm$ 0,04 ^c	-	21,9 $\pm$ 0,03 ^a

Ghi chú: Str là Streptomycin; Oxy là oxytetracycline; a, b, c, d chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê $p < 0,05$.

Tác dụng của nước ép lá họ đối với nấm gây bệnh ở cá rô phi

Kết quả sàng lọc ban đầu ở bảng 2 cho thấy, nước ép lá họ có hiệu quả ức chế, diệt nấm *Saprolegnia* sp. Với lượng nước ép pha loãng trong nước cất ở mức 50 hoặc 5-25% đã hoàn toàn có hiệu quả diệt nấm *Saprolegnia* sp. khi ngâm chúng trong thời gian lần lượt là 10 và 30 phút (bảng 2). Từ kết quả sàng lọc ban đầu, nghiên cứu tiếp tục triển khai nhằm xác định nồng độ tối thiểu ức chế *Saprolegnia* sp. Ngâm sợi nấm trong 3h ở nồng độ pha loãng nước ép lá họ 15.000 ppm, kết quả nhận thấy nước lá họ có khả năng ức chế sự phát triển của nấm tuy rằng chưa triệt để - nấm vẫn phát triển sau 2 ngày nuôi cấy, với nồng độ này cần ngâm sợi nấm trong 6h cho kết quả diệt nấm hoàn toàn (bảng 2, hình 2). Khi nâng nồng độ lên gấp đôi (30.000 ppm ứng với 300 µl nước ép lá họ pha loãng trong 1 ml nước cất), thời gian ngâm *Saprolegnia* sp. giảm xuống còn 2h đã có thể diệt nấm hoàn toàn, nồng độ và thời gian này có kết quả tương tự Green malachite (1 ppm) (bảng 3). Nồng độ tiếp tục nâng lên 35.000-50.000 ppm, ngâm sợi nấm trong 30 phút, có hiệu quả diệt nấm cao hơn khi sử dụng Green malachite (1 ppm). Có thể thấy rằng, họ là thảo dược cần được nghiên cứu sâu hơn để tạo sản phẩm thay thế Green malachite trong trị bệnh nấm gây ra ở cá nuôi.

Hiệu quả diệt nấm của họ đã được nghiên cứu bởi Lam và cs (2000) [18], kết quả nghiên cứu đã nêu phần chồi non của lá họ với nồng độ 2µM, sử dụng ngâm nấm trong 1h có khả năng diệt một số loại nấm *Fusarium oxysporum*, *Coprinus comatus*, *Mycosphaerella arachidicola* và *Botrytis cinerea*. Không chỉ trong thủy sản mà trong nông nghiệp, các nhà nghiên cứu cũng chỉ ra họ có hiệu quả cao trong phòng chống bệnh nấm *Fusarium* sp. gây bệnh héo lá ở chuối bằng cách trồng xen canh họ và chuối [19].

Bảng 2. Kết quả sàng lọc khả năng diệt nấm của nước ép lá họ.

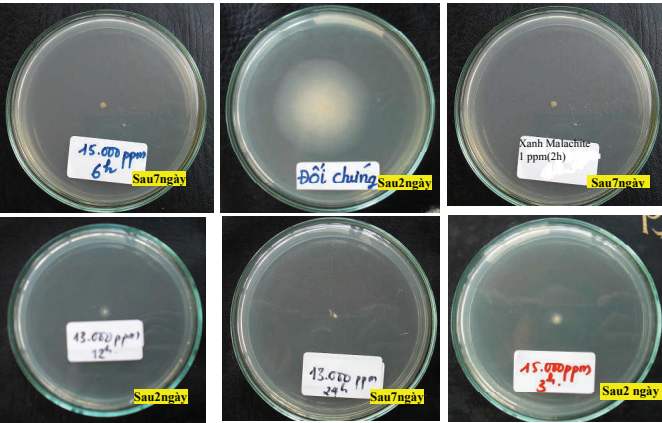
Tỷ lệ hệ sử dụng (%)	Thời gian	Tác dụng của dịch chiết ở các khoảng thời gian khác nhau						
		10 phút	30 phút	1h	2h	3h	4h	24h
100		-	-	-	-	-	-	-
50		-	-	-	-	-	-	-
25		+	-	-	-	-	-	-
12,5		+	-	-	-	-	-	-
6,25		+	-	-	-	-	-	-
5		+	-	-	-	-	-	-
Đối chứng (nước cất)		+	+	+	+	+	+	+

Ghi chú: +: Nấm phát triển sau 1 ngày nuôi cấy; -: Nấm không phát triển sau 4 ngày nuôi cấy.

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu của nước ép lá họ với *Saprolegnia* sp.

Nồng độ (ppm)	Thời gian	Tác dụng diệt nấm của nước ép lá họ trong khoảng thời gian khác nhau (h)											
		0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	9	12	24	48
Nồng độ thử nghiệm của nước ép lá họ	50.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	45.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30.000	+	+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20.000	+	+	+	+	2	3	-	-	-	-	-	-
	15.000	+	+	+	+	2	3	3	-	-	-	-	-
	14.000	+	+	+	+	+	+	+	2	2	-	-	-
	13.000	+	+	+	+	+	+	+	+	2	-	-	-
	12.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	-	-
	10.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Đối chứng	Nước cất	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Green malachite (1 ppm)	+	+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: +: Nấm phát triển sau 1 ngày; -: Nấm không mọc lại sau 7 ngày nuôi cấy; 2, 3: Nấm phát triển sau 2, 3 ngày nuôi cấy.



Hình 2. Hiệu quả diệt *Saprolegnia* sp. của nước ép lá họ ở các nồng độ pha loãng khác nhau.

Kết luận

Họ có tính diệt vi khuẩn (*Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus* sp.) cao khi sử dụng lượng nước ép ở nồng độ 100 µl/khoanh giấy, có ĐKVVK đạt 27-31 mm, cao hơn so với thuốc Oxytetracycline (30 µg) và Steptomycin (500 µg) có ĐKVVK 20-28 mm.

Họ có tính diệt nấm (*Saprolegnia* sp.) ở nồng độ 15.000

ppm trong 6h và ở 13.000 ppm trong 24h, hiệu quả tương đương Green machite (1 ppm) khi nồng độ hệ đạt 30.000 ppm, tính hiệu quả cao hơn Green machite khi nồng độ nước ép lá hệ sử dụng 35.000 ppm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2016), *Phê duyệt quy hoạch phát triển nuôi cá rô phi đến năm 2020, định hướng đến năm 2030*, Quyết định số 1639/QĐ-BNN-TCTS ngày 6/5/2016.
- [2] Thành Công (2016), *Phát triển cá Rô phi thành ngành sản xuất hàng hóa lớn*, <http://www.tiengiang.gov.vn/SNN/42/668/1125/91816/Tin-tuc---su-kien/Phat-trien-ca-ro-phi-thanh-nganh-san-xuat-hang-hoa-lon.aspx>.
- [3] Nguyễn Văn Khuê và cs (2009), “Xác định nguyên nhân gây chết cá rô phi thương phẩm tại một số tỉnh miền Bắc”, *Báo cáo khoa học Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I*.
- [4] CEDMA (2006), “Hiệu quả phòng và trị bệnh nhiễm khuẩn của sản phẩm thảo dược lên cá nuôi”, *Báo cáo khoa học Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I*.
- [5] Aquavet (2006), *Diseases of Tilapia - An Introduction*.
- [6] A.E. Noor El Deen, et al. (2014), “Studies on Aeromonas hydrophila in Cultured Oreochromis niloticus at Kafr El Sheikh Governorate, Egypt with Reference to Histopathological Alterations in Some Vital Organs”, *World J. Fish Mar. Sci.*, **6**, pp.233-240.
- [7] H.T. Dong, et al. (2015), “Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (Oreochromis niloticus) farms”, *Aquaculture*, **448**, pp.427-435.
- [8] C. Chitmanat, et al. (2005), “Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a Terminalia catappa solution against some tilapia (Oreochromis niloticus) pathogens”, *Acta Horticulturae*, **678**, pp.179-182.
- [9] T. Citarasu (2010), “Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry”, *Aquac. Int.*, **18(3)**, pp.403-414.
- [10] N. Sahoo, P. Manchikanti, S. Dey (2010), “Herbal drugs: Standards and regulation”, *Fitoterapia*, **18(6)**, pp.462-471.
- [11] J. Zhang, et al. (2012), “Quality of herbal medicines: Challenges and solutions”, *Ther. Med.*, **20(1-2)**, pp.100-106.
- [12] M. Minomol (2005), *Culture of Gold fish Carassius auratus using medicinal plants having immunostimulant characteristics*, M. Phil Diss. MS Univ. India.
- [13] A. Adigüzel, et al. (2005), “Antimicrobial Effects of Ocimum basilicum (Labiatae) Extract”, *Turkish J. Biol.*, **29**, pp.155-160.
- [14] Nguyễn Khang (2005), *Kháng sinh học ứng dụng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [15] R. Pannu, et al. (2014), “Effect of probiotics, antibiotics and herbal extracts against fish bacterial pathogens”, *Ecotoxicol. and Environ. Contam.*, **9**, pp.15-20.
- [16] F. Sultana, et al. (2015), “In-vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Allium tuberosum Rottler. ex Spreng”, *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, **2**, pp.178-187.
- [17] B. Vaseeharan, et al. (2011), “Antibacterial activity of Allium sativum against multidrug-resistant Vibrio harveyi isolated from black gill-diseased Fenneropenaeus indicus”, *Aquac. Int.*, **19**, pp.531-539.
- [18] Y.W. Lam, et al. (2000), “A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive Allium tuberosum”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, pp.74-80.
- [19] H. Zhang, et al. (2013), “Control of Panama Disease of Banana by Rotating and Intercropping with Chinese Chive (Allium Tuberosum Rottler): Role of Plant Volatiles”, *J. Chem. Ecol.*, **39**, pp.243-252.

Phân tích đa dạng di truyền hệ gen ty thể và nguồn gốc tiến hóa của sáu giống lợn bản địa Việt Nam

Bùi Anh Tuấn¹, Nguyễn Đức Hiếu², Nghiêm Ngọc Minh²,
Võ Thị Bích Thủy^{2*}

¹Viện Khoa học hình sự, Bộ Công an

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

Ngày nhận bài 26/3/2018; ngày gửi phản biện 30/3/2018; ngày nhận phản biện 2/5/2018; ngày chấp nhận đăng 7/5/2018

Tóm tắt:

Cây phát sinh chủng loại của 33 giống lợn nhà và lợn hoang thuộc nhánh châu Âu và châu Á, trong đó có 6 giống lợn bản địa Việt Nam đã được dựng lên từ dữ liệu trình tự vùng D-loop và vùng mã hóa của hệ gen ty thể. Lần đầu tiên dữ liệu hoàn chỉnh về hệ gen ty thể của 6 giống lợn Ỉ, Móng Cái, Mường Khương, Mường Lay, Hương và Hạ Lang được công bố trên GenBank với các mã số truy cập KX094894, KU556691, KY432578, KX147101, KY964306 và KY800118. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định trình tự hoàn chỉnh hệ gen ty thể của cả 6 giống lợn, chú giải chức năng hệ gen, phân tích đa hình trình tự mtDNA, qua đó làm cơ sở để nghiên cứu phát sinh chủng loại, xác định về nguồn gốc và quan hệ tiến hóa của các giống lợn này với các giống lợn khác trên thế giới, phục vụ trực tiếp cho mục tiêu bảo tồn nguồn gen. Kết quả dựa trên khảo sát về khoảng cách di truyền và mối quan hệ phát sinh phân tử cho biết mối quan hệ di truyền theo dòng mẹ giữa 6 giống lợn bản địa Việt Nam và những giống lợn bản địa này có mối quan hệ gần gũi với các nhóm lợn Nam Trung Quốc và lưu vực sông Hoàng Hà. Những kết quả nghiên cứu của đề tài là nguồn dẫn liệu quan trọng cho các nghiên cứu khác về các giống lợn bản địa ở Việt Nam.

Từ khóa: Hệ gen ty thể, phát sinh chủng loại, *Sus scrofa*, tiến hóa phân tử.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Việt Nam có khoảng trên 20 giống lợn bản địa, trong số đó có những giống thuộc Danh mục nguồn gen vật nuôi quý hiếm cần được bảo tồn [1]. Lợn Ỉ nguồn gốc xuất phát từ tỉnh Nam Định, ngày nay ít được nuôi do hiệu quả kinh tế không cao và đang có nguy cơ tuyệt chủng, đặc biệt, lợn Ỉ được đưa vào Danh mục nguồn gen vật nuôi quý hiếm cần được bảo tồn. Lợn Móng Cái là giống lợn nội được hình thành và phát triển lâu đời, xuất xứ từ thành phố Móng Cái, tỉnh Quảng Ninh, với khả năng sinh khá cao. Lợn Mường Khương là một giống lợn gắn liền với đời sống người H'Mông, được nuôi ở nhiều vùng thuộc tỉnh Lào Cai, nhiều nhất là ở huyện Mường Khương [2]. Đây là một trong ba giống lợn quý ở các tỉnh phía Bắc, cũng là một trong ba giống lợn nội chủ yếu làm nền lợn lai kinh tế ở miền Bắc Việt Nam. Giống lợn Hương được nuôi rộng rãi ở địa bàn biên giới phía Bắc thuộc tỉnh Cao Bằng. Đặc điểm của giống lợn Hương là sinh trưởng chậm hơn các giống khác nhưng thuần thực sớm. Giống lợn này có lớp mỡ mang mùi thơm tự nhiên. Đây là giống có sức đề kháng cao, ít bệnh dịch, dễ

nuôi và không kén thức ăn. Lợn Mường Lay được chăn nuôi chủ yếu ở địa bàn thị xã Mường Lay, tỉnh Điện Biên, đây là giống lợn phàm ăn, thích nghi tốt với điều kiện khắc nghiệt, có tính kháng bệnh tốt. Lợn Hạ Lang phân bố ở tỉnh Cao Bằng, cũng như các giống lợn bản địa khác, quần thể lợn Hạ Lang cũng đang ngày càng bị thu hẹp do áp lực của các giống nhập nội. Các giống lợn truyền thống Việt Nam rất nhiều mỡ và sinh trưởng chậm. Do vậy, chúng không phù hợp với nhu cầu phát triển kinh tế. Hiện nay, ở Việt Nam cũng như trên thế giới có xu hướng nuôi lợn lai nhập nội, dẫn đến nguy cơ mất dần đi những giống lợn bản địa. Ngày càng nhiều giống lợn có quy mô quần đàn ở mức bị đe dọa, chủ yếu là do sức ép của quá trình sản xuất lợn với quy mô toàn cầu, buộc người nông dân phải chọn lựa nuôi một số ít giống lợn phổ biến cho hiệu quả kinh tế cao [3].

DNA ty thể (mtDNA) đã được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu phát sinh chủng loại vì một số lý do sau: Thứ nhất, sự tiến hóa của mtDNA ở động vật có vú xảy ra trước tiên do sự thay thế từng cặp base đơn, chỉ một tỷ lệ hiếm là các trình tự có sự tái sắp xếp [4]. Thứ hai, tốc độ tiến hóa mtDNA xuất hiện nhanh hơn 10 lần so với DNA

*Tác giả liên hệ: thuybo@ibt.ac.vn

Genetic diversity of mitochondrial genome and evolutionary origin of six Vietnamese indigenous pig breeds

Anh Tuan Bui¹, Duc Hieu Nguyen²,
Ngoc Minh Nghiem², Thi Bich Thuy Vo^{2*}

¹Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security

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

Received 26 March 2018; accepted 7 May 2018

Abstract:

The phylogenetic trees of 33 domestic and wild boar pig breeds of Asian and European clades, including six Vietnamese indigenous pig breeds were reconstructed from D-loop region and coding region sequence using the Bayesian inference method. It is the first time the complete mitochondrial genome of the I, Mong Cai, Muong Khuong, Muong Lay, Huong, and Ha Lang pig breeds was sequenced and deposited on GenBank (accession numbers: KX094894, KU556691, KY432578, KX147101, KY964306, and KY800118, respectively). The genetic distances and phylogenetic relationships, based on both the mtDNA and the D-loop region, revealed that all of six Vietnamese pig breeds belonged to Asian clade with the close evolutionary relationship to other pig breeds from South China and Chinese Yellow River Valley. The publication of the mitochondrial genome sequences will make an important contribution to elucidating the relationship among Vietnamese indigenous pig breeds and supporting the selection of suitable ones for pig breeding in the area.

Keywords: Mitochondrial genome, molecular evolution, phylogenetic relationship, *Sus scrofa*.

Classification number: 4.6

gen nhân [5]. Thứ ba, mtDNA được di truyền theo dòng mẹ, đơn bội và không có sự tái tổ hợp [6]. Vì những lý do này nên mtDNA được sử dụng như một công cụ cho việc xác định các mối quan hệ giữa các cá thể trong cùng loài và trong số các loài có quan hệ gần với khoảng thời gian phân ly mới gần đây [5].

Việt Nam và khu vực Nam Trung Quốc được cho là một trong những trung tâm thuần hóa sớm nhất của các giống lợn nhà [7]. Giả thiết của Hongo và cộng sự về nguồn gốc của lợn bản địa Việt Nam có thể là hậu duệ của các con lợn rừng và lợn nhà từ một số khu vực ở châu Á, trong đó có một số vùng của Trung Quốc [8]. Nhóm nhà khoa học Nhật Bản và Việt Nam đã sử dụng trình tự phân đoạn (574 bp) mtDNA của một số giống lợn rừng và lợn nhà Việt Nam, so sánh với giống lợn rừng Ryukyu của Nhật Bản. Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng, con cháu của tổ tiên giống Ryukyu vẫn cư trú tại Việt Nam, trình tự mtDNA của các giống lợn nhà Việt Nam có độ phân ly rất lớn [9]. Mục đích của nghiên cứu này là giải trình tự hoàn chỉnh hệ gen ty thể, dự đoán cấu trúc, phân tích dữ liệu phân tử, xác định mối quan hệ phát sinh chủng loại sử dụng sự đa hình về trình tự mtDNA, qua đó đánh giá về nguồn gốc tiến hóa của 6 giống lợn bản địa Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Máu ngoại vi được thu thập từ các cá thể lợn được lựa chọn ngẫu nhiên thuộc các giống lợn bản địa dựa trên thông tin điều tra về phả hệ của Viện Chăn nuôi quốc gia.

Trình tự của các giống lợn châu Âu, châu Á được tải về từ GenBank và được xếp vào 5 khu vực địa lý chính [10]: Đông Bắc Á, Khu vực Mekong, Lưu vực sông Hoàng Hà, Nam Trung Quốc, Lưu vực sông Dương Tử và các quốc gia châu Âu.

Phương pháp

Phương pháp tách chiết và nhân bội DNA: DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit GeneJET™ Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Toàn bộ trình tự mtDNA được khuếch đại bằng PCR với 30 cặp mỗi (bảng 1). Tổng thể tích PCR 25 µl: 12,5 µl GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1,0 µl (20 ng/µl) DNA khuôn, 0,5 µl mỗi mỗi (10 mmol/l), và 10,5 µl dH₂O. Chu trình nhiệt: Biến tính ở 94°C trong 5 phút, 25 chu kỳ: 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 53-55°C, 30 giây ở 72°C, và 8 phút ở 72°C. Sản phẩm

Bảng 1. 30 cặp mồi sử dụng cho PCR và vị trí các phân đoạn được khuếch đại.

TT	Trình tự mồi (5'-3')		T _a (°C)	Vị trí các amplicon
	Mồi xuôi	Mồi ngược		
D-loop	AGGAGACTAATCCGCCAT	GCGGATACTTGCATGTGT	54	16556-1306
1	ACTAAGTCAATGCCTATTCTG	CAATGTATGAAACCTCAG	54	16298-548
2	CTACACAATAACCTCCCATA	TGGCAGGAGATTACCAACT	54	1107-1490
3	GCTCATAAGCCCTTGCTC	ATTCTTTCATCTTCCCTT	54	1377-2415
4	CACAACCATGCAAGAAGAGACA	ACAACCGATCATCACCAGGC	54	2141-2634
5	CCGTAAGGGAAGATGAAAG	TATGGTTATTTGACTGGT	54	2393-3493
6	CCGTGCAAGGTAGCATA	CCAACATCGAGGTCGTAA	55	3189-3606
7	TGGGGTGACCTCGGAGTAC	AATATGGCGAAAGGTCCGG	54	3423-4589
8	CGAGCAGTAGCCCAACA	GGTCGTATCGGAATCGTG	55	4321-4771
9	GTATCAGGCTTTAACGTAGA	TGGTAATACTGCTGTCATTC	55	4543-5671
10	CACAGAAGCAGCCACAAA	ATGGGATAGGATAAAGT	55	5242-5782
11	ACATAGGATGAATGACAGC	TGGTGAAGTAGTCAGAAAC	55	5643-6831
12	GCACTGCCTTGAGCCTAC	GTGTTGAGTTGCGGTCT	55	6599-7160
13	CCCATTATGATGGGGTTT	TGCTGTGTATGCGTCAGGAT	55	6724-7857
14	CACTTTGTAATCATATTCGTAG	TAGTTGGAAAGGTAAGC	53	7747-8223
15	TTATCTCACTAACAGCAG	TTGAGTTCGGTTGATTCTG	55	7885-9086
16	GCTTCATGCCAATGTAC	TTATAGCGGAATCCTGTG	55	8816-9478
17	GCAAGCCGAGATCAACCG	CGAGGAGGATTGAGGTGT	55	9061-10214
18	ATACCACATAGTAAACCAA	CCTGTAGCCACAAAGAAA	55	9820-10404
19	CTAAACACCTCAATCCTCC	TTGGACGTAATCGTIACCG	55	10193-11341
20	CCTTCAGGGTTACTTAT	TTCGGGTTGTGGTTTCTT	53	11113-11632
21	CGGTACCGATTACGTCAA	CCGATTAGATTGATGATG	55	11323-12488
22	ACCAGCTCTACTGCTTA	GAGGCTTTGATGTTGTTA	55	12172-12644
23	ATGATGACTAATAGCAAGCC	GGGATGTAGTCCGAATTG	55	12429-13627
24	CATCGGAGACATTGGATT	AGTTGGCTTGAAGTTGAG	55	13462-13863
25	CCTACTCTAGCTGCAGCAG	ATTATGGAGATTACTCGTGG	55	13579-14765
26	TCCGATCATCATTACTA	TTTATGGTGGACTTGGGT	55	14576-15187
27	TAATTACCACGAGTAATCTC	TTCTACGAGTCTGTTCCG	55	14740-15827
28	GGAGCATCCATATCTTT	GGTGTAGTTGTCTGGGTCT	53	15597-16112
29	TCGTAGAATGAATCTGAGG	GGTGATACGCATGTTGACTG	55	15820-301

PCR được tinh sạch, sau đó giải trình tự bằng phương pháp Sanger [11] trên máy phân tích gen ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ).

Phương pháp lắp ghép, giống hàng trình tự, phân tích và chú giải hệ gen: Trình tự vùng D-loop và vùng mã hóa được lắp ghép bằng sử dụng phần mềm EditSeq (DNASTAR Inc., Madison, WI, Mỹ) [12] và phần mềm DNADragon v.1.6.0

(SequentiX, Đức). Trình tự D-loop và trình tự mã hóa của toàn bộ hệ gen ty thể của 6 giống lợn bản địa Việt Nam, các giống lợn châu Âu và giống lợn thuộc nhóm châu Á được giống hàng đa trình tự, sử dụng thuật toán MUSCLE [13]. Phân tích và chú giải hệ gen của các giống lợn bản địa Việt Nam bằng công cụ trực tuyến Dogma và MITOS Web Server [14, 15]. Tất cả các chú giải được kiểm tra bằng công cụ BLAST trên GenBank [16, 17]. Toàn bộ 22 gen tRNA được dự đoán cấu trúc bậc hai sử dụng công cụ trực tuyến MITOS Web Server.

Phương pháp xác định đa hình trình tự và phân tích phát sinh chủng loại: Xác định các vị trí đa hình, vị trí SNP trên trình tự D-loop của các giống lợn được tiến hành sử dụng phần mềm DnaSP v6. [18] và SeqMan v7.1.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI, Mỹ). Khoảng cách di truyền được tính toán sử dụng thuật toán hai thông số của Kimura trong phần mềm MEGA [13].

Trình tự của vùng D-loop và toàn bộ vùng mã hóa của hệ gen ty thể được sử dụng riêng biệt làm dữ liệu đầu vào để dựng cây phát sinh chủng loại. Phân tích phát sinh phân tử được tiến hành dựa trên dữ liệu rời rạc sử dụng phương pháp suy luận Bayes theo mô hình Hasegawa-Kishino-Yano [19]. Xác suất hậu nghiệm của cây được tính với chuỗi Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 10000000 [20] sử dụng phần mềm BEAST v1.8.3 [21]. Sau đó, cây tốt nhất sẽ được tìm ra bằng phần mềm Tree Annotater v.1.8.4. Cuối cùng, phần mềm Figure Tree v1.4.2 được sử dụng để đọc tệp tin kết xuất cho việc vẽ cây phát sinh. Cây được xác định gốc sử dụng trình tự tương đồng đối chứng của lợn hoang Malaysia (*Sus barbatus*).

Kết quả

Thành phần, cấu trúc của hệ gen

Thành phần hệ gen ty thể hoàn chỉnh của 6 giống lợn bản địa gồm Ỉ, Móng Cái, Mường Khương, Mường Lay, Hương và Hạ Lang có 13 gen mã protein, 22 gen RNA vận chuyển (tRNA), 2 gen RNA ribosome (rRNA) và các vùng không mã hóa. Toàn bộ 22 gen tRNA của cả 6 giống bản địa đã được dự đoán có chung cấu trúc bậc hai (cỏ ba lá) với các gen tRNA có chiều dài từ 59 đến 75 bp. Cấu trúc hệ gen mtDNA của các giống lợn bản địa đã được chú thích rõ (bảng 2). Thành phần và cấu trúc hệ gen ty thể của 6 giống lợn bản địa Ỉ, Móng Cái, Mường Khương, Mường Lay, Hương và Hạ Lang tương tự như của các giống lợn nhà khác [22].

Bảng 2. Cấu trúc hệ gen ty thể của 6 giống lợn bản địa Việt Nam.

Gene	Codon			Chức năng	Vị trí											
	Start	Stop	Anti-codon		Hà Lang		Hương		Mường Lay		Í		Móng Cái		Mường Khương	
					Start	Stop	Start	Stop	Start	Stop	Start	Stop	Start	Stop	Start	Stop
D-loop				H	1	1285	1	1315	1	1304	1	1295	1	1275	1	1244
tRNA <i>Phe</i>			GAA	H	1286	1355	1316	1385	1305	1374	1296	1365	1276	1345	1245	1314
12S rRNA				H	1356	2318	1386	2349	1375	2336	1366	2325	1346	2305	1315	2274
tRNA <i>Val</i>			TAC	H	2318	2385	2349	2416	2336	2403	2327	2394	2307	2374	2276	2343
16S rRNA				H	2384	3955	2415	3986	2402	3972	2395	3964	2375	3944	2344	3912
tRNA <i>Leu2</i>			TAA	H	3956	4030	3987	4061	3973	4047	3965	4039	3945	4019	3913	3987
ND1	ATG	TAG		H	4033	4989	4064	5020	4056	5000	4042	4998	4022	4978	3990	4946
tRNA <i>Ile</i>			GAT	H	4988	5056	5019	5087	5005	5073	4997	5065	4977	5045	4945	5013
tRNA <i>Gln</i>			TTG	L	5054	5126	5085	5157	5071	5143	5063	5135	5043	5115	5011	5083
tRNA <i>Met</i>			CAT	H	5128	5197	5159	5228	5145	5214	5137	5206	5117	5186	5085	5154
ND2	ATA	TAG		H	5198	6241	5229	6272	5215	6253	5207	6250	5187	6230	5155	6198
tRNA <i>Trp</i>			TCA	H	6240	6307	6271	6338	6258	6325	6249	6316	6229	6296	6197	6264
tRNA <i>Ala</i>			TGC	L	6314	6381	6345	6412	6332	6399	6323	6390	6303	6370	6271	6338
tRNA <i>Asn</i>			GTT	L	6383	6457	6414	6488	6401	6475	6392	6466	6372	6446	6340	6414
tRNA <i>Cys</i>			GCA	L	6490	6555	6521	6586	6508	6573	6499	6564	6479	6544	6447	6512
tRNA <i>Tyr</i>			GTA	L	6556	6620	6587	6651	6574	6638	6565	6629	6545	6609	6513	6577
COX1	ATG	TAA		H	6622	8166	6653	8197	6640	8178	6631	8175	6611	8155	6579	8123
tRNA <i>Ser2</i>			TGA	L	8170	8238	8201	8269	8188	8256	8179	8247	8159	8227	8127	8195
tRNA <i>Asp</i>			GTC	H	8246	8313	8277	8344	8264	8331	8255	8322	8235	8302	8203	8270
COX2	ATG	T--		H	8314	9001	8345	9032	8332	9012	8323	9010	8303	8990	8271	8958
tRNA <i>Lys</i>			TTT	H	9002	9068	9033	9099	9020	9086	9011	9077	8991	9057	8959	9025
ATPase8	ATG	TAA		H	9070	9273	9101	9304	9088	9282	9079	9282	9059	9262	9027	9230
ATPase6	ATG	TAA		H	9231	9911	9262	9942	9249	9923	9240	9920	9220	9900	9188	9868
COX3	ATG	T--		H	9911	10694	9942	10725	9929	10711	9920	10703	9900	10684	9868	10651
tRNA <i>Gly</i>			TCC	H	10695	10763	10726	10794	10713	10782	10704	10772	10684	10752	10652	10720
ND3	ATA	T--		H	10764	11109	10795	11140	10783	11127	10773	11118	10753	11099	10721	11066
tRNA <i>Arg</i>			TCG	H	11111	11179	11142	11210	11130	11198	11120	11188	11100	11168	11068	11136
ND4l	GTG	TAA		H	11180	11476	11211	11507	11214	11492	11189	11485	11169	11465	11137	11433
ND4	ATG	T--		H	11470	12847	11501	12878	11489	12856	11479	12856	11459	12836	11427	12804
tRNA <i>His</i>			GTG	H	12848	12916	12879	12947	12867	12935	12857	12925	12837	12905	12805	12873
tRNA <i>Ser1</i>			GCT	H	12917	12975	12948	13006	12936	12994	12926	12984	12906	12964	12874	12932
tRNA <i>Leu1</i>			TAG	H	12976	13045	13007	13076	12995	13064	12985	13054	12965	13034	12933	13002
ND5	ATA	TAA		H	13046	14866	13077	14897	13065	14880	13055	14875	13035	14855	13003	14823
ND6	ATG	TAA		L	14853	15380	14881	15408	14876	15391	14859	15386	14842	15369	14807	15334
tRNA <i>Glu</i>			TTC	L	15378	15446	15409	15477	15398	15466	15387	15455	15367	15435	15335	15403
Cytb	ATG	AGA		H	15451	16590	15482	16621	15471	16604	15460	16599	15440	16579	15408	16547
tRNA <i>Thr</i>			TGT	H	16591	16658	16622	166689	16611	16678	16600	16667	16580	16647	16548	16615
tRNA <i>Pro</i>			TGG	L	16658	16722	16689	16753	16678	16742	16667	16731	16647	16711	16615	16679

rRNA: ribosomal RNA; 16S rRNA: rRNA tiểu phần lớn; 12S rRNA: rRNA tiểu phần nhỏ; tRNA: RNA vận chuyển và các từ in nghiêng là mã của các amino acid; ND1-6 và ND4l: genes mã hóa nicotinamide dinucleotide dehydrogenase các tiểu phần 1 đến 6 và 4l; ATPase6 và 8: các gene mã hóa adenosine triphosphatase tiểu phần 6 và 8; COX1 đến 3: các gene mã hóa các tiểu phần cytochrome c oxidase I đến III; Cytb: gene mã hóa cytochrome b. T-- thể hiện ở bộ ba tận cùng không hoàn thiện; H, L: tương ứng là sợi nặng và sợi nhẹ.

Thành phần các loại nucleotide A, C, G, và T trong trình tự hệ gen của 6 giống lợn được liệt kê ở bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ thành phần các loại base trong trình tự hệ gen ty thể của 6 giống lợn bản địa Việt Nam.

	A (%)	C (%)	G (%)	T (%)	G+C (%)
Ỉ	34,64	26,24	13,33	25,75	39,57
Móng Cái	34,70	26,20	13,30	25,79	39,50
Mường Khương	34,68	26,19	13,31	25,81	39,50
Hạ Lang	34,67	26,20	13,32	25,78	39,55
Hương	34,65	26,22	13,352	25,78	39,57
Mường Lay	34,70	26,19	13,32	25,79	39,51

Phân tích đa dạng di truyền

Độ đa dạng di truyền đối với trình tự vùng D-loop của các giống lợn bản địa Việt Nam được sử dụng trong nghiên cứu này có 25 vị trí đa hình trên tổng số 1184 vị trí (chiều dài contig), trong đó có 5 vị trí có mặt ít nhất 2 biến thể (Ỉ với 3 vị trí, Hạ Lang và Mường Khương mỗi giống có 1 vị trí) (xem bảng 4).

Bảng 4. Các vị trí SNP trình tự vùng D-loop của 6 giống lợn bản địa Việt Nam.

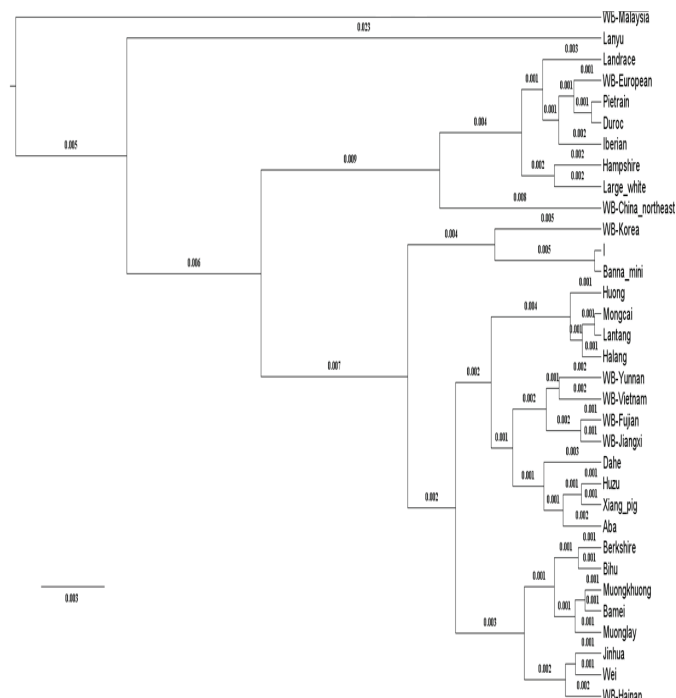
STT	Giống	Ỉ	Mường Khương	Mường Lay	Móng Cái	Hạ Lang	Hương
Vị trí							
1	24	G/A	-	-	-	-	-
2	183	T/C	-	-	-	-	-
3	215	T/C	-	-	-	-	-
4	242	T/C	T/C	T/C	T/C	-	-
5	280	-	C/T	C/T	-	-	-
6	407	-	-	-	T/C	T/C	T/C
7	454	-	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T
8	503	A/G	-	-	-	-	-
9	562	T/C	-	-	-	-	-
10	706	G	G	-	G	-	-
11	714	A	-	A	-	-	-
12	736	-	-	A	-	-	-
13	734	G/G/A	-	-	-	-	-
14	744	A	-	-	-	-	-
15	746	-	-	A	-	-	-
16	754	G/G/A	-	-	-	-	-
17	756	-	-	A	-	-	-
18	764	G/G/A	-	-	-	-	-
19	766	-	-	A	-	-	-
20	774	A	-	-	-	-	-
21	776	-	-	A	-	-	-
22	791	C	-	-	-	-	-
23	813	-	T/T/C	-	-	-	-
24	1032	A/G	-	-	-	-	-
25	1165	-	-	-	-	A/C/A	-

"T/C": vị trí có 1 biến thể thay thế nucleotide; "G/G/A": vị trí có mặt ít nhất 2 biến thể; "-": vị trí không có đa hình.

Phân tích về quan hệ phát sinh chủng loại

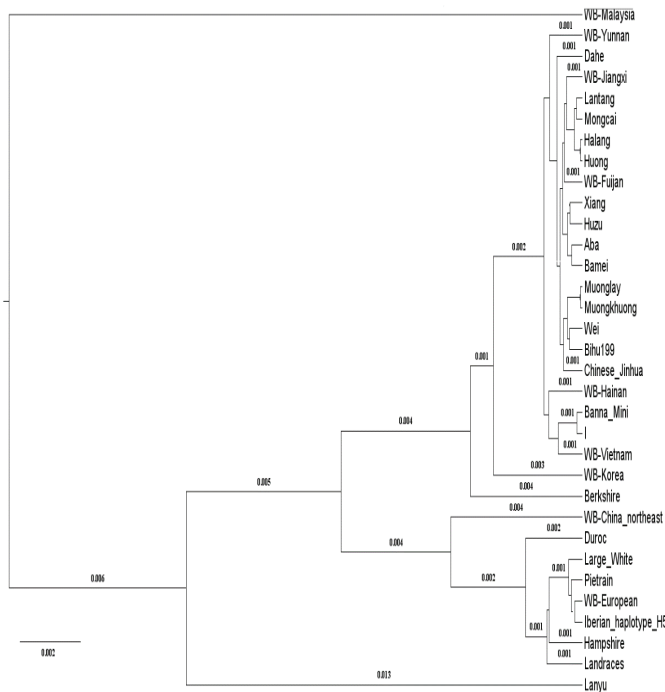
Trình tự của giống lợn hoang Malaysia (WB-Malaysia) được chọn lựa là nhóm ngoại (outgroup) bởi nó được biết đến là có sự khác biệt với nhóm lợn hoang châu Âu và châu Á, thường được sử dụng trong các nghiên cứu trước đây về phát sinh chủng loại ở lợn [10, 23]. Phân tích về phát sinh chủng loại của trình tự vùng D-loop (hình 1) và trình tự mtDNA hoàn chỉnh (hình 2) thể hiện có 3 nhánh chính riêng biệt (một nhánh châu Âu, hai nhánh châu Á). Nhánh châu Âu bao gồm các giống lợn kiểu Âu như: Berkshire, Duroc, Hampshire, Landrace, Pietrain Large, White Iberian, WB-European. Nhánh châu Á 1 gồm chủ yếu các con lợn nhà Trung Quốc, nhánh châu Á 2 tập hợp chủ yếu các giống lợn hoang châu Á. Hai giống lợn bản địa của Việt Nam là Hương và Hạ Lang cùng nhóm với lợn Lantang ở miền nam Trung Quốc. Giống Mường Lay cùng nhánh phụ với giống Bamei ở lưu vực sông Hoàng Hà, Trung Quốc.

Khoảng cách di truyền trung bình tương đối gần trong nhóm các con lợn Việt Nam là $0,0039 \pm 0,00112$ (trị số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn) so với khoảng cách di truyền trung bình chung của nhóm lợn Việt Nam với các giống lợn châu Âu, châu Á là $0,01279 \pm 0,00196$. Phân tích khoảng cách cặp giữa các giống lợn cho thấy, lợn Mường Lay có khoảng cách gần nhất với lợn Bamei (0,00104) của Trung



Hình 1. Quan hệ phát sinh chủng loại được phân tích sử dụng phương pháp suy luận Bayes bằng phần mềm BEAST v1.8.3 [21]. Cây phát sinh chủng loại được dựng lên sử dụng phần mềm Tree Annotator, thông qua việc so sánh các trình tự ở vùng kiểm soát của hệ gen ty thể của 6 giống lợn bản địa Việt Nam và các giống lợn châu Âu, châu Á.

Quốc, lợn Hương và Hạ Lang có khoảng cách di truyền bằng 0,0000 (có sự đồng nhất 100% về trình tự). Lợn Hạ Lang và Hương có khoảng cách di truyền ngắn nhất với lợn Lantang (0,00104). Khoảng cách di truyền của giống lợn Ỉ là xa nhất so với 5 giống lợn bản địa Việt Nam còn lại, cụ thể là giống lợn Ỉ có khoảng cách di truyền với Hương và Hạ Lang là 0,0081; khoảng cách với 3 giống Móng Cái, Mùong Khương và Mùong Lay là 0,00782. Quan hệ giữa các giống lợn này được thể hiện rõ trên cây phát sinh chủng loại ở phần kết quả dưới đây, khi giống lợn Ỉ nằm phân nhánh xa hơn so với các giống còn lại của Việt Nam.



Hình 2. Quan hệ phát sinh chủng loại được phân tích sử dụng phương pháp suy luận Bayes bằng phần mềm BEAST v1.8.3 [21]. Cây phát sinh chủng loại được dựng lên sử dụng phần mềm Tree Annotator, thông qua việc so sánh các trình tự ở vùng mã hóa hoàn chỉnh của hệ gen ty thể của 6 giống lợn bản địa Việt Nam và các giống lợn châu Âu, châu Á.

Bàn luận

Phân tích cấu trúc, tổ chức hệ gen ty thể của 6 giống lợn bản địa Việt Nam là Ỉ, Móng Cái, Mùong Khương, Mùong Lay, Hương và Hạ Lang cho thấy có sự tương đồng với cấu trúc hệ gen ty thể của các loài động vật có vú khác. Thành phần các loại base có trong hệ gen ty thể của cả 6 giống lợn đều theo hướng giàu A+T (trên 60%), có sự tương đồng với các nhóm lợn châu Á khác [22]. Sự phân bố của hầu hết các gen đều nằm trên chuỗi H, ngoại trừ gen ND6 và tám gen tRNA nằm trên chuỗi L.

Cả hai cây phát sinh chủng loại đều cho thấy sự tách biệt rõ ràng giữa hai nhánh lợn châu Âu và châu Á, hai nhánh đã có sự phân ly từ thời gian khá lâu (khoảng 746000 năm

trước) [24] so với thời điểm các giống lợn nhà được thuần hóa là khoảng 9000 năm trước đây. Các giống lợn bản địa Việt Nam đều có mối quan hệ về dòng mẹ gần nhau so với các giống lợn châu Á. Kết quả xác định khoảng cách di truyền và phân tích về quan hệ phát sinh chủng loại cho thấy có sự tương đồng với các nghiên cứu khác về nguồn gốc của lợn bản địa Việt Nam có liên quan đến lợn châu Á [24]. Cây phát sinh đã chỉ ra các giống lợn bản địa làm đối tượng nghiên cứu ở cùng các nhánh phụ với các giống lợn Nam Trung Quốc và lưu vực sông Hoàng Hà với khoảng cách di truyền tương đối gần. Điều này có thể đưa ra một nhận định tương đối vững chắc về nguồn gốc của 6 giống lợn bản địa Việt Nam là bắt nguồn từ lợn châu Á, có thể từ lợn Trung Quốc. Lợn Móng Cái, Hương và Hạ Lang nằm cùng một nhánh phụ với khoảng cách di truyền gần, điều này phù hợp với sự tương đồng về đặc điểm phân bố địa lý và đặc điểm về hình thái học. Lợn Mùong Lay và Mùong Khương ở các nhánh chị em có khoảng cách di truyền rất gần (0,0005). Giống lợn Ỉ có khoảng cách xa nhất với các giống lợn bản địa Việt Nam còn lại và có khoảng cách di truyền gần nhất với lợn Banamini. Hai giống lợn bản địa Hương và Hạ Lang cùng nhóm với lợn Lantang ở miền nam Trung Quốc. Giống Mùong Lay cùng nhánh phụ với giống Bamei ở lưu vực sông Hoàng Hà, Trung Quốc. Như dự đoán, có khoảng cách lớn giữa lợn Việt Nam - Trung Quốc với nhóm lợn châu Âu tương đồng với sự phân bố các giống theo vùng địa lý. Nhóm lợn bản địa Việt Nam có mối quan hệ khá gần với các nhóm lợn Trung Quốc, điều này đưa tới một giả thiết về sự di cư gần liền với các hoạt động giao thương của hai nước có chung đường biên giới với lịch sử lâu đời.

Hai giống bản địa của tỉnh Cao Bằng là Hạ Lang và Hương có độ tương đồng về trình tự D-loop là 100%, phù hợp với một số đặc điểm tương đồng giữa hai giống lợn về hình thái, bên cạnh đó đã có một số tài liệu đề cập đến nguồn gốc gần gũi hoặc có chung nguồn gốc của hai giống lợn này [25, 26]. Thông qua phân tích phát sinh chủng loại có thể nhận định rằng hai giống Hạ Lang và Hương có chung nguồn gốc tổ tiên, phân ly ở cùng một thời điểm tiến hóa. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu sâu hơn về tiến hóa, có thể sử dụng các chỉ thị di truyền để làm sáng tỏ luận điểm trên.

Kết luận

Kết quả nghiên cứu xác định dữ liệu hệ gen ty thể hoàn chỉnh và phân tích về quan hệ phát sinh chủng loại của 6 giống lợn là Ỉ, Móng Cái, Mùong Khương, Mùong Lay, Hương và Hạ Lang là nguồn cơ sở dữ liệu quan trọng trong các nghiên cứu về phát sinh chủng loại, tiến hóa phân tử, các nghiên cứu khác nhằm nhận diện, đánh giá và sử dụng giống lợn bản địa Việt Nam, từ đó đóng góp một cách hiệu quả cho việc bảo tồn và sử dụng nguồn gen này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2005), *Danh mục nguồn gen vật nuôi quý hiếm cần bảo tồn*, Quyết định số 88/2005/QĐ-BNN ngày 27/12/2005.
- [2] T.Q. Dang Nguyen, N.K. Tich, B.X. Nguyen, M. Ozawa, K. Kikuchi, N. Manabe, J. Ratky, Y. Kanai, T. Nagai (2010), "Introduction of various vietnamese indigenous pig breeds and their conservation by using assisted reproductive techniques", *Journal of Reproduction and Development*, **56**, pp.5-31.
- [3] B.M. Epstein (1986), "Pig", *Evolution of Domesticated Animals*, John Wiley & Sons, Incorporated, pp.145-162.
- [4] D.R. Wolstenholme (1992), "Animal mitochondrial DNA: structure and evolution", *International Review of Cytology*, **141**, pp.173-216.
- [5] W.M. Brown, M.Jr. George, A.C. Wilson (1979), "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, pp.1967-1971.
- [6] J.C. Avise (1993), "Molecular Markers, Natural History and Evolution", *Chapman and Hall, New York*,
- [7] P.J. Piper, H. Matsumura, D. Bulbeck (2017), "New perspectives in Southeast Asian and Pacific prehistory", *Acton ACT: ANU Press*, <http://press-files.anu.edu.au/downloads/press/n2320/pdf/book.pdf?referer=2320>.
- [8] H. Hongo, N. Ishiguro, T. Watanobe, N. Shigehara, T. Anezaki, V.T. Long, D.V. Binh, N.T. Tien, N.H. Nam (2002), "Variation in mitochondrial DNA of Vietnamese pigs: relationships with Asian domestic pigs and Ryukyu wild boars", *Zoological Science*, **19**, pp.1329-1335.
- [9] N. Ishiguro, M. Sasaki, M. Iwasa, N. Shigehara, H. Hongo, T. Anezaki, V.T. Long, D.T.B. Lan, P.T. Long (2008), "mtDNA variation in Vietnamese pigs, with particular emphasis on the genetic relationship between wild boars from Vietnam and the Ryukyu Islands", *Mammal Study*, **33**, pp.51-58.
- [10] G. Yu, H. Xiang, J. Wang, X. Zhao (2013), "The phylogenetic status of typical Chinese native pigs: analyzed by Asian and European pig mitochondrial genome sequences", *Animal Science and Biotechnology*, **4**, pp.4-9.
- [11] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson (1977), "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **74**, pp.5463-5467.
- [12] J. Hein, J. Stovlbaek (1996), "Combined DNA and protein alignment", *Methods in Enzymology*, **266**, pp.402-418.
- [13] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets", *Molecular Biology and Evolution*, **33**, pp.1870-1874.
- [14] M. Bernt, A. Donath, F. Jühling, F. Externbrink, C. Florentz, G. Fritzsch, J. Pütz, M. Middendorf, P.F. Stadler (2013), "MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **69**, pp.313-319.
- [15] T. Seemann (2014), "Prokka: rapid prokaryotic genome annotation", *Bioinformatics*, **30**, pp.2068-2069.
- [16] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research*, **25**, pp.3389-3402.
- [17] D.A. Benson, M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, E.W. Sayers (2013), "GenBank", *Nucleic Acids Research*, **41**, pp.D36-D42.
- [18] J. Rozas, A. Ferrer-Mata, J.C. Sanchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins, A. Sanchez-Gracia (2017), "DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets", *Molecular Biology and Evolution*, **34**, pp.3299-3302.
- [19] M. Hasegawa, H. Kishino, T.A. Yano (1985), "Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA", *Journal of Molecular Evolution*, **22**, pp.160-174.
- [20] J.P. Huelsenbeck, F. Ronquist (2001), "MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees", *Bioinformatics*, **17**, pp.754-755.
- [21] A.J. Drummond, M.A. Suchard, D. Xie, A. Rambaut (2012), "Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7", *Molecular Biology and Evolution*, **29**, pp.1969-1973.
- [22] L.Y. Wang, Y.L. Chai, H.M. Ma (2016), "The complete sequence of the mitochondrial genome of Duroc pig (Sus Scrofa)", *Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, **27**, pp.3-4.
- [23] G.S. Wu, Y.G. Yao, K.X. Qu, Z.L. Ding, H. Li, M.G. Palanichamy, Z.Y. Duan, N. Li, Y.S. Chen, Y.P. Zhang (2007), "Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia", *Genome Biology*, **8**, pp.1-12.
- [24] E. Giuffra, J.M. Kijas, V. Amarger, O. Carlborg, J.T. Jeon, L. Andersson (2000), "The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression", *Genetics*, **154**, pp.1785-1791.
- [25] Đ.T. Năm (2005), *Nuôi thử nghiệm giống lợn Hương quý hiếm của Trung Quốc tại Cao Bằng*, <http://khcncaobang.gov.vn>.
- [26] Bộ Khoa học và Công nghệ (2016), *Quyết định số 1011/QĐ-BKHCN ngày 4/5/2016 về việc phê duyệt danh mục đặt hàng nhiệm vụ quý gen cấp quốc gia xét giao trực tiếp bắt đầu thực hiện từ năm 2016*, <http://thuvienphapluat.vn>.

Chọn tạo các dòng ngô kháng bệnh mốc hồng bằng chỉ thị phân tử SSR

Vương Huy Minh^{1*}, Ngô Thị Thùy Linh², Hồ Thị Hương²,
Nguyễn Văn Cảnh¹, Lê Thị Bích Thủy²

¹Viện Nghiên cứu ngô

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 2/4/2018; ngày chuyển phân biên 4/4/2018; ngày nhận phân biên 2/5/2018; ngày chấp nhận đăng 11/5/2018

Tóm tắt:

Bệnh mốc hồng là một trong những bệnh gây tổn thất lớn cho sản xuất ngô trên thế giới nói chung, Việt Nam nói riêng. Kết quả chọn giống kháng bệnh theo phương pháp truyền thống còn hạn chế do hiệu quả chuyển các gen kháng bệnh vào con lai còn khó khăn và tốn nhiều thời gian. Vì vậy, việc ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống ngô kháng bệnh mốc hồng là phương pháp khả thi để kiểm soát dịch bệnh. Trong các nghiên cứu trước đây, qua phân tích SSR và đánh giá khả năng kháng bệnh của tập đoàn ngô đã xác định được sự liên kết của 6 chỉ thị SSR (Umc1025, Dupssr34, Nc030, SSR93, Umc1489 và Umc1511) với tính trạng kháng bệnh mốc hồng. Trong bài báo này, các tác giả sử dụng 6 chỉ thị để đánh giá trên quần thể phân ly F5 và quần thể lai ngược BC5 để chọn các dòng ngô triển vọng kháng bệnh mốc hồng. Kết quả chọn được 11 dòng có chỉ thị liên kết với tính trạng kháng bệnh mốc hồng, trong đó 3 dòng có 1 chỉ thị, 5 dòng có 2 chỉ thị, 1 dòng có 3 chỉ thị và 2 dòng có 4 chỉ thị liên kết; 8 dòng (F5.5, F5.12, F5.18, F5.22, BC5.8, BC5.9, BC5.21 và BC5.22) có ít nhất 2 chỉ thị liên kết với tính trạng kháng bệnh mốc hồng được lựa chọn cho chương trình lai tạo giống; các tổ hợp lai (THL) THL5, THL25, THL6 và THL12 có ít nhất 3 chỉ thị liên kết được lựa chọn cho các thử nghiệm trong sản xuất.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử, kháng bệnh, mốc hồng, ngô, SSR.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Bệnh mốc hồng là bệnh phổ biến ở tất cả các vùng trồng ngô của Việt Nam và nhiều nước trên thế giới, gây tổn thất đáng kể, gây độc cho người và gia súc. Việc tạo ra các giống ngô có năng suất cao, phẩm chất tốt, có khả năng chống chịu với các điều kiện khí hậu khắc nghiệt, sâu bệnh hại... đang được các nhà khoa học quan tâm.

Nhiều nhà chọn giống đã áp dụng phương pháp chọn lọc các dòng kháng bệnh từ quần thể ngô bị nhiễm bệnh tự nhiên ở một số vùng. Tuy nhiên, trên thực tế rất ít vùng bị nhiễm bệnh đồng đều, vì vậy việc chọn lọc kém hiệu quả và khó thành công [1]. Chính vì vậy, nhiều nhà chọn giống sử dụng phương pháp lấy nhiễm nhân tạo [2] để chọn giống ngô kháng bệnh mốc hồng và chủ yếu tập trung vào tính trạng hai loại nấm chính là *F. graminearum* hoặc *F. verticillioides* (*F. moniliforme* J. Sheld). Tuy nhiên, lấy nhiễm nhân tạo đòi hỏi nhiều thời gian và tốn kém. Phương pháp tạo ngô chuyển gen kháng bệnh mốc hồng cũng đã được khuyến

cáo, nhưng hiện nay chưa có được gen kháng để chuyển [1].

Sử dụng chỉ thị phân tử để xác định các QTL/gen và ứng dụng cho chọn giống kháng bệnh mốc hồng là một trong các phương pháp đầy triển vọng đã được đưa ra [3, 4]. Nhiều QTL đã được xác định, tuy nhiên một số QTL vẫn ảnh hưởng ít tới kiểu hình.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân tích quần thể phân ly F5 và quần thể lai trở lại BC5F1 với 6 chỉ thị liên kết chặt với tính trạng kháng bệnh mốc hồng đã nhận được từ các nghiên cứu trước [5-10]. Sau đó sử dụng các dòng được chọn để tạo THL và phối hợp với kết quả đánh giá nông sinh học để chọn các dòng/giống ngô lai có năng suất cao, có khả năng kháng bệnh mốc hồng.

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

Gồm 8 dòng ngô F5, 10 dòng ngô BC5 và 32 THL triển vọng (bảng 1 và 2).

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

Selecting inbred maize lines for fusarium ear rot disease resistance using SSR markers

Huy Minh Vuong^{1*}, Thi Thuy Linh Ngo²,
Thi Huong Ho², Van Canh Nguyen¹, Thi Bich Thuy Le²

¹Maize Research Institute, VAAS

²Institute of Biotechnology, VAST

Received 2 April 2018; accepted 11 May 2018

Abstract:

Fusarium ear rot is considered as one of the major diseases leading to significant yield loss in maize in Vietnam and all over the world. Breeding maize varieties for resistance to ear rot caused by Fusarium with the traditional procedures is not really effective because of very time-consuming and great efforts in transferring resistant genes into promising hybrids. Therefore, applying molecular markers in breeding and developing maize varieties resistant to Fusarium would be more feasible. Up to now, through the application of SSR markers and evaluation of resistance among maize germplasm, 6 simple sequence repeat (SSR) markers (Umc1025, Dupssr34, Nc030, SSR93, Umc1489, and Umc1511) linked to Fusarium ear rot genes in maize plants have been identified. In this study, 6 SSR markers were used in F5 and BC5 maize populations to select promising inbred lines resistant to Fusarium ear rot. The result showed that 11 lines with SSR markers responsible for resistance to Fusarium ear rot were found, including 3 lines with 1 marker, 5 lines with 3 markers, and 2 lines with 4 markers. 8 lines (F5.5, F5.12, F5.18, F5.22, BC5.8, BC5.9, BC5.21, and BC5.22) with at least 2 markers were selected for a maize breeding program; hybrid combinations THL5, THL25, THL6 and THL12 of at least 3 markers linked with the resistance to Fusarium ear rot were selected for further development in production.

Keywords: Fusarium ear rot, maize, molecular marker, resistant, SSR.

Classification number: 4.6

Bảng 1. Các dòng phục vụ thí nghiệm.

TT	Tên dòng	TT	Tên dòng
1	F5.1	10	BC5.3
2	F5.2	11	BC5.4
3	F5.5	12	BC5.5
4	F5.10	13	BC5.8
5	F5.12	14	BC5.9
6	F5.13	15	BC5.15
7	F5.18	16	BC5.21
8	F5.22	17	BC5.22
9	BC5.1	18	BC5.25

Bảng 2. Các THL tham gia thí nghiệm.

TT	Ký hiệu trong thí nghiệm chỉ thị phân tử	Nguồn	TT	Ký hiệu trong thí nghiệm chỉ thị phân tử	Nguồn
1	THL1	H665 x H60C	17	THL17	BC4.15 x H07
2	THL2	F4.12 x H411	18	THL18	BC4.15 x H665
3	THL3	F4.12 x H171	19	THL19	BC4.25 x H665
4	THL4	F4.12 x H665	20	THL20	BC4.25 x H171
5	THL5	BC4.8 x H411	21	THL21	BC4.15 x H411
6	THL6	F4.22 x H665	22	THL22	BC4.4 x H411
7	THL7	BC4.21 x H411	23	THL23	BC4.4 x H665
8	THL8	F4.1 x H411	24	THL24	BC4.22 x H665
9	THL9	F4.2 x H665	25	THL25	BC4.8 x H171
10	THL10	F4.5 x H171	26	THL26	BC4.8 x H07
11	THL11	F4.13 x H665	27	THL27	F4.22 x H411
12	THL12	F4.18 x H171	28	THL28	BC4.22 x H411
13	THL13	BC4.1 x H665	29	THL29	BC4.22 x H171
14	THL14	BC4.3 x H171	30	THL30	BC4.21 x H07
15	THL15	BC4.3 x H665	31	THL31	BC4.21 x H171
16	THL16	BC4.15 x H171	32	THL32	BC4.22 x H665

Sáu cặp mỗi SSR đã được xác định trong nghiên cứu trước là có liên kết với tính trạng kháng bệnh mốc hồng được đặt mua từ Hãng Macrogen (bảng 3).

Bảng 3. Trình tự các môi SSR.

TT	Tên môi	Trình tự nucleotide của môi xuôi (5'-3')	Trình tự nucleotide của môi ngược (5'-3')
1	Umc1025	CTCTTCGATCTTTAAGAGAG	ACACGAGGCACTGGTACTAAC
2	Nc030	CCCCTTGCTTCTTCTCTCC	CGATTAGATTGGGGTGCG
3	Dupssr34	TCAGTGTCTTCATTGTAACGA	ATAAACATCTTGCCAGCAA
4	SSR93	CGCCGTACAGACTGCTATGA	CACATGCTACGACTGCGATG
5	Umc1489	TGTGACACCATCAATCAAAGGG	CAAAACCCAAATCATCACCACC
6	Umc1511	ACCAAATAGGAGAGAGGGTTCT	CTCTCTGTGGTCTTTATTAACTC

Phương pháp

Tách ADN tổng số: ADN tổng số được tách từ các mẫu lá theo phương pháp của Saghai Maroof và cs (1984) có cải tiến cho phù hợp với việc tách chiết ADN tổng số của lá ngô.

Phương pháp PCR với các môi SSR: Được thực hiện trên máy PCR PTC-100 (MJ Research Inc, Mỹ); phản ứng được thực hiện theo chương trình: 94°C trong 5 phút, 40 chu kỳ lặp lại với 3 bước chính: (biến tính ADN khuôn 1 phút ở 94°C, gắn mỗi 30 giây ở nhiệt độ 52-56°C theo từng môi và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút).

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 5%.

Đánh giá đặc điểm nông sinh học theo Quy chuẩn Việt Nam QCVN 01- 56:2011/BNNPTNT [11].

Kết quả và thảo luận

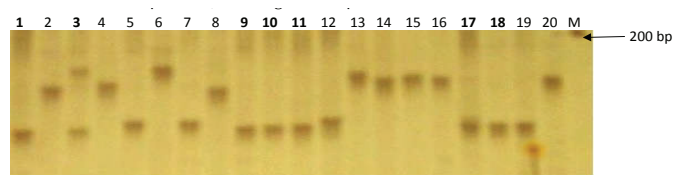
Phân tích 18 dòng ngô F5 với 6 chỉ thị SSR chọn lọc

Kết quả đánh giá phân tử (bảng 4) cho thấy, các dòng được đánh giá bằng 6 chỉ thị SSR liên kết với tính kháng bệnh mốc hồng là SSR93, Nc030, Dupssr34, Umc1489, Umc1511 và Umc1025. Kết quả đánh giá cho thấy, có 11 dòng có chỉ thị liên kết với tính kháng bệnh mốc hồng, trong đó có 3 dòng có 1 chỉ thị, 5 dòng có 2 chỉ thị, 1 dòng có 3 chỉ thị và 2 dòng có 4 chỉ thị liên kết. Như vậy có thể lựa chọn 8 dòng (F5.5, F5.12, F5.18, F5.22, BC5.8, BC5.9, BC5.21 và BC5.22) có ít nhất 2 chỉ thị liên kết với tính kháng bệnh mốc hồng. Có 5 dòng liên kết với chỉ thị SSR93, 5 dòng liên kết với chỉ thị Nc030, 2 dòng liên kết với chỉ thị Dupssr34, 2 dòng liên kết với chỉ thị Umc1489, 4 dòng liên kết với chỉ thị Umc1511 và 6 dòng liên kết với chỉ thị Umc1025.

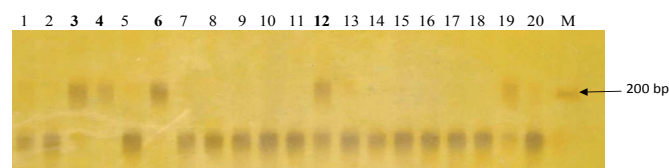
Bảng 4. Chỉ thị liên kết với tính kháng bệnh mốc hồng ở các dòng F5, BC5 (2017).

TT	Tên dòng	Chỉ thị liên kết với tính trạng kháng mốc hồng						Tổng
		SSR93	Nc030	Dupssr34	Umc1489	Umc1511	Umc1025	
1	F5.1	0	0	0	0	0	0	0
2	F5.2	0	0	0	0	0	0	0
3	F5.5	0	1	1	0	0	0	2
4	F5.10	0	0	0	0	0	0	0
5	F5.12	1	0	1	0	1	1	4
6	F5.13	0	0	0	0	0	0	0
7	F5.18	1	0	0	0	0	1	2
8	F5.22	1	1	0	0	1	0	3
9	BC5.1	0	0	0	0	0	1	1
10	BC5.3	0	0	0	0	0	0	0
11	BC5.4	0	0	0	1	0	0	1
12	BC5.5	1	0	0	0	0	0	1
13	BC5.8	0	1	0	1	0	0	2
14	BC5.9	0	0	0	0	1	1	2
15	BC5.15	0	0	0	0	0	0	0
16	BC5.21	0	1	0	0	0	1	2
17	BC5.22	1	1	0	0	1	1	4
18	BC5.25	0	0	0	0	0	0	0
Tổng		5	5	2	2	4	6	

Ghi chú: 1: Có chỉ thị liên kết; 0: Không có chỉ thị liên kết.



Hình 1. Ảnh điện di gel polyacrylamide sản phẩm PCR với cặp môi SSR93 của 18 dòng ngô triển vọng. M: Marker 100 bp (Biolabs); 19: H665 (đối chứng kháng); 20: H99 (đối chứng nhiễm).



Hình 2. Ảnh điện di gel polyacrylamide sản phẩm PCR với cặp môi Umc1025 của 18 dòng ngô triển vọng. M: Marker 100 bp (Biolabs); 19: H665 (đối chứng kháng); 20: H99 (đối chứng nhiễm).

Trên hình 1 và 2 có thể nhận thấy, các dòng 3, 4, 6, 12 có băng giống với cây kháng, các dòng này có thể có khả năng kháng bệnh mốc hồng.

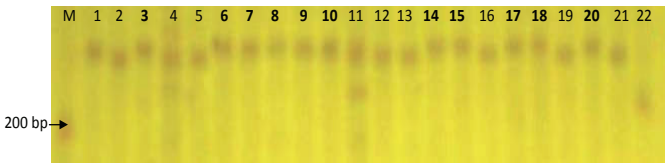
Phân tích 32 THL triển vọng với 6 chỉ thị SSR chọn lọc

Kết quả đánh giá cho thấy, trong số 32 THL chỉ có 6 THL không có chỉ thị liên kết, các THL còn lại đều có ít nhất 1 chỉ thị liên kết với tính kháng bệnh mốc hồng. Trong đó có 2 THL (5 và 25) có 3 chỉ thị liên kết, đặc biệt THL6 và THL12 có tới 4 chỉ thị liên kết. Trong 6 chỉ thị sử dụng thì SSR93 xác định được 11 dòng, Nc030 xác định được 12

dòng, Dupssr34 xác định được 2 dòng, Umc1489 liên kết với 6 dòng, Umc1511 liên kết với 6 dòng và Umc1025 xác định được 8 dòng (bảng 5).

Bảng 5. Kết quả đánh giá chỉ thị phân tử.

TT	THL	Chỉ thị liên kết với tính trạng kháng mốc hồng						Tổng
		SSR93	Ne030	Dupssr34	Umc1489	Umc1511	Umc1025	
1	THL1	1	1	0	0	0	0	2
2	THL2	0	0	0	1	0	0	1
3	THL3	0	1	0	0	0	0	1
4	THL4	1	0	0	1	0	0	2
5	THL5	1	1	0	0	1	0	3
6	THL6	1	1	0	0	1	1	4
7	THL7	1	0	0	0	0	1	2
8	THL8	0	0	0	0	1	1	2
9	THL9	0	0	0	0	0	0	0
10	THL10	0	0	0	1	0	0	1
11	THL11	0	1	0	0	0	1	2
12	THL12	1	1	1	0	0	1	4
13	THL13	1	1	0	0	0	0	2
14	THL14	0	0	0	0	1	0	1
15	THL15	1	0	0	0	0	0	1
16	THL16	0	0	0	0	0	1	1
17	THL17	0	0	0	0	0	0	0
18	THL18	1	0	0	1	0	0	2
19	THL19	0	1	0	0	0	1	2
20	THL20	0	1	0	0	0	0	1
21	THL21	0	0	0	0	1	1	2
22	THL22	0	0	0	0	0	0	0
23	THL23	0	0	0	0	0	0	0
24	THL24	0	1	0	0	1	0	2
25	THL25	0	1	1	1	0	0	3
26	THL26	1	0	0	0	0	0	1
27	THL27	1	0	0	0	0	0	1
28	THL28	0	0	0	0	0	0	0
29	THL29	0	1	0	0	0	0	1
30	THL30	0	0	0	0	0	0	0
31	THL31	0	0	0	1	0	0	1
32	THL32	0	0	0	0	0	0	0
Tổng		11	12	2	6	6	8	



Hình 3. Ảnh điện di gel polyacrylamide sản phẩm PCR với cặp mồi SSR93 của 20 dòng ngô triển vọng. M: Marker 100 bp (Biolabs); 21: H665 (đối chứng kháng); 22: H99 (đối chứng nhiễm); từ 3-22: THL1 đến THL20.

Kết quả hình 3 cho thấy, có 11 THL có chỉ thị liên kết với tính kháng bệnh mốc hồng (các THL có tên chữ đậm có băng giống với cây kháng), các THL này có thể có khả năng kháng bệnh mốc hồng.

Kết quả đánh giá các đặc điểm nông sinh học của 8 THL triển vọng

Từ kết quả các thí nghiệm trên, 8 THL gồm VN116 (THL1), H156 (THL6), H162 (THL4), H115 (THL27), H161 (THL2), H117 (THL7), H118 (THL28), H119 (THL29) được lựa chọn tham gia các thử nghiệm tại các vùng trồng ngô lớn (Thanh Hóa, Hòa Bình...) trong vụ hè thu 2017. Kết quả thử nghiệm cho thấy, các giống có thời gian sinh trưởng trung bình trong cả 2 vùng thử nghiệm (103-106 ngày) tương đương với các đối chứng PAC339 và NK4300; hầu hết các THL đều cao cây hơn PAC339, tương đương và cao hơn NK4300 (bảng 6).

Bảng 6. Thời gian sinh trưởng và hình thái cây.

TT	THL	TGST (ngày)		Chiều cao cây (cm)	
		Thanh Hóa	Hòa Bình	Thanh Hóa	Hòa Bình
1	VN116	105	103	242,50	250,50
2	H161	106	104	277,54	270,50
3	H162	105	103	252,28	225,25
4	H156	105	103	255,3	251,35
5	H115	104	102	245,2	240,45
6	H117	105	102	261,7	270,30
7	H118	105	105	270,6	264,65
8	H119	106	103	256,5	262,24
9	NK4300		104		245,46
10	PAC339	104		235,25	

Tại cả 2 điểm thử nghiệm, các giống đều chống đổ rất tốt; phần lớn các THL bị nhiễm bệnh đốm lá ở mức độ trung bình (điểm 2), chỉ có THL H156 và H118 bị nhiễm nặng hơn (điểm 3). Trong điều kiện tự nhiên, 7/9 THL không thấy xuất hiện dấu hiệu bệnh mốc hồng trên bắp và hạt, chỉ có THL H156, H118 và NK4300 có biểu hiện nấm mốc xuất hiện trên bắp và hạt ở mức độ thấp (bảng 7).

Bảng 7. Mức độ chống chịu đồng ruộng của các THL.

TT	THL	Đổ (điểm)		Bệnh đốm lá (điểm)		Mốc hồng trên bắp, hạt (điểm)	
		Hòa Bình	Thanh Hóa	Hòa Bình	Thanh Hóa	Hòa Bình	Thanh Hóa
1	VN116	1	1	2	2	1	1
2	H161	1	1	2	2	1	1
3	H162	1	1	2	2	1	1
4	H156	1	1	3	3	2	2
5	H115	1	1	2	2	1	1
6	H117	1	1	3	2	1	1
7	H118	1	1	3	3	2	2
8	H119	1	1	3	2	1	1
9	NK4300	1		3		2	
10	PAC339		1		2		2

Tại Hòa Bình, bắp của các THL có xu hướng dài hơn tại Thanh Hóa (17,2-19,4 cm so với 16,5-18,5 cm), tương đương với các đối chứng tại các điểm thử nghiệm; các THL có năng suất từ 85,25 đến 100,94 tạ/ha, cao hơn tại điểm thực nghiệm Thanh Hóa (72,6-92,6 tạ/ha). Trong cả 2 điểm thực nghiệm THL VN116 và H115 đều có năng suất cao nhất trong các giống thử nghiệm (bảng 8). Như vậy, qua thử nghiệm tại 2 điểm đã xác định được 6 THL là VN116, H162, H115, H161, H117, H119 có năng suất từ 82,46-95,67 tạ/ha có thể đưa vào chương trình khảo nghiệm để lựa chọn các giống ổn định nhất cho sản xuất tại các tỉnh phía Bắc, đặc biệt tại các vùng thường xuất hiện bệnh mốc hồng như Thanh Hoá, Sơn La, Hòa Bình...

Bảng 8. Năng suất của các THL tại 2 điểm thực nghiệm

TT	THL	Chiều dài bắp (cm)		Tỷ lệ hạt/bắp (%)		Năng suất (tạ/ha)		
		Hòa Bình	Thanh Hóa	Hòa Bình	Thanh Hóa	Hòa Bình	Thanh Hóa	Trung Bình
1	VN116	19,4	18,5	80,2	81,2	100,94	90,4	95,67
2	H161	18,6	17,6	79,8	77,8	93,32	81,4	87,36
3	H162	18,1	16,8	79,6	79,6	95,52	78,5	87,01
4	H156	17,2	16,5	77,2	78,1	85,25	72,6	78,93
5	H115	18,8	18,2	81,6	81,4	98,58	92,6	95,59
6	H117	17,3	16,8	79,4	78,5	85,52	79,4	82,46
7	H118	17,2	17,4	79,5	79,2	86,71	74,5	80,61
8	H119	18,5	17,3	79,7	79,4	92,33	78,6	85,47
9	NK4300	18,6		80,7		98,31		98,31
10	PAC339		17,5		80,5		82,3	82,30
	LSD _{0,05}					8,2	6,2	



Hình 4. Thử nghiệm các THL tại Hòa Bình (trái) và Thanh hóa (phải).

Kết luận

Đánh giá các dòng F5 và BC5F1 với các chỉ thị liên kết với tính kháng bệnh, lựa chọn được 8 dòng (F5.5, F5.12, F5.18, F5.22, BC5.8, BC5.9, BC5.21, BC5.22) và 8 THL

VN116 (H665 x H60C), H156 (F4.22 x H665), H162 (F4.12 x H665), H115 (F4.22 x H411), H161 (F4.12 x H411), H117 (BC4.21 x H411), H118 (BC4.22 x H411), H119 (BC4.22 x H171) có ít nhất 2 chỉ thị liên kết với tính kháng bệnh mốc hồng. Kết quả khảo sát, đánh giá 8 THL lựa chọn từ thí nghiệm phân tử đã xác định được 6 THL có năng suất cao hơn 80 tạ/ha là VN116, H162, H115, H161, H117 và H119 có thể đưa vào chương trình khảo nghiệm để lựa chọn các giống ổn định nhất cho sản xuất tại các tỉnh phía Bắc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Mesterhazy, et al. (2012), *Environmental interactions in phenotyping and resistance evaluation ways to neutralize them*, The global Fusarium initiative for international collaboration - strategic planning workshop held at CIMMYT.
- [2] M. Löffler, et al. (2010), "Population parameters for resistance to Fusarium graminearum and Fusarium verticillioides ear rot among large sets of early, mid-late and late maturing European maize (*Zea mays* L.) inbred lines", *Theor. Appl. Genet.*, **120**, pp.1053-1062.
- [3] M.D. Robertson, et al. (2005), "Insulinsemitizing effects of dietary resistance starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism", *Am. J. Clin. Nutr.*, **82**, pp.559-567.
- [4] Robertson Hoyt (2007), *Genomic resources for analyzing Fusarium and aspergillus - Maize interaction*.
- [5] X. Chen, et al. (2012), "Fusarium graminearum exploits ethylene signalling to colonize dicotyledonous and monocotyledonous plant", *New phytol.*, **182**, pp.975-983.
- [6] J.Q. Ding, et al. (2008), "QTL mapping of resistance to Fusarium ear rot using a RIL Population in maize", *Mol. Breed.*, **22**, pp.395-403.
- [7] Noura Salah, et al. (2016), "Identification of new molecular markers linked to maize stalk rot disease resistance (Fusarium moniliforme) in maize", *Plant Omics Journal*, **9(1)**, pp.12-18.
- [8] L.A. Robertson Hoyt, et al. (2006), "QTL mapping for Fusarium ear rot and fumonisin contamination resistances in two maize population", *Crop Science*, **46**, pp.1734-1743.
- [9] L.A. Robertson Hoyt, et al. (2007), "Relationships among resistances to fusarium and aspergillus ear rot and contamination by fumonisin and aflatoxin in maize", *Phytopathology*, **97**, pp.311-317.
- [10] K. Xiang, et al. (2010), *Relationship among kernel drydown rates environmental factors and resistance to gibberella ear rot, fusarium ear rot and common smut of corn*, Joint annual meeting of the Canadian phytopathological society and the pacific division of the american phytopathological society.
- [11] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2011), *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống ngô*.

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 7 - July 2018

Nghiên cứu một số đặc điểm của vi khuẩn lao ở bệnh nhân lao phổi mới và lao phổi tái trị được chỉ định điều trị bằng thuốc chống lao hàng một.
Lê Thị Luyến, Trịnh Thị Hiền, Nguyễn Văn Hưng, Phạm Thị Thu Huyền, Đặng Văn Khoa, Giang Mạnh Chiến, Phạm Hữu Thường, Nguyễn Phương Hoàng

Áp dụng phương pháp sinh học phân tử trong phát hiện sớm người mắc bệnh Wilson chưa có triệu chứng lâm sàng và mang gen bệnh.
Nguyễn Thị Mai Hương, Nguyễn Phạm Anh Hoa, Nguyễn Thị Phương Mai, Ngô Mạnh Tiến, Tạ Thành Văn, Phan Văn Chi, Trần Văn Khánh, Ngô Diễm Ngọc

Khảo sát sự thay đổi tần số tim và huyết áp sau nhĩ áp huyết Tâm tai trái và phải trên người bình thường khi thực hiện nghiệm pháp kích thích thụ thể lạnh.

Nguyễn Văn Huy, Nguyễn Văn Dân, Trịnh Thị Diệu Thường

Nghiên cứu xây dựng quy trình đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng.

Triệu Tiến Sang, Trần Anh Đức, Trần Văn Khoa, Nguyễn Hà Anh, Nguyễn Thị Thanh Nga, Nguyễn Thị Trang

Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Helicobacter pylori* của một số dịch chiết thảo dược Việt Nam.

Đỗ Thị Thanh Trung, Phạm Thị Vui, Nguyễn Huyền Trang, Phạm Vinh Hoa, Nguyễn Thị Thanh Thi, Phạm Thị Lương Hằng, Phạm Bảo Yên

Nghiên cứu khả năng ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây trong điều kiện *in vitro*.

Lương Hiền Minh, Huỳnh Thanh Trang, Nguyễn Đức Bách, Phí Thị Cẩm Miên

Nghiên cứu sự thích ứng của 4 giống/dòng lúa (*Oryza sativa* L.) trong điều kiện khô hạn nhân tạo giai đoạn sinh dưỡng.

Nguyễn Thị Bích Vân, Võ Công Thành

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ kết hợp nấm *Trichoderma* tới bệnh chết héo *Phytophthora* spp. trên cây dâu tây.

Nguyễn Duy Hạng, Nguyễn Trọng Hoành Phong, Lê Thị Thái Hòa, Nguyễn Tấn Mân, Lê Hữu Tư, Lê Xuân Cường, Lê Văn Toàn

Đánh giá khả năng cung cấp lân của đất áp dụng phương pháp khuếch tán qua màng trên một số vùng đất canh tác lúa tại ĐBSCL.

Vũ Văn Long, Nguyễn Hoàng Kim Nương, Châu Minh Khôi

Nghiên cứu khả năng diệt một số loài vi khuẩn và nấm của lá hẹ (*Allium tuberosum*).

Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thị Nguyễn, Trương Thị Thành Vinh, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Phan Thị Vân

Phân tích đa dạng di truyền hệ gen ty thể và nguồn gốc tiến hóa của sáu giống lợn bản địa Việt Nam.

Bùi Anh Tuấn, Nguyễn Đức Hiếu, Nghiêm Ngọc Minh, Võ Thị Bích Thủy

Chọn tạo các dòng ngô kháng bệnh mốc hồng bằng chỉ thị phân tử SSR.

Vương Huy Minh, Ngô Thị Thùy Linh, Hồ Thị Hương, Nguyễn Văn Cảnh, Lê Thị Bích Thủy

1 Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the new and re-treatment pulmonary tuberculosis patients assigned to chemotherapy by first-line anti-tuberculosis drugs.

Thi Luyen Le, Thi Hien Trinh, Van Hung Nguyen, Thi Thu Huyen Pham, Van Khoa Dang, Manh Chien Giang, Huu Thuong Pham, Phuong Hoang Nguyen

6 Applying molecular technique in early detection of Wilson asymptomatic patients and carriers.

Thi Mai Huong Nguyen, Pham Anh Hoa Nguyen, Thi Phuong Mai Nguyen, Manh Tien Ngo, Thanh Van Ta, Van Chi Phan, Van Khanh Tran, Diem Ngoc Ngo

12 Auricular acupressure effect on autonomic responses during cold pressor test in healthy volunteers.

Van Huy Nguyen, Van Dan Nguyen, Thi Dieu Thuong Trinh

17 Building a procedure for testing level of sperm DNA fragmentation.

Tien Sang Trieu, Anh Duc Tran, Van Khoa Tran, Ha Anh Nguyen, Thi Thanh Nga Nguyen, Thi Trang Nguyen

23 Evaluation of inhibitory effects of Vietnamese medicinal plant extracts on *Helicobacter pylori*.

Thi Thanh Trung Do, Thi Vui Pham, Huyen Trang Nguyen, Vinh Hoa Pham, Thi Thanh Thi Nguyen, Thi Luong Hang Pham, Bao Yen Pham

28 Study on the ability to inhibit five cancer cell lines of the moringa root extract in *in vitro* conditions.

Hien Minh Luong, Thanh Trang Huynh, Duc Bach Nguyen, Thi Cam Mien Phi

32 The adaptation of four rice (*Oryza sativa* L.) varieties/lines at the vegetative stage in drought conditions.

Thi Bich Van Nguyen, Cong Thanh Vo

38 The effect of irradiated chitosan combined with *Trichoderma* on the root rot pathogen *Phytophthora* spp. in strawberry.

Duy Hang Nguyen, Trong Hoanh Phong Nguyen, Thi Thai Hoa Le, Tan Mân Nguyen, Huu Tu Le, Xuan Cuong Le, Van Toan Le

42 Assessment of soil phosphorus supplying capacity in some rice paddy fields in the Mekong River Delta of Vietnam using deffusive gradient in thin films technique.

Van Long Vu, Hoang Kim Nuong Nguyen, Minh Khoi Chau

48 The anti-bacterial and anti-fungal effects of garlic chives (*Allium tuberosum*).

Thi My Hanh Truong, Thi Nguyen Nguyen, Thi Thanh Vinh Truong, Thi My Le Huynh, Thi Van Phan

53 Genetic diversity of mitochondrial genome and evolutionary origin of six Vietnamese indigenous pig breeds.

Anh Tuan Bui, Duc Hieu Nguyen, Ngoc Minh Nghiem, Thi Bich Thuy Vo

60 Selecting inbred maize lines for fusarium ear rot disease resistance using SSR markers.

Huy Minh Vuong, Thi Thuy Linh Ngo, Thi Huong Ho, Van Canh Nguyen, Thi Bich Thuy Le