



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 61 - Số 5 - Tháng 5 năm 2019

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

Tình trạng vi khuẩn mang gen ESBL trên người khỏe mạnh tại xã Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam

Phạm Thị Thanh Hương¹, Vũ Thanh Phương¹, Vũ Anh Thư¹, Nguyễn Quang Huy¹,
Phạm Duy Thái², Trần Huy Hoàng^{2*}

¹Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Ngày nhận bài 8/3/2019; ngày chuyển phản biện 11/3/2019; ngày nhận phản biện 8/4/2019; ngày chấp nhận đăng 15/4/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu mô tả tình trạng vi khuẩn mang gen ESBL kháng kháng sinh (KKS) nhóm betalactam phổ rộng phân lập được trên mẫu phân người khỏe mạnh tại xã Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam năm 2018. 94 mẫu cấy trên môi trường MacConkey agar có kháng sinh ceftazidime 2 µg/ml được sử dụng để tiến hành phân tích khả năng sinh trưởng của vi khuẩn kháng thuốc và tỷ lệ vi khuẩn mang gen ESBL. Kết quả cho thấy: i) tình trạng vi khuẩn phân lập từ phân người khỏe mạnh kháng thuốc là rất cao: 93/94 (99%), đồng thời mức độ KKS của vi khuẩn phân lập được cũng khác nhau và chia ra làm bốn loại; ii) tỷ lệ vi khuẩn mang gen KKS nhóm ESBL cao: cao nhất là TEM (85,1%), tiếp đến là CTX-M (71,3%) và thấp nhất là SHV (5,3%). Điều này cho thấy tình trạng vi khuẩn mang gen ESBL KKS trong cộng đồng ở Trảng An, Bình Lục, Hà Nam rất nghiêm trọng và cần được giám sát chặt chẽ. Nghiên cứu cũng chứng tỏ nguy cơ KKS tiềm ẩn ngay trong các hộ gia đình khỏe mạnh ở cộng đồng. Qua đó chỉ ra rằng, việc theo dõi tình trạng KKS trong cộng đồng tại Hà Nam cũng như tại các địa phương khác là vô cùng cần thiết nhằm bảo vệ sức khỏe con người.

Từ khóa: CTX-M, ESBL, SHV, TEM.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

Hiện nay, KKS đang là một trong những vấn đề được quan tâm hàng đầu trên thế giới. Tình trạng vi khuẩn KKS đã trở thành vấn đề nghiêm trọng đối với sức khỏe con người và với ngành y tế trên toàn cầu. Ngày càng nhiều bệnh lây nhiễm đang trở nên khó chữa, thậm chí vô phương cứu chữa, dẫn đến tỷ lệ tử vong cũng ngày càng tăng. Theo các báo cáo, hàng năm có hơn nửa triệu người chết do các bệnh truyền nhiễm có nguyên nhân là các chủng vi khuẩn KKS [1, 2]. Theo “Review on Antimicrobial Resistance” của Jim O’Neill và cộng sự xuất bản vào ngày 14/5/2015¹, có 2 lý do chính khiến KKS đang dần trở thành mối nguy với tình hình y tế cộng đồng trên thế giới. Thứ nhất, quá trình nghiên cứu phát triển thuốc, đặc biệt là thuốc kháng sinh, đang có dấu hiệu chậm lại. Thứ hai, việc sử dụng thuốc kháng sinh nói chung đang có dấu hiệu gia tăng trong vài thập kỷ gần đây. Chính việc sử dụng nhiều loại thuốc kháng sinh đặc hiệu với liều lượng cao để điều trị các bệnh do vi

khẩn gây ra đã tạo điều kiện cho chúng nâng cao khả năng kháng thuốc. Ở nhiều nước, kháng sinh có thể được mua dễ dàng mà không cần có đơn thuốc, dẫn đến việc sử dụng thuốc bừa bãi, tràn lan [3, 4]. Hơn nữa, việc sử dụng thuốc kháng sinh trên diện rộng trong nông nghiệp cũng như việc bác sĩ kê sai đơn thuốc cũng khiến tình hình KKS đang trên đà gia tăng.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về vi khuẩn đường ruột sinh ESBL khá nhiều, tuy nhiên chỉ tập trung chủ yếu ở các cơ sở điều trị trên các nhóm bệnh nhân mà chưa có nhiều nghiên cứu tại cộng đồng trên nhóm người lành khỏe mạnh. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định đặc điểm KKS của vi khuẩn sinh ESBL và tỷ lệ mang gen mã hóa ESBL phân lập được trên người lành khỏe mạnh tại xã Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên nhóm người lành khỏe mạnh đang sinh sống tại xã Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam trong năm 2018.

¹https://amr-review.org/sites/default/files/SECURING%20NEW%20DRUGS%20FOR%20FUTURE%20GENERATIONS%20FINAL%20WEB_0.pdf

*Tác giả liên hệ: Email: thh@nthe.org.vn

Prevalence of ESBL-producing bacteria on healthy people in Trang An commune, Binh Luc district, Ha Nam province

Thi Thanh Huong Pham¹, Thanh Phuong Vu¹,
Anh Thu Vu¹, Quang Huy Nguyen¹, Duy Thai Pham²,
Huy Hoang Tran^{2*}

¹University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy
of Science and Technology

²National Institute of Hygiene and Epidemiology

Received 8 March 2019; accepted 15 April 2019

Abstract:

The cross-sectional study aimed to describe the status of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing bacteria isolated from stool samples of healthy people in Trang An commune, Binh Luc district, Ha Nam province in 2018. A total of 94 samples were cultured on MacConkey agar containing 2 µg/ml ceftazidime for evaluating the growth of drug-resistant strains and the rate of bacteria carrying ESBL-encoding genes. The results showed that: (1) the proportion of ESBL-producing bacteria were found very high in the participants (99%); nevertheless, the levels of antibiotic resistance were associated with the rate of bacterial growth; (2) the TEM was the most prevalent ESBL-encoding gene (85.1%), followed by CTX-M (71.3%) and SHV (5.3%). These results exhibited that the status of ESBL-producing bacteria was very serious in the Trang An population. Therefore, it is essential to monitor the antibiotic resistance in this region as well as other regions for the long-term development strategy to prevent the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria.

Keywords: CTX-M, ESBL, SHV, TEM.

Classification number: 3.3

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang và phân tích phòng thí nghiệm.

Cỡ mẫu: 94 mẫu phân thu thập từ người khỏe mạnh tại xã Tràng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam.

Tiêu chuẩn lựa chọn thành viên tham gia nghiên cứu: là người dân khỏe mạnh, đang sinh sống tại các hộ gia đình và tự nguyện tham gia nghiên cứu. Tiêu chuẩn loại trừ là người không lấy được mẫu phân hoặc mắc phải các bệnh mạn tính.

Các kỹ thuật xét nghiệm

- Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường chọn lọc khả năng sinh ESBL: đối với từng thành viên được chọn vào nghiên cứu sẽ thu thập mẫu phân để làm xét nghiệm. Mỗi người sẽ lấy 5 g phân tại thời điểm điều tra. Các mẫu phân được bảo quản và vận chuyển theo thường quy về Phòng thí nghiệm KKS của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương trong ngày. Mẫu phân được cấy trực tiếp lên môi trường MacConkey có bổ sung ceftazidime (2 µg/ml) và ủ ở 37°C qua đêm. Các đĩa có khuẩn lạc sẽ được chọn để lưu giữ và tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

- PCR phát hiện vi khuẩn mang gen ESBL bao gồm gen TEM (TEM-F: TTTTCGTGTCGCCCTTATTCC; TEM-R: CGTTCATCCATAGTTGCCTGACTC), CTX-M (CTX-M F: CGATGTGCAGTACCAGTAA; CTX-M R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG), SHV (SHV-F: TTATCTCCCTGTTAGCCACC; SHV-R: GATTTGCTGATTCGTCGG): các chủng vi khuẩn mọc trên môi trường chọn lọc được tách chiết ADN bằng phương pháp tách nhiệt ở 95°C trong 10 phút. Sau đó, các mẫu ADN được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR để phát hiện các gen KKS.

Phân tích số liệu

Dữ liệu được lưu và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel.

Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được Hội đồng Y đức thông qua và nhận được sự chấp thuận tham gia nghiên cứu của các hộ gia đình tại xã Tràng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam.

Kết quả

Kiểu hình sinh ESBL phản ánh nguy cơ KKS trong cộng đồng

94 mẫu phân được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc khả năng sinh ESBL của vi khuẩn. Kết quả cho thấy 93 mẫu dương tính với ESBL và 1 mẫu âm tính với ESBL. Kiểu hình các mẫu dương tính với ESBL được phân làm 4 loại

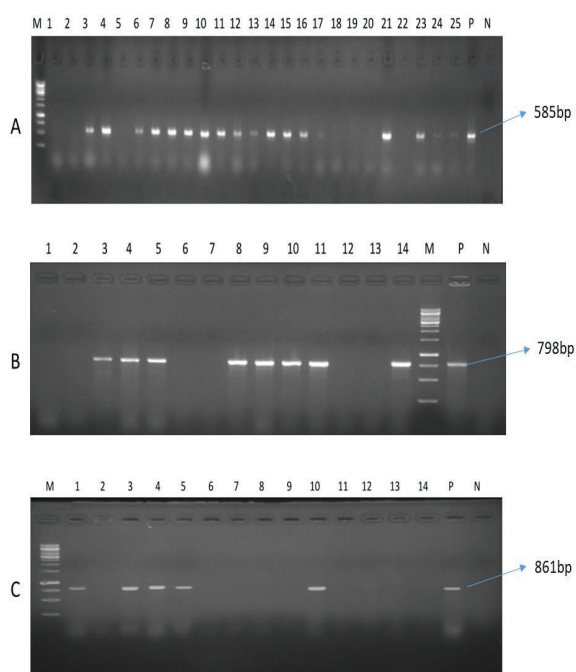
dựa theo đặc điểm sinh trưởng của khuẩn lạc vi khuẩn: loại 1 (khuẩn lạc mọc thưa thớt và yếu), loại 2 (khuẩn lạc mọc nhiều nhưng sinh trưởng yếu), loại 3 (khuẩn lạc mọc dày và sinh trưởng tốt), loại 4 (khuẩn lạc mọc rất dày và sinh trưởng mạnh). Kết quả phân bố các loại vi khuẩn dương tính ESBL được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ phân bố 4 loại kiểu hình vi khuẩn có vi khuẩn sinh ESBL phân lập từ mẫu phân trong nghiên cứu.

	Loại 1	Loại 2	Loại 3	Loại 4	Tổng
Kết quả nuôi cấy	22 (23,66%)	37 (39,78%)	25 (26,88%)	9 (9,68%)	93

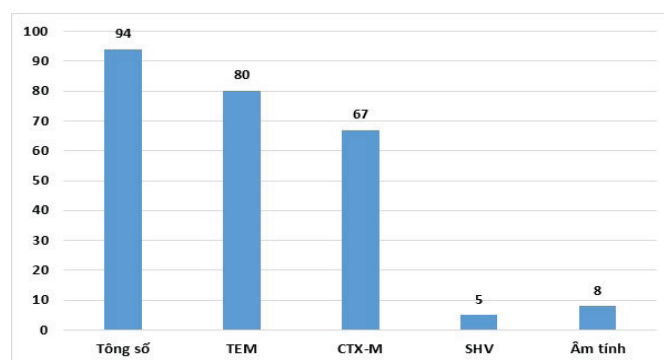
Kết quả PCR phát hiện gen ESBL KKS

Nghiên cứu tiến hành kỹ thuật PCR phát hiện gen KKS nhóm ESBL bao gồm TEM, CTX-M, SHV với 94 chủng vi khuẩn phân lập được. Kết quả PCR được thể hiện qua các hình ảnh đại diện trong hình 1.



Hình 1. (A) Kết quả PCR đại diện phát hiện gen CTX-M. (B) Kết quả PCR đại diện phát hiện gen TEM. (C) Kết quả PCR đại diện phát hiện gen SHV. M là thang chuẩn DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder); P: chứng dương; N: chứng âm.

Trong 94 chủng vi khuẩn phân lập được từ các mẫu nghiên cứu, số chủng dương tính với gen TEM là cao nhất: 80/94 chủng, chiếm 85,1% tổng số chủng. Tiếp theo là CTX-M với 67/94 chủng, tương đương 71,3%. Tỷ lệ dương tính thấp nhất là SHV với chỉ 5/94 chủng dương tính, chiếm khoảng 5,3%. Có 8 chủng vi khuẩn âm tính với cả 3 gen trên (hình 2).



Hình 2. Biểu đồ thể hiện số lượng mẫu dương tính với gen TEM, SHV, CTX-M.

Kết quả PCR cũng cho thấy tần suất xuất hiện các gen KKS trong các mẫu vi khuẩn của nghiên cứu. Có những vi khuẩn chỉ mang một trong ba gen KKS là TEM, CTX-M hoặc SHV. Tuy nhiên, có rất nhiều trường hợp vi khuẩn mang đa gen KKS, cụ thể là có tới 60 trường hợp (63,8%) phát hiện cả 2 gen KKS và 3 trường hợp phát hiện được cả 3 gen KKS. Tần suất các gen kháng xuất hiện trên các mẫu phân lập được thể hiện cụ thể trong bảng 2.

Bảng 2. Tần suất xuất hiện các gen KKS trong các mẫu phân lập.

	Đơn gen		Đa gen		Không có gen nào (%)	
	<i>CTX-M (%)</i>	<i>TEM (%)</i>	<i>Phát hiện 3 gen (%)</i>	<i>CTX-M/TEM (%)</i>		<i>SHV/TEM (%)</i>
Tần suất xuất hiện kiểu gen	6 (6,38)	17 (18,09)	3 (3,19)	58 (61,70)	2 (2,13)	8 (8,51)

Bàn luận

Kết quả sàng lọc các mẫu vi khuẩn từ phân người thu thập được trong nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ vi khuẩn sinh ESBL là rất cao (93/94 mẫu vi khuẩn phân lập được). Kết quả này chứng tỏ sự hiện diện của vi khuẩn đường ruột sinh ESBL trên mẫu phân người khỏe mạnh tại Hà Nam cao hơn nhiều so với một số nghiên cứu trước đây tại Việt Nam [5-7]. Điều này cũng cho thấy tình trạng báo động đối với vi khuẩn KKS đang lưu hành trong cộng đồng. Tỷ lệ vi khuẩn KKS cao phân lập được từ người khỏe mạnh phản ánh tình trạng sử dụng kháng sinh bừa bãi, không kiểm soát trong cộng đồng dẫn đến vi khuẩn thích ứng và kháng lại các kháng sinh phổ biến. Tuy nhiên, kết quả nuôi cấy trên môi trường chọn lọc cho thấy mức độ kháng thuốc của vi khuẩn là không đồng đều giữa các mẫu phân lập được. Cụ thể, khoảng 23,66% số mẫu mọc thưa thớt và yếu trên môi trường bổ sung kháng sinh, 39,78% số mẫu mọc nhiều nhưng sinh trưởng yếu, 26,88% số mẫu mọc nhiều và sinh trưởng tốt, chỉ có khoảng hơn 9,68% số mẫu mọc nhiều và

phát triển rất mạnh trên môi trường có kháng sinh (bảng 1). Như vậy, nếu không có sự can thiệp và quản lý tốt đối với hành vi sử dụng kháng sinh trong cộng đồng, tình trạng KKS của vi khuẩn sẽ ngày càng tăng về cả số lượng và mức độ kháng thuốc.

Kết quả PCR phát hiện gen TEM, CTX-M, SHV KKS của vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu cũng cho thấy mức độ KKS rất cao của vi khuẩn, dương tính với gen TEM là 80/94 chủng (chiếm 85,1%), CTX-M là 67/94 chủng (71,3%) và SHV là 5/94 chủng (5,3%). Tỷ lệ vi khuẩn dương tính với các kiểu gen trong nghiên cứu này cao hơn hẳn so với một nghiên cứu trước đó tại Hà Nam năm 2015 với tỷ lệ vi khuẩn mang gen TEM, CTX-M, SHV lần lượt là 47,6; 37; 1,5%. Đồng thời, kết quả phát hiện gen kháng ESBL trong nghiên cứu này cũng cho tỷ lệ tương đồng với nghiên cứu của Karen Bush và cs hay nghiên cứu của Panjarat Suntarasamit [8, 9]. Điều này cho thấy tình trạng vi khuẩn KKS trong cộng đồng ngày càng gia tăng. Không những thế, vi khuẩn mang gen ESBL lưu hành trong cộng đồng cũng ngày càng đa dạng về kiểu gen kháng thuốc, cụ thể là một mẫu vi khuẩn phân lập có thể mang một hoặc nhiều loại gen KKS khác nhau (bảng 2). Điều này có thể lý giải là do việc lạm dụng nhiều loại kháng sinh trong điều trị nhiễm khuẩn cũng như dùng kháng sinh với liều lượng không đúng cách, không tuân theo khuyến cáo của bác sĩ, dẫn đến vi khuẩn dần kháng lại kháng sinh. Bên cạnh đó, vi khuẩn có khả năng lan truyền gen KKS trong cùng loài cũng như giữa 2 loài khác nhau thông qua nhiều hình thức như plasmid, transposons và intergrons [10]. Do đó, cần có những biện pháp cấp bách và cụ thể để hạn chế khả năng phát triển cũng như lan truyền gen KKS của vi khuẩn nhằm bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

Kết luận

Qua nghiên cứu cho thấy, tình trạng KKS của các mẫu vi khuẩn phân lập được từ phân người khỏe mạnh tại Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam ở mức rất cao (99%) và kháng ở nhiều mức độ khác nhau thông qua kiểu hình mọc trên môi trường chọn lọc có kháng sinh.

Tỷ lệ vi khuẩn mang gen ESBL cao, cụ thể là gen TEM chiếm tỷ lệ cao nhất khoảng 85,1%, tiếp theo là CTX-M chiếm 71,3% và thấp nhất là SHV chiếm 5,3% tổng số chủng. Bên cạnh đó, tần suất xuất hiện gen KKS cũng rất đa dạng. Có chủng vi khuẩn chỉ phát hiện một trong ba loại gen KKS nêu trên. Tuy nhiên, có chủng lại phát hiện tới hai hoặc cả ba gen KKS trong nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Dự án 23HN: Thực trạng sử dụng kháng sinh và tỷ lệ người mang một số vi khuẩn KKS trong cộng đồng tại một xã của tỉnh Hà Nam năm 2018 do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương và Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng Trường Đại học Oxford (OUCRU) tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Amr-review.org. (2019), *Background/AMR Review*, [online] available at: <https://amr-review.org/background.html> [accessed 12 Feb. 2019].
- [2] Who.int. (2018), *Antibiotic resistance*, [online] available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> [accessed 12 Feb. 2019].
- [3] C.L. Ventola (2015), "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats", *P&T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, **40(4)**, pp.277-283.
- [4] Nature.com (2013), "The antibiotic alarm", *Nature*, **495(7440)**, p.141.
- [5] Hoang Huy Tran, Soudeh Ehsani, Keigo Shibayama, Mari Matsui, Satowa Suzuki, Minh Binh Nguyen, Duong Nhu Tran, Van Phuong Tran, Dieu Linh Tran, Hoai Thu Nguyen, Duc Anh Dang, Hong Son Trinh, Tran Hien Nguyen, and Heiman F.L. Wertheim (2015), "Common isolation of New Delhi Metallo-beta Lactamase 1-producing Enterobacteriaceae in a large surgical hospital in Vietnam", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **34(6)**, pp.1247-1254.
- [6] Mai Văn Tuấn, Nguyễn Thanh Bảo (2006), "Khảo sát trực khuẩn gram âm sinh men betalactam phổ rộng phân lập tại Bệnh viện Trung ương Huế", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **12**, phụ bản số 1, tr.150-156.
- [7] Nguyễn Đỗ Phúc, Nguyễn Lý Hoàng Ngân (2014), "Tần suất mang gen sinh ESBL và AMPC của Enterobacteriaceae trong cộng đồng TP Hồ Chí Minh năm 2013", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **18**, phụ bản số 6, tr.388-392.
- [8] Karen Bush, Grogre A. Jacoby, and Antone A. Medeiros (1995), "A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39(6)**, pp.1211-1233.
- [9] Panjarat Suntarasamit (2007), *Characterization of extended spectrum- β -lactamase (ESBL) in E. coli and K. pneumoniae and their responders to combinations of piperacillin/tazobactam plus amikacin or ciprofloxacin versus meropenem*, thesis PhD, Mahidol University.
- [10] M.N. Alekshun, S.B. Levy (2007), "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance", *Cell*, **128(6)**, pp.1037-1050.

Nghiên cứu quá trình giải phóng thuốc quinin sulfat từ vật liệu tổ hợp polylactic axit/chitosan/quinin sulfat

Hoàng Thanh Đức^{1*}, Nguyễn Thị Thu Trang²

¹Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

²Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 21/1/2019; ngày chuyển phản biện 24/1/2019; ngày nhận phản biện 25/3/2019; ngày chấp nhận đăng 29/3/2019

Tóm tắt:

Gần đây, vật liệu tổ hợp polylactic axit/chitosan đã được sử dụng làm chất mang thuốc để điều chỉnh tốc độ giải phóng thuốc nhằm tăng hiệu quả và giảm liều dùng thuốc. Vật liệu tổ hợp polylactic axit/chitosan mang 10-50% thuốc quinin sulfat (QS) được chế tạo theo phương pháp vi nhũ nước/dầu/nước để nghiên cứu quá trình giải phóng QS. Ảnh hưởng của hàm lượng QS, độ pH và động học của quá trình giải phóng thuốc QS đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy, với mẫu vật liệu polylactic axit/chitosan mang hàm lượng QS càng cao thì tốc độ giải phóng QS càng chậm. Mẫu vật liệu tổ hợp polylactic axit/chitosan mang 50% QS có tốc độ giải phóng QS nhỏ nhất. Trong môi trường pH=7,4, tốc độ giải phóng QS lớn hơn trong môi trường pH=2,0. Quá trình giải phóng thuốc QS từ vật liệu tổ hợp polylactic axit/chitosan/QS tuân theo mô hình động học Korsmeyer-Peppas và khuếch tán theo định luật Fick.

Từ khóa: chitosan, giải phóng thuốc, polylactic axit, QS, vật liệu tổ hợp.

Chỉ số phân loại: 3.4

Mở đầu

Polylactic axit (PLA) và chitosan (CS) là hai polyme thiên nhiên được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau [1-3]. Tổ hợp PLA/CS được sử dụng để làm chất mang thuốc hỗ trợ cho điều trị các bệnh ung thư, tăng huyết áp, tim mạch...[4, 5]. Nhờ khả năng tương tác của thuốc với hai polyme, nhất là khi tổ hợp polyme PLA/CS có kích thước nano, thuốc sẽ giải phóng nhanh ở giai đoạn đầu và có kiểm soát ở giai đoạn sau, vì thế góp phần tăng hiệu quả của thuốc, giảm liều dùng, giảm số lần sử dụng thuốc trong ngày.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chế tạo vật liệu tổ hợp PLA/CS mang thuốc QS, với các hàm lượng QS khác nhau từ 10-50% so với PLA theo phương pháp vi nhũ [6, 7]. Nghiên cứu sự giải phóng QS trong vật liệu tổ hợp để xác định ảnh hưởng của hàm lượng QS, ảnh hưởng của độ pH và xác định động học của quá trình giải phóng thuốc QS. Các mẫu vật liệu tổ hợp polylactic axit/chitosan/quinin sulfat (PCQS) với hàm lượng QS từ 10-50% được đánh giá tiến trình giải phóng QS trong các dung dịch có pH=2 và pH=7 trong thời gian từ 1 đến 30 giờ. Đây là các môi trường pH đặc trưng cho dung dịch axit mạnh trong dạ dày (pH=2) và

dung dịch kiềm yếu ở ruột non (pH=7,4) trong cơ thể người. Tốc độ giải phóng QS được đánh giá thông qua giá trị hàm lượng QS giải phóng ra khỏi vật liệu. Động học của quá trình giải phóng QS từ vật liệu tổ hợp PCQS được xác định thông qua việc khảo sát lựa chọn sự phù hợp các mô hình động học bậc 0 (ZO), bậc một (FO), mô hình Higuchi (HG), mô hình Hixson-Crowell (HCW) và mô hình Korsmeyer-Peppas (KMP).

Nội dung nghiên cứu

Vật liệu, hóa chất và thiết bị nghiên cứu

- Các hóa chất dùng để chế tạo vật liệu tổ hợp PCQS bao gồm: PLA có độ nhớt là 2 dL/g, khối lượng phân tử trung bình $M_w=260.000$ g/mol, độ đa phân tán polyme $M_w/M_n=1,5$, ở dạng hạt; CS có độ axetyl hóa >77%, độ nhớt là 1220 cP, $M_n=1,61 \times 10^5$ Da; Polyetylen Oxit (PEO) có $M_w=100.000$ g/mol, nhiệt độ thủy tinh hóa $T_g=-67,0^\circ\text{C}$ và QS do hãng Sigma-Aldrich sản xuất.

- Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) ghi trên thiết bị quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier Impact 410 - Nicolet. Mật độ quang đo trên thiết bị phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến UV-Vis.

*Tác giả liên hệ: Tel: 0983844815; Email: ducht68@yahoo.com.vn

Study on the release of quinine sulphate from polylactic acid/chitosan/quinine sulfate composite materials

Thanh Duc Hoang^{1*}, Thi Thu Trang Nguyen²

¹Hanoi University of Industry

²Institute of Tropical Technology,

Vietnam Academy of Science and Technology

Received 21 January 2019; accepted 29 March 2019

Abstract:

Recently, the polylactic acid/chitosan composite has been used as a drug carrier to regulate the drug release aim to increase the effectiveness and decrease the drug dosage. Polylactic acid/chitosan composite materials that carry 10-50% quinine sulfate were prepared by the water/oilwater microemulsion method to study the release of quinine sulfate. Effects of quinine sulfate content, pH, and kinetics of quinine sulfate release were investigated. The results showed that polylactic acid/chitosan composite materials with higher quinine sulfate content exhibited slower speed release of quinine sulfate. The polylactic acid/chitosan composite materials that carry 50% quinine sulphate resulted in the slowest speed of quinine sulfate release. In pH=7.4 medium, the release rate of quinine sulfate was greater than the pH=2.0. The process of releasing quinine sulfate from polylactic acid/chitosan/quinine sulfate composites was in accordance with the Korsmeyer-Peppas kinetic model and diffused according to the Fick law.

Keywords: chitosan, composite materials, drug release, polylactic acid, QS.

Classification number: 3.4

Phương pháp nghiên cứu

- Các mẫu vật liệu tổ hợp PCQS với các hàm lượng QS từ 10-50% chế tạo theo phương pháp vi nhũ tương tự tài liệu tham khảo [6-8]. Hàm lượng QS giải phóng ra khỏi vật liệu được xác định bằng phương pháp phân tích phổ UV-Vis và theo công thức: % thuốc giải phóng = $C_t/C_0 \times 100$, trong đó: C_0 và C_t là lượng mang thuốc và lượng thuốc giải phóng tại thời gian t.

- Tốc độ giải phóng QS được đánh giá thông qua hàm lượng QS giải phóng ra trong dung dịch thử nghiệm theo thời gian. Khảo sát sự ảnh hưởng của hàm lượng mang thuốc QS đến tốc độ giải phóng QS của các mẫu vật liệu tổ hợp PCQS được thực hiện trong hai môi trường pH=2 và

pH=7,4.

- Động học của quá trình giải phóng QS từ vật liệu tổ hợp được xác định thông qua khảo sát đánh giá sự phù hợp của các mô hình động học: mô hình bậc 0 (ZO): $W_t = W_0 + K_1.t$; mô hình bậc một (FO): $\log C = \log C_0 - K_2.t/2,303$; mô hình Higuchi (HG): $W = K_3.t^{1/2}$; mô hình Hixson-Crowell (HCW): $W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_4.t$; và mô hình Korsmeyer - Peppas (KMP): $M_t/M_\infty = K_5.t^n$.

Kết quả và thảo luận

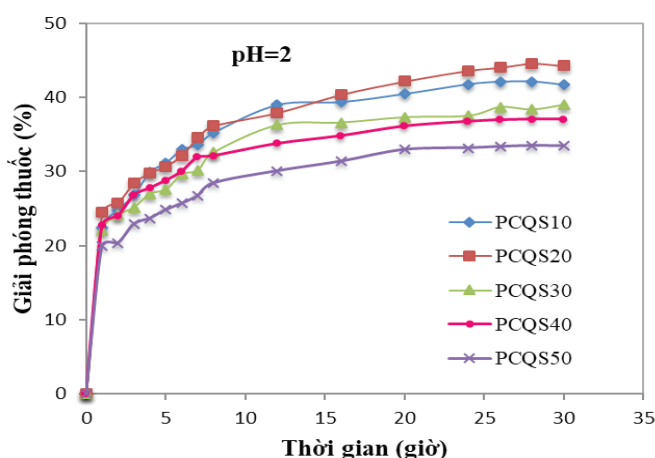
Ảnh hưởng của hàm lượng QS đến sự giải phóng QS từ vật liệu tổ hợp PCQS

Các mẫu vật liệu tổ hợp chế tạo với hàm lượng QS từ 10 đến 50% được ký hiệu theo thứ tự: PCQS10, PCQS20, PCQS30, PCQS40 và PCQS50. Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng QS trong vật liệu tổ hợp PCQS đến tốc độ giải phóng QS được thực hiện trong hai dung dịch có môi trường axit pH=2 và kiềm yếu pH=7,4.

Hàm lượng QS giải phóng khỏi các mẫu vật liệu PCQS trong dung dịch có pH=2 và pH=7,4 được thể hiện trong (bảng 1, hình 1) và (bảng 2, hình 2). Trong dung dịch pH=2, sau 30 giờ ngâm mẫu hàm lượng QS giải phóng ra từ các vật liệu tổ hợp đều nhỏ hơn 50%. Các mẫu vật liệu mang hàm lượng QS lớn hơn 20% thì hàm lượng càng lớn, lượng QS giải phóng ra càng nhỏ. Mẫu PCQS10 có hàm lượng QS giải phóng ra sau 30 giờ là 41,68%, mẫu PCQS20 là 44,23% (lớn nhất). Các mẫu vật liệu PCQS30, PCQS40 có hàm lượng QS giải phóng ra nhỏ hơn và mẫu PCQS50 có hàm lượng QS giải phóng ra nhỏ nhất, chỉ là 33,41% (bảng 1).

Bảng 1. Hàm lượng QS giải phóng từ các mẫu vật liệu PCQS trong dung dịch pH=2.

Thời gian (giờ)	Lượng QS được giải phóng (%)				
	PCQS10	PCQS20	PCQS30	PCQS40	PCQS50
1	22,34	24,46	21,97	22,65	19,97
2	24,76	25,78	24,12	23,98	20,34
3	26,83	28,43	25,16	26,76	22,89
4	29,89	29,78	26,98	27,75	23,68
5	31,12	30,69	27,56	28,76	24,82
6	32,95	32,14	29,62	29,98	25,67
7	33,56	34,54	30,12	31,89	26,71
8	35,21	36,13	32,56	32,09	28,42
12	38,96	37,89	36,25	33,73	30,05
16	39,34	40,34	36,57	34,78	31,34
20	40,45	42,14	37,29	36,07	32,92
24	41,75	43,58	37,49	36,71	33,15
26	42,09	44,01	38,67	36,92	33,32
28	42,12	44,54	38,34	37,02	33,45
30	41,68	44,23	38,98	37,01	33,41

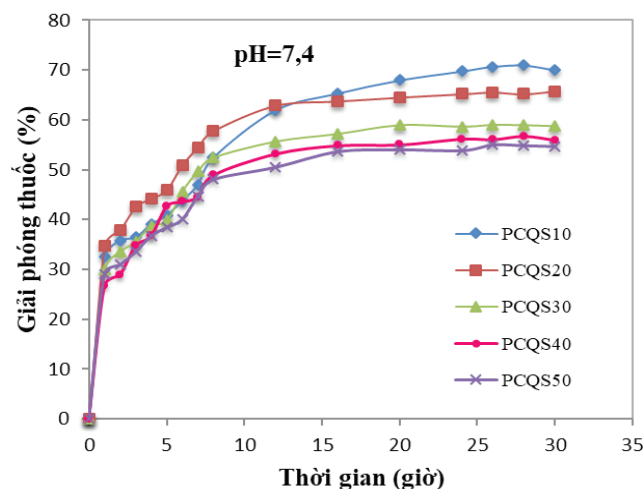


Hình 1. Đồ thị giải phóng QS từ các mẫu vật liệu PCQS10, PCQS20, PCQS30, PCQS40 và PCQS50 trong dung dịch pH=2.

Trong dung dịch có pH=7,4, tốc độ giải phóng QS ở các mẫu vật liệu PCQS nhanh hơn trong dung dịch có pH=2. Sau 12 giờ thử nghiệm, hàm lượng QS đã giải phóng ra được hơn 50%. Mẫu PCQS20 có tốc độ giải phóng QS lớn nhất, sau 12 giờ đạt 62,89%. Các mẫu có hàm lượng QS lớn hơn đều có tốc độ giải phóng QS nhỏ hơn. Mẫu PCQS50 có tốc độ giải phóng QS chậm nhất, sau 12 giờ là 50,54% và sau 30 giờ là 54,72% (bảng 2).

Bảng 2. Hàm lượng QS giải phóng từ các mẫu vật liệu PCQS trong dung dịch pH= 7,4.

Thời gian (giờ)	Lượng QS được giải phóng (%)				
	PCQS10	PCQS20	PCQS30	PCQS40	PCQS50
1	32,54	34,76	29,98	26,78	29,09
2	35,78	37,89	33,56	28,98	30,96
3	36,52	42,56	35,62	34,78	33,56
4	39,12	44,21	38,78	36,79	36,78
5	40,89	45,95	39,78	42,67	38,45
6	43,89	50,95	45,68	43,63	40,09
7	47,04	54,49	49,67	44,58	44,68
8	52,48	57,78	52,43	48,94	48,08
12	61,96	62,89	55,68	53,21	50,54
16	65,34	63,76	57,21	54,89	53,67
20	67,98	64,54	58,97	55,05	54,07
24	69,78	65,21	58,68	56,21	53,89
26	70,72	65,56	59,02	56,11	55,04
28	70,98	65,21	58,97	56,78	54,89
30	70,03	65,78	58,79	55,98	54,72



Hình 2. Đồ thị giải phóng QS từ các mẫu vật liệu PCQS10, PCQS20, PCQS30, PCQS40 và PCQS50 trong dung dịch pH=7,4.

Như vậy, ở trong cả hai môi trường pH axit và kiềm yếu, khi hàm lượng QS của vật liệu tổ hợp càng cao thì tốc độ giải phóng QS càng chậm. Rõ ràng hàm lượng QS trong vật liệu tổ hợp PCQS có ảnh hưởng khá rõ rệt đến tốc độ giải phóng QS. Mẫu vật liệu có hàm lượng QS là 20% có tốc độ giải phóng QS lớn nhất.

Ảnh hưởng của pH dung dịch đến sự giải phóng QS từ vật liệu tổ hợp PCQS

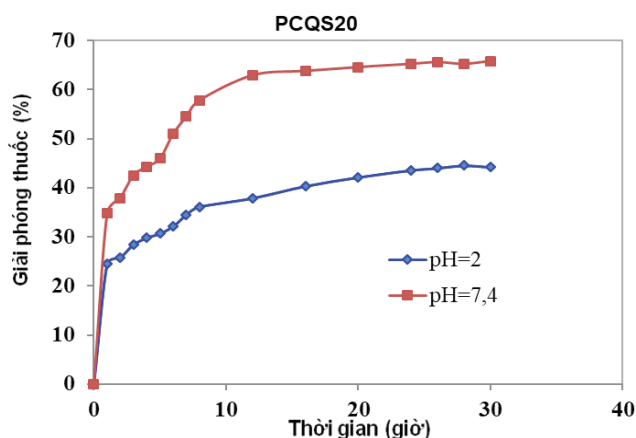
Mẫu vật liệu PCQS20 có tốc độ giải phóng QS nhanh nhất được chọn để khảo sát ảnh hưởng của pH dung dịch đến sự giải phóng QS. Hai môi trường pH được chọn thử nghiệm là dung dịch có pH=2 và pH=7,4.

Kết quả thu được (bảng 3, hình 3) cho thấy, pH của dung dịch ảnh hưởng đáng kể đến sự giải phóng thuốc QS từ vật liệu tổ hợp PCQS20. Sau 30 giờ, hàm lượng QS giải phóng trong dung dịch pH=7,4 đạt gần 70%, còn trong dung dịch pH=2 chỉ đạt 44%. Rõ ràng, tốc độ giải phóng QS từ vật liệu tổ hợp PCQS20 trong dung dịch kiềm yếu (pH= 7,4) lớn hơn trong dung dịch axit (pH=2). Điều này phù hợp cho sự hấp thụ thuốc tốt hơn ở ruột non.

Sự giải phóng thuốc QS trong 12 giờ đầu xảy ra với tốc độ nhanh, sau 12 giờ sự giải phóng thuốc chậm lại và ổn định hơn, như vậy có thể kiểm soát được tốc độ giải phóng QS nếu sử dụng chất tương hợp POE hay điều chỉnh hàm lượng mang thuốc khi chế tạo vật liệu tổ hợp PCQS. Điều này phù hợp với công bố của M. Prabakaran khi nghiên cứu vật liệu tổ hợp PLA/CS mang thuốc Lamivudin [5].

Bảng 3. Hàm lượng QS giải phóng từ mẫu vật liệu PCQS20 trong dung dịch pH=2 và pH = 7,4.

Thời gian (giờ)	% QS ở pH=2,0	% QS ở pH=7,4
1	24,46	34,76
2	25,78	37,89
3	28,43	42,56
4	29,78	44,21
5	30,69	45,95
6	32,14	50,95
7	34,54	54,49
8	36,13	57,78
12	37,89	62,89
16	40,34	63,76
20	42,14	64,54
24	43,58	65,21
26	44,01	65,56
28	44,54	65,21
30	44,23	65,78



Hình 3. Đồ thị giải phóng QS từ vật liệu PCQS20 trong các dung dịch pH=2 và pH=7,4.

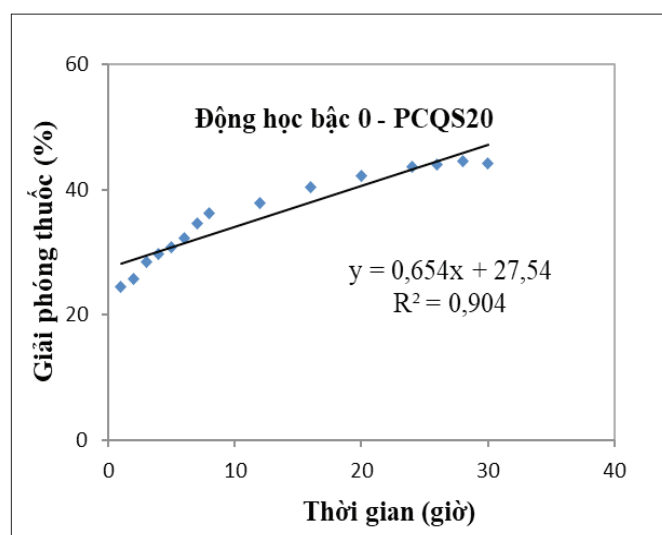
Động học quá trình giải phóng QS từ vật liệu tổ hợp PCQS

Nghiên cứu động học giải phóng QS từ các vật liệu tổ hợp PCQS trong dung dịch pH=2 và pH=7,4 được tiến hành dựa vào việc phân tích, đánh giá quá trình giải phóng QS theo các mô hình động học: bậc 0, bậc một, mô hình Higuchi, mô hình Hixson-Crowell và mô hình Korsmeyer-Peppas.

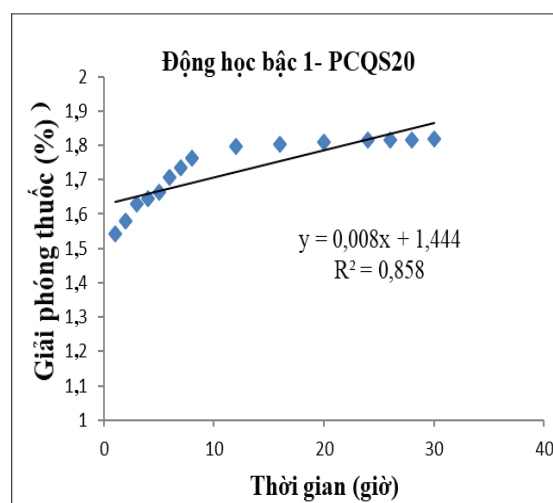
Các kết quả về hàm lượng QS giải phóng từ các mẫu vật

liệu PCQS trong các dung dịch pH=2 và pH=7,4 theo thời gian từ 1-30 giờ được tính toán theo các mô hình động học, bằng công cụ xử lý thống kê MS-Excel để phân tích hồi quy và xây dựng phương trình động học. Từ kết quả phân tích hồi quy và xây dựng phương trình động học có thể xác định được động học quá trình giải phóng QS của các mẫu vật liệu tổ hợp PCQS, nhằm tìm ra cơ chế giải phóng thuốc của chất mang thuốc.

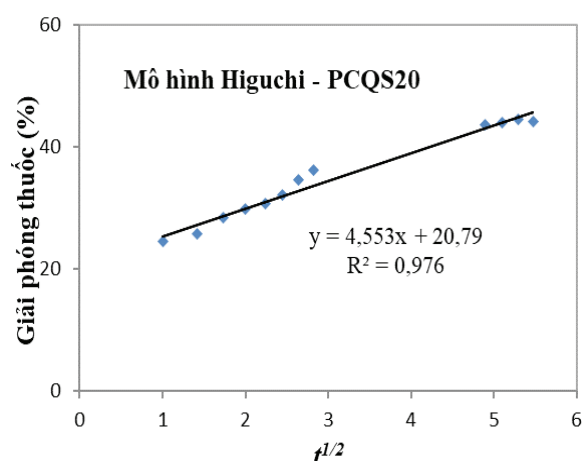
Đồ thị, phương trình động học và các hệ số hồi quy tương ứng với các mô hình động học quá trình giải phóng QS khỏi mẫu vật liệu PCQS20 trong dung dịch pH=2 thu được được thể hiện ở các hình 4-8.



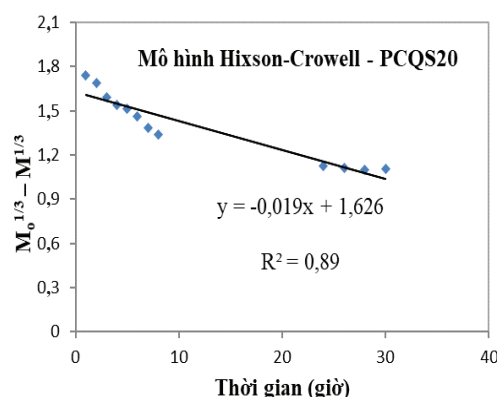
Hình 4. Phương trình động học bậc 0 phản ánh sự phụ thuộc hàm lượng QS được giải phóng từ vật liệu tổ hợp PCQS20 trong dung dịch pH=2 theo thời gian.



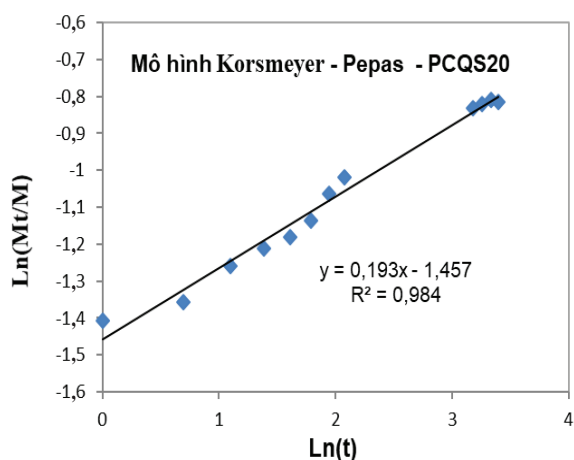
Hình 5. Phương trình động học bậc 1 phản ánh sự phụ thuộc hàm lượng QS được giải phóng từ vật liệu tổ hợp PCQS20 trong dung dịch pH=2 theo thời gian.



Hình 6. Phương trình động học theo mô hình Higuruchi phản ánh sự phụ thuộc hàm lượng QS được giải phóng từ vật liệu tổ hợp PCQS20 trong dung dịch pH=2 theo thời gian.



Hình 7. Phương trình động học theo mô hình Hixson-Crowell phản ánh sự phụ thuộc hàm lượng QS được giải phóng từ vật liệu tổ hợp PCQS20 trong dung dịch pH=2 theo thời gian.



Hình 8. Phương trình động học theo mô hình Korsmeyer-Pepas phản ánh sự phụ thuộc hàm lượng QS được giải phóng từ vật liệu tổ hợp PCQS20 trong dung dịch pH=2 theo thời gian.

Phân tích động học giải phóng QS của mẫu vật liệu PCQS20 trong dung dịch pH= 2 theo thời gian cho thấy phương trình hồi quy tuyến tính theo mô hình Korsmeyer-Pepas có hệ số tương quan R^2 lớn nhất ($R^2=0,984$). Đồ thị mô tả sự giải phóng thuốc theo thời gian thử nghiệm phù hợp với phương trình hàm số mũ Korsmeyer-Pepas: $Mt/M_\infty = K.t^n$. Trong đó: Mt/M_∞ là hàm giải phóng thuốc QS theo thời gian, K là hằng số đặc trưng cho hệ thuốc - polyme và n là tham số thực nghiệm đặc trưng cho cơ chế giải phóng thuốc.

Theo mô hình Korsmeyer-Pepas động học giải phóng QS từ vật liệu PCQS20 có hằng số khuếch tán $K=0,193 < 0,43$ tuân theo định luật Fick (bảng 4). Tức là, lượng thuốc QS khuếch tán qua một đơn vị bề mặt vật liệu vuông góc với phương khuếch tán và tỷ lệ với gradient nồng độ, thuốc từ nơi có nồng độ cao khuếch tán đến nơi có nồng độ thấp.

Bảng 4. Hằng số khuếch tán theo mô hình Korsmeyer-Pepas và cơ chế khuếch tán.

Hằng số khuếch tán (K)	Cơ chế khuếch tán
$\leq 0,43$	Khuếch tán Fick
$0,45 < K < 0,85$	Khuếch tán không Fick
$K \geq 0,85$	Không tuân theo Fick, động học bậc một, bậc không

Phân tích phương trình hồi quy và các tham số động học quá trình giải phóng QS từ các mẫu vật liệu PCQS10, PCQS30, PCQS40, PCQS50 theo các mô hình động học tương ứng, trong môi trường pH=2 và pH=7,4 cũng thu được kết quả tương tự như mẫu PCQS20 (bảng 5 và 6).

Bảng 5. Các tham số của các phương trình động học giải phóng QS từ các vật liệu tổ hợp PCQS trong dung dịch pH=2.

Mô hình		PCQS10	PCQS30	PCQS40	PCQS50
ZO	R^2	0,821	0,849	0,833	0,867
	K	0,592	0,532	0,433	0,445
FO	R^2	0,821	0,865	0,848	0,899
	K	0,592	0,007	0,421	0,43
HG	R^2	0,932	0,970	0,934	0,964
	K	5,065	3,694	3,061	3,083
HCW	R^2	0,858	0,881	0,815	0,871
	K	0,578	-0,017	-0,014	-0,015
KMP	R^2	0,982	0,986	0,979	0,979
	K	0,193	0,177	0,152	0,169

Bảng 6. Các tham số của các phương trình động học giải phóng QS từ vật liệu tổ hợp PCQS trong dung dịch pH=7,4.

Mô hình		PCQS10	PCQS20	PCQS30	PCQS40	PCQS50
ZO	R ²	0,898	0,771	0,76	0,755	0,799
	K	1,371	0,953	0,903	0,883	0,832
FO	R ²	0,859	0,724	0,712	0,687	0,753
	K	0,011	0,007	0,008	0,008	0,008
HG	R ²	0,949	0,880	0,867	0,871	0,895
	K	9,723	7,020	6,658	6,542	6,077
HCW	R ²	0,934	0,790	0,768	0,747	0,813
	K	0,031	0,021	0,022	0,022	0,021
KMP	R ²	0,859	0,924	0,948	0,918	0,947
	K	0,026	0,018	0,018	0,019	0,019

Các kết quả ở bảng 5 và 6 cho thấy trong cả hai dung dịch pH=2 và pH=7,4, các mẫu vật liệu PCQS10, PCQS20, PCQS30, PCQS40 và PCQS50 đều có phương trình hồi quy phản ánh sự giải phóng QS với hệ số hồi quy R² lớn nhất, gần bằng 1 và tuân theo mô hình Korsmeyer-Peppas. Hằng số khuếch tán K ở mẫu PCQS10 là 0,193 (pH=2) và 0,026 (pH=7,4); mẫu PCQS30 là 0,177 và 0,018; mẫu PCQS40 là 0,152 và 0,019; mẫu PCQS50 là 0,169 và 0,019, tất cả đều nhỏ hơn 0,43, chứng tỏ tuân theo định luật Fick. Quá trình giải phóng QS từ các mẫu vật liệu PCQS theo mô hình động học bậc 0 và mô hình động học bậc 1 thể hiện không rõ ràng vì có hệ số hồi quy khá thấp, đặc biệt trong dung dịch pH=7,4 mẫu PCQS40 chỉ đạt 0,687. Điều này là do quá trình giải phóng QS từ vật liệu tổ hợp PCQS chia thành 2 giai đoạn, trong 12 giờ đầu tốc độ giải phóng nhanh, sau 12 giờ sự giải phóng có kiểm soát, tốc độ giải phóng chậm dần và có tính ổn định. Đây cũng chính là một trong các mục tiêu cần đạt được để kiểm soát quá trình giải phóng thuốc từ vật liệu tổ hợp PCQS mang thuốc.

Như vậy, quá trình giải phóng QS từ các mẫu vật liệu PCQS tuân theo mô hình động học Korsmeyer-Peppas. Sự khuếch tán QS vào dung dịch giải phóng thuốc tuân theo định luật Fick.

Kết luận

Quá trình giải phóng thuốc QS khỏi vật liệu tổ hợp mang thuốc polylactic axit/chitosan/quinin sulfat (PCQS) chịu ảnh hưởng bởi hàm lượng thuốc mang trong vật liệu. Vật liệu mang thuốc càng lớn thì tốc độ giải phóng thuốc càng

chậm. Với mẫu vật liệu mang 10-20% thuốc QS có tốc độ giải phóng thuốc nhanh nhất.

Trong dung dịch có môi trường axit, tốc độ giải phóng thuốc QS từ các mẫu vật liệu tổ hợp PCQS chậm hơn trong dung dịch có môi trường kiềm yếu (pH=7,4). Quá trình giải phóng QS trong môi trường kiềm yếu diễn ra theo hai giai đoạn, trong 12 giờ đầu sự giải phóng diễn ra nhanh hơn, sau 12 giờ đầu sự giải phóng chậm hơn và có sự kiểm soát bởi động học của quá trình.

Quá trình giải phóng thuốc QS từ vật liệu tổ hợp PCQS tuân theo mô hình động học giải phóng thuốc Korsmeyer-Peppas. Sự khuếch tán QS vào dung dịch giải phóng tuân theo định luật Fick.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Thúy Chinh (2016), *Nghiên cứu sự giải phóng thuốc nifedipin được mang bởi vật liệu tổ hợp polylactic axit /chitosan*, Luận án tiến sĩ hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- [2] V.S. GiitaSilverajah, A.I. Nor, Z. Norhazlin, M. Wan, Y. Wan and A.H. Hazimah (2012), "Mechanical, thermal and morphological properties of poly (lactic acid)/epoxidized palm olein blend", *Molecules*, **17**, p.11729.
- [3] N. Gavhane Yogeshkumar, S. Gurav Atul and V. Yadav Adhikrao (2013) "Chitosan and its applications: A review of literature", *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **4**(1), pp.312-331.
- [4] B.F. Harvie (2000), "Poly-L-lactic acid (PLA) in surgery, Philosophy Doctor Thesis, Smith Nephew", *First Choice in Endoscopy*.
- [5] M. Prabakaran, M.A. Rodriguez-Perez, J.A. de Saja, J.F. Mano (2007), "Preparation and characterization of poly (D,L-lactic acid)/chitosan hybrid scaffold with drug release capability", *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **81**(2), pp.427-434.
- [6] A. Dev, N.S. Binulal, A. Anitha, S.V. Nair, T. Fruike, H. Tamura, R. Jayakumar (2010), "Preparation of poly(lactic acid) nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications", *Carbohydrate Polymers*, **80**, pp.833-838.
- [7] R. Nanda, A. Sasmal, P.L. Nayak (2011), "Preparation and character-ization of chitosan-poly lactide composites blended with Cloisite 30B for control release of the anticancer drug Paclitaxel", *Carbohydrate Polymers*, **83**, pp.988-994.
- [8] A. Portero, C. Remunan Lopez, J.L. Vila-Jato (1998), "Effect of chitosan and chitosan glutamate enhancing the dissolution properties of the 144 poorly water soluble drug nifedipine", *International Journal of Pharmaceutics*, **175**, pp.75-84.

Bào chế gel vi nhũ tương từ cao khô Rau đắng đất [*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., Molluginaceae]

Nguyễn Thị Kim Liên¹, Lê Xuân Trường², Trần Văn Thành^{2*}

¹Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 18/10/2018; ngày chuyển phản biện 24/10/2018; ngày nhận phản biện 25/11/2018; ngày chấp nhận đăng 19/12/2018

Tóm tắt:

Rau đắng đất [*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC, Molluginaceae] với thành phần flavonoid có khả năng ức chế vi sinh vật, được xem như một nguồn nguyên liệu kháng sinh thực vật đầy hứa hẹn để bào chế thuốc kháng khuẩn dùng ngoài. Gel vi nhũ tương điều chế từ Rau đắng đất (RĐĐ) giúp phân phối một lượng hoạt chất lớn hơn lên bề mặt da. Cao khô RĐĐ được tinh chế bằng ethanol 90% và tiến hành khảo sát hoạt tính kháng khuẩn trên 4 loại vi khuẩn *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* và *Staphylococcus aureus*, từ đó xây dựng công thức để tạo gel kháng khuẩn. Thành phần công thức được xác định từ vùng tạo vi nhũ tương trên giản đồ pha ba cấu tử xây dựng từ isopropyl myristat (IPM), tween 20, span 80 và nước. Ba công thức vi nhũ tương RĐĐ được điều chế và đánh giá về cảm quan, pH, phân bố kích thước giọt và độ bền pha. Các tá dược tạo gel khác nhau được khảo sát để tạo gel bôi da phù hợp. Kết quả điều chế được vi nhũ tương RĐĐ có pH 4,527, kích thước hạt trung bình 14 nm và bền sau 6 chu kỳ sốc nhiệt. Gel vi nhũ tương RĐĐ đạt các chỉ tiêu vật lý và thể hiện khả năng kháng khuẩn *in vitro* khi thử nghiệm trên *P. aeruginosa*.

Từ khóa: flavonoid, gel vi nhũ tương, *Glinus oppositifolius*, kháng khuẩn, Rau đắng đất.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Làn da khỏe mạnh là hàng rào hữu hiệu bảo vệ cơ thể trước các tác nhân có hại của môi trường như hóa chất, các tia bức xạ, vi sinh vật... Tuy nhiên, khi da bị tấn công và tổn thương, chức năng bảo vệ này bị suy giảm. Nhiễm khuẩn da là một trong những nguyên nhân chính gây ra các bệnh về da và là tiền đề cho những bệnh lý liên quan. Để xử trí tình trạng nhiễm trùng da có thể thoa các thuốc mỡ chứa kháng sinh tác dụng tại chỗ lên các mụn mủ để làm khô dần mụn. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh dùng ngoài luôn tồn tại khả năng gây mẫn cảm và tạo thuận lợi cho phát triển vi khuẩn kháng thuốc nên không thể dùng điều trị kéo dài.

RĐĐ là một loài cỏ dại phổ biến ở vùng nhiệt đới châu Á. Theo y học cổ truyền, cây RĐĐ có tác dụng lợi tiểu, nhuận gan, hạ nhiệt; dịch chiết từ RĐĐ trị ngứa và bệnh ngoài da. Nhiều công trình nghiên cứu trong và ngoài nước đã chứng minh dược liệu này có tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm rất tốt, ngoài ra còn có tác dụng kháng viêm và kích thích tái sinh mô [1-3]. Từ đó cho thấy, RĐĐ là một nguồn nguyên liệu tốt để bào chế một dạng thuốc kháng khuẩn dùng ngoài, bảo vệ tối đa cho hàng rào quan trọng nhất của cơ thể. Tuy nhiên, tính thân nước cao của flavonoid gây khó khăn trong việc bào chế do dễ bị rửa trôi và khó bám lâu trên bề mặt da. Do đó, cần có một dạng bào chế phù hợp với hoạt chất này.

Trong số các dạng thuốc dùng cho da, vi nhũ tương thể hiện nhiều ưu điểm như bền về mặt nhiệt động, dễ điều chế và nâng cấp cỡ lô; có khả năng làm tăng sinh khả dụng của thuốc do giảm bớt tính đối kháng của lớp sừng và giúp phân phối một lượng hoạt chất lớn hơn lên bề mặt da so với các dạng khác như dung dịch, lotion hoặc kem [4]. Gel hóa vi nhũ tương làm tăng khả năng bám dính và kéo dài thời gian lưu của thuốc trên da. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tạo ra một chế phẩm gel vi nhũ tương từ cao khô RĐĐ cho hiệu quả kháng khuẩn tốt để có thể thay thế các kháng sinh dùng ngoài.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Cao khô RĐĐ được cung cấp bởi BV Pharma, Việt Nam theo tiêu chuẩn cơ sở của nhà sản xuất.

Ethanol, IPM, tween 20, span 80, natri carboxymethyl cellulose (NaCMC), natri alginat, carbopol 940, tá dược tạo gel Velvet (gel V) do Trung Quốc sản xuất và đạt tiêu chuẩn cơ sở của nhà sản xuất. Các thuốc thử đều thuộc loại tinh khiết phân tích.

Trang thiết bị nghiên cứu gồm có máy đo quang phổ UV-Vis 1280 (Shimadzu), tủ sấy (Mettler - M23), bếp cách thủy (Mettler - WNB114), cân kỹ thuật (Sartorius), cân phân tích (Sartorius), cân phân tích âm MB 45 (Ohaus), máy đo pH (Ika),

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

Preparation of microemulsion-based gels from carpet weed [*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., Molluginaceae] dry extract

Thi Kim Lien Nguyen¹, Xuan Truong Le², Van Thanh Tran^{2*}

¹Nguyen Tat Thanh University

²University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

Received 18 October 2018; accepted 19 December 2018

Abstract:

Carpet weed [*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., Molluginaceae] has the ability to inhibit microorganisms because its extract contains flavonoids, which are considered as a promising source of plant-based antibiotics for the production of antibiotics. Microemulsion-gels prepared from carpet weed could distribute a great amount of active ingredients to the skin surface. Carpet weed dry extract was purified by 90% ethanol, and its bio-activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus* were evaluated. The results helped to determine the formula for antibacterial gels. Microemulsion composition was determined on the basis of the microemulsion region constructed on a ternary phase diagram with isopropyl myristate, tween 20, span 80 and water. Three carpet weed microemulsion formulations were manipulated and tested for their appearance, pH, viscosity, droplet size distribution, and phase strength. The physical parameters of carpet weed microemulsion included pH 4.527, average particle size about 14 nm and being stable after 6 cycles of heat shock. Carpet weed microemulsion gels satisfied physical and chemical criteria and exhibited *in vitro* antibacterial activity.

Keywords: antibacterial, carpet weed, flavonoid, *Glinus oppositifolius*, microemulsion gel.

Classification number: 3.4

máy khuấy từ (Ika) và các dụng cụ thường quy của phòng thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Tinh chế cao nguyên liệu: xác định hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao khô nguyên liệu bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis với thuốc thử nhôm nitrat 10%, dung môi ethanol 80% có 5% acid acetic (dung môi A), sử dụng quercetin làm chất chuẩn

(phương pháp được điều chỉnh và thẩm định theo hướng dẫn trong Dược điển Việt Nam IV). Cân chính xác khoảng 1,0 g cao khô cho vào bình định mức 100 ml, thêm dung môi A gần đến vạch, lắc kỹ, siêu âm 5 phút và bổ sung dung môi A đến vạch, lọc qua giấy lọc lấy dịch. Hút 5 ml dịch lọc cho vào bình định mức 25 ml, thêm vào 1 ml natri acetat 1M, 1 ml dung dịch nhôm nitrat 10%, bổ sung dung môi A vừa đủ, lắc đều. Chuẩn bị mẫu trắng không có thuốc thử nhôm nitrat 10%. Để yên các mẫu trong 45 phút rồi tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 412 nm [4, 5]. Các phép đo được thực hiện 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Các tạp chất tan trong nước được loại bằng cách thêm đồng lượng ethanol 90% và để lắng qua đêm trong tủ lạnh và lọc loại tạp. Tiến hành thẩm dò nồng độ ethanol phù hợp để loại được tối đa tạp chất mà vẫn đảm bảo hoạt tính kháng khuẩn. Cân các mẫu cao 10 g cho lần lượt vào 100 ml ethanol 45, 70 và 90%, khuấy kỹ, để lắng qua đêm và lọc qua giấy lọc. Cô dịch lọc trên bếp cách thủy đến khô. Các mẫu cao thu được được dùng để định tính khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch với 4 chủng vi khuẩn *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* và *S. aureus*. Tiến hành tinh chế nguyên liệu với dung môi cho mẫu cao có khả năng kháng khuẩn tốt nhất, thu cao tinh chế (RTC).

Xây dựng công thức vi nhũ tương trắng: vi nhũ tương được xây dựng với IPM, chất diện hoạt tween 20, chất đồng diện hoạt sng - đục phát hiện bằng quan sát dưới ánh sáng thường để khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ chất diện hoạt/chất đồng diện hoạt đến sự hình thành vi nhũ tương qua giản đồ 3 pha: tween 20/span 80 (1/1) - IPM - nước, tween 20/span 80 (3/1) - IPM - nước, tween 20/span 80 (5/1) - IPM - nước, so sánh diện tích vùng tạo vi nhũ tương. Tiến hành khảo sát tỷ lệ giữa dầu và hỗn hợp chất diện hoạt/đồng diện hoạt ở các tỷ lệ 1/9, 2/8, 3/7, 4/6, 5/5, 6/4, 7/3, 8/2, 9/1.

Công thức vi nhũ tương được lựa chọn từ giản đồ pha sao cho thành phần pha dầu chiếm tỷ lệ không dưới 5%, lượng chất diện hoạt sử dụng là ít nhất, lượng nước sử dụng là nhiều nhất. Điều chế 3 công thức vi nhũ tương trắng F1, F2, F3 từ vùng tạo vi nhũ tương bằng cách cho IPM vào hỗn hợp chất diện hoạt và đồng diện hoạt, khuấy đều bằng máy khuấy từ, thêm pha nước vào và khuấy đến khi đồng nhất. Phối hợp 10% cao RTC vào các mẫu trắng để tạo 3 công thức chứa hoạt chất là F4, F5, F6. So sánh các công thức về cảm quan và độ bền pha sau 6 chu kỳ sốc nhiệt (mỗi chu kỳ được tiến hành ở dưới 4°C trong 16 giờ và chuyển ngay sang 40°C trong 8 giờ, các chu kỳ được tiến hành liên tục), chọn ra công thức phù hợp nhất.

Xác định các tính chất của cao đã tinh chế: RTC được định lượng flavonoid toàn phần bằng quang phổ UV-Vis và đo độ ẩm bằng cân hồng ngoại phân tích ẩm. Các phép đo được thực hiện 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Thử độ tan của cao RTC với nước, ethanol và vi nhũ tương trắng bằng cách cho lượng dư cao RTC vào 20 ml chất thử, khuấy liên tục bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Lượng cao RTC cho vào đến khi đạt dung dịch bão hòa, cao không tan được sẽ làm cho dung dịch bị đục. Hỗn dịch được để qua đêm, đem đi ly tâm, lọc và tiến hành định lượng bằng quang phổ UV-Vis.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao RTC bằng phương pháp pha loãng trên đĩa thạch với chủng vi khuẩn nhạy cảm, từ đó định liều cao RTC dùng cho chế phẩm bằng ít nhất 10 lần MIC. So sánh liều dự kiến với độ tan để thiết kế nồng độ phù hợp.

Điều chế vi nhũ tương RDD: điều chế 3 công thức vi nhũ tương RDD bằng cách phối hợp vi nhũ tương trắng với cao RTC ở 3 nồng độ dự kiến. Khảo sát các công thức về cảm quan, pH, độ bền pha sau 6 chu kỳ sốc nhiệt, đo kích thước hạt và phân bố kích thước hạt bằng máy tán xạ laser. Chọn ra công thức tốt nhất để thử nghiệm gel hóa.

Điều chế gel vi nhũ tương RDD: thực hiện thử nghiệm lựa chọn tác nhân tạo gel cho vi nhũ tương RDD với các tác nhân tạo gel thân nước thường dùng: NaCMC, natri alginate, carbopol 940 và gel V. Chất tạo gel được thêm từ từ vào vi nhũ tương, vừa thêm vừa khuấy đều đến khi mẫu thử sệt lại, chọn chất tạo gel đạt yêu cầu. Tiếp tục khảo sát chất tạo gel đã chọn ở nhiều nồng độ khác nhau, chọn nồng độ tối ưu sao cho gel trong suốt, đạt thể chất phù hợp, cho ánh sáng truyền qua dễ dàng và không làm thay đổi cấu trúc của vi nhũ tương. Điều chế thành phẩm gel vi nhũ tương RDD với chất tạo gel ở nồng độ đã chọn.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* của gel thành phẩm bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch Mueller-Hinton với các chủng vi khuẩn nhạy cảm. Vi khuẩn được hoạt hóa bằng môi trường Nutrient Broth, chỉnh độ đục vi khuẩn bằng nước muối sinh lý sao cho mật độ thu được tương đương với McFarland 0,5 (khoảng $1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Dùng que bông vô trùng nhúng vào huyền dịch vi khuẩn đã chuẩn bị, trải đều trên mặt thạch, để hộp trong tủ ẩm cho ráo mặt. Đục các lỗ đường kính 6 mm trong bản thạch, cho chất thử vào đây lỗ. Mẫu chứng âm là gel vi nhũ tương trắng. Chứng dương là chế phẩm thương mại gel X chứa dịch chiết neem và 1% bạc nano. Ủ hộp thạch trong tủ ẩm 35-37°C trong 16-18 giờ. Lỗ chứng âm phải không ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Chất thử có khả năng kháng khuẩn khi xung quanh lỗ có vòng kháng khuẩn.

Tiến hành khảo sát chế phẩm về các đặc tính vật lý như tính chất, pH, độ đàn mỏng.

Kết quả và bàn luận

Tinh chế cao nguyên liệu

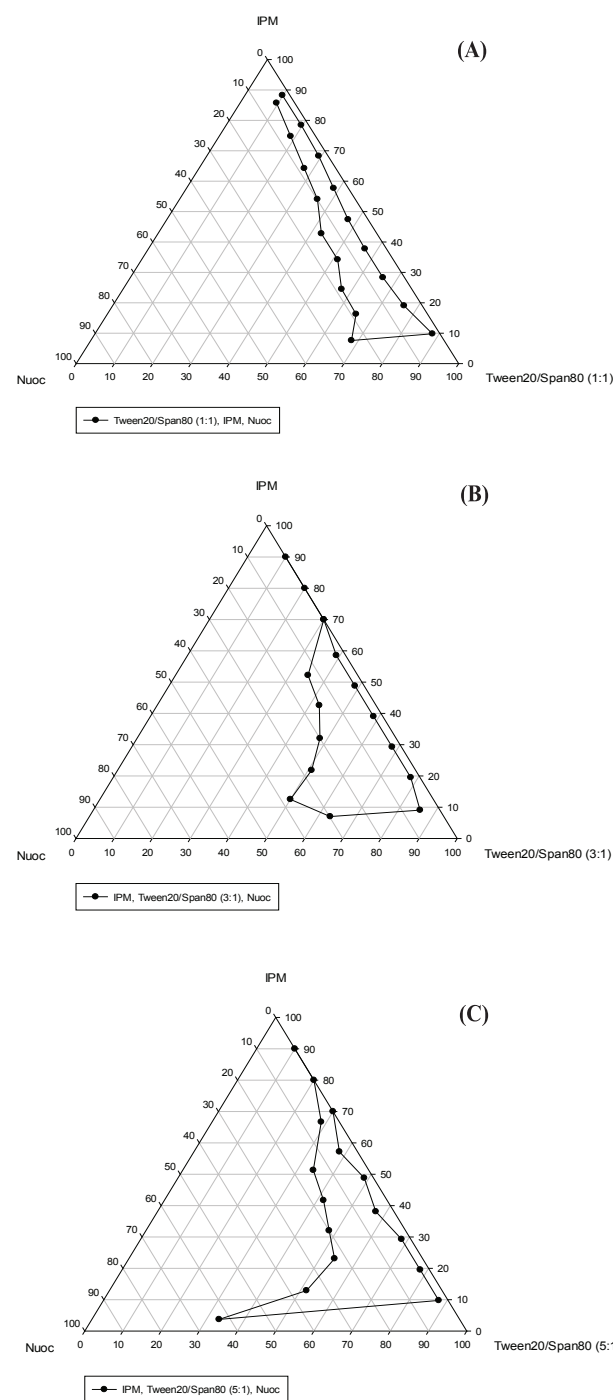
Kết quả định lượng cao nguyên liệu sau 3 lần lặp lại cho thấy hàm lượng flavonoid toàn phần là 2,621 mg quercetin/1 g cao. Hàm lượng này quá thấp, khó có thể sử dụng để điều chế thành phẩm đạt yêu cầu nên nguyên liệu cần phải được tinh chế để làm giàu hoạt chất, đồng thời loại các tạp tan trong nước để chế phẩm bền vững hơn.

Trong số các mẫu cao còn 45, 70 và 90% đem định tính kháng khuẩn, chỉ có mẫu cao còn 90% cho phản ứng dương tính ở nồng độ thử nghiệm (200 mg/ml) trên trực khuẩn Gram (-) *P. aeruginosa*, âm tính với 3 chủng còn lại; các mẫu cao còn 45% và 70% không thể hiện tính kháng khuẩn. Do đó, ethanol 90% được chọn làm dung môi tinh chế cao khô RDD ban đầu, qua quá trình

xử lý thu được cao đặc màu nâu đen có hàm ẩm trung bình 14,5% gọi là cao RTC.

Xây dựng công thức vi nhũ tương trắng

Các giản đồ pha trên hình 1 cho thấy, hỗn hợp tween 20/span 80 tỷ lệ 5:1 cho vùng tạo vi nhũ tương lớn nhất, nên tỷ lệ này sẽ được lựa chọn để xây dựng công thức vi nhũ tương.



Hình 1. Giản đồ pha thể hiện vùng tạo vi nhũ tương (vùng diện tích bên trong đường nối kín) với các tỷ lệ tween 20/span 80 lần lượt là 1:1 (A), 3:1 (B) và 5:1 (C).

Trên giản đồ pha của tỷ lệ tween 20/span 80 (5:1) chọn được 3 công thức tạo vi nhũ tương là F1, F2 và F3. Từ 3 công thức này phối hợp thêm 10% cao RTC để được 3 công thức F4, F5 và F6. Điều chế 6 công thức vi nhũ tương có thành phần như bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các công thức vi nhũ tương khảo sát sơ bộ.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	Đơn vị
Cao RTC	0	0	0	10	10	10	%
IPM	5	5	5	4,5	4,5	4,5	%
Tween 20	37,5	41,67	45,83	33,75	37,5	41,25	%
Span 80	7,5	8,33	9,17	6,75	7,5	8,25	%
Nước	50	45	40	45	40,5	36	%

Về cảm quan, các công thức đều đồng nhất, trong suốt và cho ánh sáng truyền qua. Kết quả thử độ bền pha ghi nhận F4 bị tách lớp ở chu kỳ thứ 1 và F1 bị tách lớp ở chu kỳ thứ 3, các công thức còn lại đều bền vững qua 6 chu kỳ. Chọn công thức vi nhũ tương trắng là F2 để tiếp tục khảo sát do công thức này tạo được vi nhũ tương chứa hoạt chất F5 bền vững và có hàm lượng nước cao nhất, thích hợp cho quá trình gel hóa.

Xác định các tính chất của cao đã tinh chế

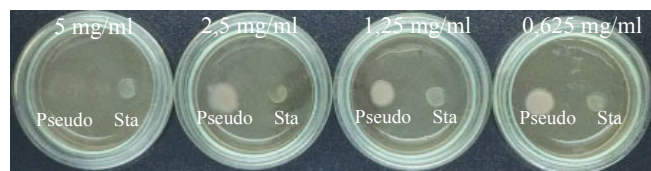
Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao RTC là 7,305 mg quercetin/1 g cao (n=3), tăng 2,8 lần so với cao khô ban đầu và ít tạp chất hơn nên cao RTC thích hợp để trực tiếp sử dụng điều chế gel vi nhũ tương.

Độ tan của cao RTC trong các chất thử nghiệm được mô tả trong bảng 2 cho thấy, vi nhũ tương làm tăng đáng kể độ tan của cao RTC so với dung môi nước. Do đó, dạng vi nhũ tương là một lựa chọn hợp lý để tải một lượng lớn thuốc vào chế phẩm.

Bảng 2. Kết quả thử độ tan cao RTC trong các dung môi (n=3).

Dung môi	Độ tan (g/ml)
Nước	0,4319
Vi nhũ tương F2	1,4546

Giá trị MIC của cao RTC đối với chủng *P. aeruginosa* ATCC 27853 là 5 mg/ml; đối với chủng *S. aureus* ATCC 29213 là trên 5 mg/ml (hình 2). Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả định tính kháng khuẩn ở phần trên và các nghiên cứu của Juliana Janet R. Martin-Puzon và cs (2015) [3].



Hình 2. Kết quả thử MIC của mẫu cao RTC trên chủng *P. aeruginosa* và *S. aureus*.

MIC của cao RTC không vượt quá khả năng tải của vi nhũ tương F2 nên có thể tạo ra gel vi nhũ tương với nồng độ cao của RTC để cho hiệu quả kháng khuẩn tối ưu.

Điều chế vi nhũ tương RDD

Điều chế 3 công thức vi nhũ tương RDD F5, F7 và F8 với các nồng độ của cao RTC lần lượt là 10, 15 và 20% (kl/kl) bằng cách cân cao RTC vào cốc rồi bổ sung vi nhũ tương F2 vừa đủ, khuấy đều bằng cá từ ở tốc độ thấp để tránh tạo bọt.

Bảng 3. Thành phần công thức vi nhũ tương RDD.

Thành phần	F5	F7	F8	Đơn vị
Cao RTC	10	15	20	%
IPM	4,5	4,25	4	%
Tween 20	37,5	35,42	33,33	%
Span 80	7,5	7,08	6,67	%
Nước cất	40,5	38,25	36	%

Cả 3 công thức đều đạt cảm quan về độ trong suốt và đồng nhất, bền qua 6 chu kỳ sốc nhiệt (bảng 3).

Tiến hành đo pH, thế zeta, cỡ hạt và phân bố cỡ hạt của F8 là công thức có nồng độ hoạt chất cao nhất, so sánh với vi nhũ tương trắng F2 được kết quả như trong bảng 4.

Bảng 4. Các thông số của công thức F2 và F8.

Công thức	pH	Kích thước giọt (average) (nm)	Chỉ số đa phân tán (PI)	Thế zeta (mV)
F2	4,28	13,8	0,295	-7,8
F8	4,42	14,1	0,089	-3,3

Kết quả cho thấy, vi nhũ tương F8 có pH gần với pH da, kích thước giọt đạt quy định về cỡ hạt của vi nhũ tương với chỉ số đa phân tán thấp, chứng tỏ sự đồng đều trong phân bố cỡ hạt. Thế zeta khá thấp vì hệ sử dụng chất điện hoạt và đồng điện hoạt không ion hóa. Giá trị thấp của thế zeta không ảnh hưởng nhiều đến tính bền của vi nhũ tương vì cơ chế ổn định chủ yếu của hệ vi nhũ là nhờ sự phối hợp giữa chất điện hoạt và đồng điện hoạt. Công thức F8 tải lượng hoạt chất nhiều nhất và đạt độ ổn định nên được chọn để phát triển thành gel vi nhũ tương.

Điều chế gel vi nhũ tương RDD

Xây dựng công thức gel thành phẩm: phối hợp F8 với các tác nhân tạo gel và so sánh với gel tạo vi nhũ tương trắng F2.

Bảng 5. Kết quả khảo sát các chất tạo gel của F2 và F8.

Chất tạo gel	F2	F8	Nồng độ khảo sát (%)
NaCMC	+	Tạo gel, không bền	5
Na alginat/calci clorid	+	Gel trong, bị vón cục	10
Carbopol 940/Triethanolamin	++	Bị tăng màu khi kiểm hóa	1,5
Gel V	++	Trong, đồng nhất	5

Ghi chú: +: tạo được gel; ++: tạo gel tốt

Kết quả bảng 5 cho thấy, tất cả các chất khảo sát đều tạo gel với vi nhũ tương trắng, nhưng khi phối hợp với F8 thì nhiều chất tạo gel tỏ ra không phù hợp. Cụ thể, gel NaCMC không bền và bị tách lớp sau 3 ngày, natri alginat tạo gel có thể chất vón không thích hợp cho sản phẩm bôi. Điều này có thể là do trong thành phần của cao RCT có chứa nhiều hợp chất chứa nhóm -OH phenol nên gây

tương kỵ với tác nhân gel hóa. Trong khi quá trình tăng độ nhớt của gel carbopol bằng kiềm làm flavonoid chế phẩm bị tăng màu. Chỉ có gel V có khả năng tạo gel ở nồng độ thấp mà không phá hủy cấu trúc vi nhũ tương. Do đó, gel V được lựa chọn để làm chất tạo gel cho công thức.

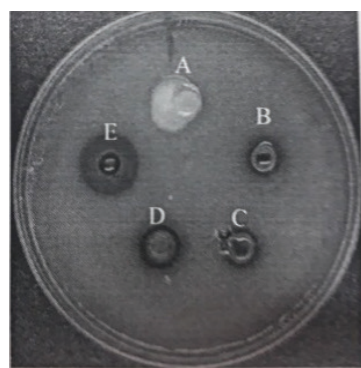
Gel V được khảo sát ở các tỷ lệ 2, 3, 4, 5 và 6% để so sánh khả năng tạo gel khi phối hợp với F8. Kết quả cho thấy, gel V ở nồng độ 5% có đặc tính tốt nhất về mặt cảm quan: gel trong suốt, thể chất phù hợp và cho ánh sáng truyền qua. Các gel ở nồng độ thấp hơn 5% không tạo được gel đặc.

Tiến hành điều chế gel vi nhũ tương từ F8 bằng cách thêm từ từ 95 g vi nhũ tương vào 5 g gel V, vừa thêm vừa khuấy đều cho đến khi gel trương nở hoàn toàn, thu được gel thành phẩm GF8 có công thức như bảng 6.

Bảng 6. Thành phần công thức gel vi nhũ tương thành phẩm GF8.

Thành phần	Khối lượng (g)
Cao RTC	20
IPM	4
Tween 20	33,33
Span 80	6,67
Nước cất	31
Gel V	5

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn in vitro của gel thành phẩm: thử nghiệm tính kháng khuẩn của GF8 trên chủng *P. aeruginosa* ATCC 27853 với chứng âm A (gel 5% của vi nhũ tương trắng F2) và chứng dương gel X. Kết quả thể hiện ở hình 3 cho thấy, chứng âm không thể hiện tính kháng khuẩn, các mẫu còn lại đều thể hiện hoạt tính kháng *P. aeruginosa* với đường kính vòng kháng khuẩn của GF8, F8 và gel X lần lượt là 10, 12 và 15 mm. Mẫu vi nhũ tương F8 có vòng kháng khuẩn rộng hơn GF8, cho thấy việc gel hóa đã làm giảm tính kháng khuẩn của chế phẩm. Điều này có thể là do quá trình gel hóa làm tăng độ nhớt chế phẩm nên giảm khả năng khuếch tán của dược chất ra môi trường thử. Chế phẩm có khả năng kháng trực khuẩn mủ xanh, tuy nhiên hoạt tính còn khá hạn chế so với chế phẩm gel X vừa chứa dịch chiết vừa chứa nano bạc.



Hình 3. Kết quả thử tính kháng *P. aeruginosa*. A. Gel vi nhũ tương trắng; B và C. Mẫu gel GF8; D. Mẫu vi nhũ tương F8; E. Gel X.

Đánh giá các đặc tính vật lý của gel thành phẩm:

Tính chất: gel trong mờ, mềm, dễ bôi lên da, dễ rửa sạch.

pH: kết quả trung bình 3 lần đo là 4,527. pH của chế phẩm hơi acid, tuy nhiên vẫn nằm trong khoảng chấp nhận được khi bôi lên da.

Độ bền pha: sau 6 chu kỳ nhiệt, mẫu gel thử không bị tách lớp và không có sự thay đổi về cảm quan.

Kết luận và đề xuất

Từ nguyên liệu cao RĐĐ không có khả năng kháng khuẩn, tiến hành tinh chế bằng ethanol 90% thu được cao RTC (độ ẩm 14,5%), hàm lượng flavonoid toàn phần 7,305 mg quercetin/1 g cao, tăng 2,8 lần so với cao khô ban đầu và có MIC là 5 mg/ml đối với chủng *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Gel vi nhũ tương GF8 điều chế từ cao RTC với hỗn hợp chất diện hoạt/chất đồng diện hoạt là tween 20/span 80 (5:1) được khảo sát các chỉ tiêu về tính chất, độ bền pha và độ đàn mỏng, có pH 4,527 phù hợp với sinh lý da; đồng thời thể hiện được hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* khi thử nghiệm trên đĩa thạch với chủng *P. aeruginosa* ATCC 27853. Tuy nhiên, hoạt tính kháng khuẩn của gel GF8 kém hơn so với vi nhũ tương chưa gel hóa F8 có thể do quá trình gel hóa làm tăng độ nhớt đã ảnh hưởng đến khả năng khuếch tán của hoạt chất. Nhưng nhờ thể chất đặc hơn F8 nên GF8 lại có khả năng bám dính cao hơn, thể hiện qua độ đàn mỏng đạt yêu cầu của chế phẩm bôi trên da.

Có thể cải tiến chế phẩm theo hướng mở rộng phổ kháng khuẩn và tăng hoạt tính bằng cách phối hợp thêm các chất kháng khuẩn mạnh (tinh dầu, nano bạc) vào thành phần công thức để đạt được hiệu quả kháng khuẩn cao hơn. Điều này vừa làm tăng hiệu quả của cao dược liệu, đồng thời giảm liều của các chất kháng khuẩn trong chế phẩm. Một hướng nữa là giảm nồng độ của chất tạo gel để làm ra gel lỏng với độ bám dính thấp hơn nhưng có thể tăng được hoạt tính kháng khuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Shi-Yuan Sheu, et al. (2014), "Recent progress in *Glinus oppositifolius* research", *Pharmaceutical Biology*, **52**(8), pp.1079-1084.
- [2] Nguyen Dinh Tu (2013), *Evaluation of antimicrobial activity of Glinus oppositifolius L.*, Trường Đại học quốc tế TP Hồ Chí Minh.
- [3] Juliana Janet R. Martin-Puzon, et al. (2015), "TLC profiles and antibacterial activity of *Glinus oppositifolius* L. Aug. DC. (Molluginaceae) leaf and stem extracts against bacterial pathogens", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **5**(7), pp.569-574.
- [4] Nguyễn Hữu Lạc Thủy và cs (2011), "Định lượng flavonoid toàn phần trong lá trinh nữ hoàng cung *Crinum latifolium* L. (Amaryllidaceae) bằng phương pháp quang phổ UV-Vis", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **15**(1), tr.90-94.
- [5] K. AsokKumar, M. UmaMaheswari (2009), "Free radical scavenging and antioxidant activities of *Glinus oppositifolius* (carpet weed) using different *in vitro* assay systems", *Pharmaceutical Biology*, **47**(6), pp.474-482.

Định loài ấu trùng *Gnathostoma* spp. từ ký chủ trung gian thứ 2 bằng phương pháp sinh học phân tử

Nguyễn Thị Thanh Thảo¹, Lê Đức Vinh¹, Nguyễn Kim Thạch^{1*},
Trần Thị Huệ Vân², Huỳnh Hồng Quang³

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

²Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

³Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn

Ngày nhận bài 25/3/2019; ngày chuyển phản biện 28/3/2019; ngày nhận phản biện 22/4/2019; ngày chấp nhận đăng 26/4/2019

Tóm tắt:

Bệnh do *Gnathostoma* spp. là bệnh động vật ký sinh, lây nhiễm vào người qua đường thực phẩm do ăn các loài ký chủ trung gian 2 chứa ký sinh trùng này còn sống hoặc tái như ếch nhái, cá lóc, lươn, rắn. Trong cơ thể người, ấu trùng được phóng thích, di chuyển và gây tác hại tại nhiều cơ quan khác nhau, đôi khi có thể dẫn đến tử vong. Nghiên cứu này thu thập ấu trùng giai đoạn 3 (AdL3) của *Gnathostoma* spp. trong thịt lươn bằng kỹ thuật tiêu cơ với dịch dạ dày nhân tạo. Sử dụng kỹ thuật PCR trên ADN ty thể chẩn đoán giống *Gnathostoma* spp. với các đoạn mồi Gn_COI đặc hiệu vùng gen *cox-1* và loài *G. spinigerum* với các đoạn mồi JB đặc hiệu vùng gen COI. Nghiên cứu bước đầu thiết lập được quy trình định loài *G. spinigerum* và các loài *Gnathostoma* spp. khác.

Từ khóa: ấu trùng giai đoạn 3, giải trình tự, *Gnathostoma* spp., ký chủ trung gian 2.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Bệnh giun *Gnathostoma* spp. ở người là do lây nhiễm động vật ký sinh từ thực phẩm. Bệnh rất phổ biến ở vùng Đông Nam Á và châu Mỹ Latin. Sự phát triển du lịch sinh thái toàn cầu cộng với khả năng lây nhiễm *Gnathostoma* spp. trên nhiều loài động vật hoang dã đã dẫn đến bệnh xuất hiện rộng khắp toàn cầu [1-7].

Trong cơ thể người, giun chỉ phát triển đến giai đoạn ấu trùng hoặc giun non. Ấu trùng giun không khu trú mà có thể di chuyển từ đường tiêu hoá qua các nội tạng hoặc ra da. Khi ấu trùng hoặc giun non di chuyển vào các cơ quan trọng yếu như não, tủy sống thì bệnh cảnh sẽ nghiêm trọng và có thể đưa đến tử vong [1, 8, 9].

Nguyên nhân chính để nhiễm *Gnathostoma* spp. vào người là do ăn các loài ký chủ còn sống hoặc tái như lươn, rắn, ếch nhái, cá lóc, cá trê và ốc. Tại Thái Lan và Việt Nam đã có các nghiên cứu về tình hình nhiễm *Gnathostoma* spp. trên lươn từ trước năm 2000 đến nay để đánh giá tình hình lưu hành mầm bệnh trong tự nhiên [3, 8]. Việc xác định mầm bệnh từ các nguồn thủy sản trên chủ yếu là tìm thấy được giai đoạn ấu trùng của giống giun *Gnathostoma* spp. mà không thể xác định được chính xác loài cụ thể nào. Điểm hạn chế này đã được khắc phục bằng kỹ thuật sinh học phân tử và các nghiên cứu đã tìm thấy loài *G. spinigerum* là tác nhân chủ yếu [7, 9]. Tuy nhiên, trên thực hành lâm sàng, nhiều bệnh nhân có các triệu chứng lâm sàng không phù hợp với loài *G. spinigerum*, đặc

biệt là với những ca ấu trùng di chuyển dưới da thì y văn ghi nhận là do *G. hispidum* nhiều hơn [4]. Điều này đồng nghĩa với việc cần nghiên cứu rõ hơn về các loài *Gnathostoma* spp. cụ thể, không dừng lại ở việc quy kết chung cho loài *G. spinigerum* [3, 7].

Gần đây, các kỹ thuật sinh học phân tử đã được trang bị tại nhiều phòng xét nghiệm ở Việt Nam đã cho phép làm rõ phân bố loài ký sinh trùng nói chung và áp dụng để xác định chính xác loài *Gnathostoma* spp. nhằm bổ sung dữ liệu về loài *Gnathostoma* spp. tại Việt Nam, đây là vấn đề hết sức cần thiết trong giai đoạn hiện nay. Với ý nghĩa đó, ở nghiên cứu này kỹ thuật PCR được sử dụng nhằm khuếch đại vùng 5.8S gen cytochrome c oxidase subunit I (COI) ty thể ở vị trí vùng trình tự gen *cox-1* để xác định giống giun *Gnathostoma* spp. của ký chủ trung gian thứ 2 [8] và vị trí vùng trình tự gen JB để xác định loài giun *G. spinigerum* [5], đồng thời giải trình tự so sánh và kiểm tra giá trị của quy trình kỹ thuật. Kết quả này sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu có quy mô lớn và sâu hơn trong việc định loài chính xác mầm bệnh [4, 6, 9].

Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và thời gian nghiên cứu

Ấu trùng giai đoạn 3 giun *Gnathostoma* spp. thu thập từ thịt lươn được bán tại chợ từ tháng 12/2018 đến tháng 3/2019. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm, Bộ môn Ký sinh y học, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.

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

Molecular biology identification of the *Gnathostoma* spp. larvae from 2nd intermediate host

Thi Thanh Thao Nguyen¹, Duc Vinh Le¹,
Kim Thach Nguyen^{1*}, Thi Hue Van Tran²,
Hong Quang Huynh³

¹Pham Ngoc Thach University of Medicine, Ho Chi Minh city

²University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh city

³Institute of Malariology Parasitology and Entomology, Quy Nhon

Received 25 March 2019; accepted 26 April 2019

Abstract:

Human gnathostomiasis is a serious food-borne parasitic zoonosis, caused mainly by eating raw or rare meat of 2nd intermediate hosts infected with *Gnathostoma* spp. parasites, including frogs, snakeheads, swamp eels, and snakes. Once getting into the human body, the advanced third-stage larvae (AdL3) can migrate and harm to many organs, or even lead to death. This study collected the AdL3 of *Gnathostoma* spp. from swamp eel muscle tissues by the artificial pepsin digestion technique. The mitochondrial DNA was amplified with the *cox-1* gene region of *Gnathostoma* spp. using Gn_COI primers and the COI gene region of *G. spinigerum* using JB primers by a PCR. This study has preliminarily established the identification process of *G. spinigerum* and other *Gnathostoma* species.

Keywords: advanced 3rd-stage larvae, *Gnathostoma* spp., sequencing, 2nd intermediate hosts.

Classification number: 3.5

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả.

Mẫu bệnh phẩm: mỗi ngày mua 1 cá thể lươn có trọng lượng từ 300-400 g/con x10 ngày. Rửa sạch, cắt lọc thịt lươn, sử dụng kỹ thuật tiêu cơ cải tiến bằng dung dịch acid dạ dày nhân tạo tìm ấu trùng giun [3].

Mầm bệnh thu được dưới dạng ấu trùng tự do hoặc trong nang. Nếu ấu trùng còn trong nang sẽ bóc tách nang, phóng thích ấu trùng tự do.

Mỗi cá thể lươn nhiễm ấu trùng chỉ thu 1 ấu trùng cho vào mẫu nghiên cứu, trường hợp cá thể lươn nhiễm nhiều ấu trùng, chọn một ấu trùng bằng cách trộn tất cả ấu trùng thu được trong một cốc dung dịch PBS bằng pipet nhựa cho ấu trùng di chuyển đều, hút ngẫu nhiên 1 ấu trùng. Rửa sạch ấu trùng bằng dung dịch PBS 3-6

lần để loại bỏ chất dư bám trên thân. Cho ấu trùng vào 1 tube và lưu giữ ở điều kiện -70°C.

Các kỹ thuật xét nghiệm

Tách chiết ADN khuôn mẫu: tách chiết ADN của 10 mẫu ấu trùng giun *Gnathostoma* spp. bằng kit tách chiết và kỹ thuật PCR của Hãng Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức. ADN được sử dụng làm khuôn tổng hợp cho kỹ thuật PCR.

Kỹ thuật PCR phát hiện gen COI định loài *G. spinigerum*: PCR nhân lượng đoạn ADN đích có kích thước bằng mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu *Gnathostoma* spp. của vùng trình tự gen *cox-1* (bảng 1) [8]. Mặt khác, PCR nhân lượng đoạn ADN đích bằng mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu *G. spinigerum* của vùng trình tự gen COI (bảng 1) [8].

Thành phần phản ứng nhân lượng PCR trong thể tích 50 µl chứa 5 µl đệm Taq (10X); 9 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl mỗi loại dNTP's (10 mM), 5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), 5 µl ADN mẫu pha loãng (20 ng). Bổ sung nước khử ion tới thể tích 50 µl theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ.

Phản ứng được thực hiện theo chu kỳ nhiệt như sau: bước 1 (95°C, 3 phút); bước 2 (94°C, 1 phút); bước 3 (55°C, 1 phút); bước 4 (72°C, 1 phút); bước 5 (72°C, 5 phút). Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 39 chu kỳ và bước 6 ở điều kiện 4°C, bảo quản mẫu. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide.

Bảng 1. Các đoạn mỗi phát hiện gen COI và ITS2.

Tên mỗi	Trình tự mỗi	Kích thước (bp)	Tài liệu tham khảo
Gn_COI F	5'-GCC TGC TTT TCG AAT TTT TAG-3'	250	Jurairat và cs [1]
Gn_COI R	5'-ACG AAA ATC ATA CTA AGT AGC CAA-3'		
JB3 F	5'-TTT TTT GAG CAT CCT GAG GTT TAT-3'	450	Charinthon và cs [9]
JB4.5 R	5'-TAA AGT AAG AAC ATA CTG AAA ATG-3'		
NEWS2	F:5'-TGTGTAGATGAAGTACG CAG-3'	600	Almeyda-Artigas và cs [8]
RIXO	R:5'-TTCTATGATTAAATT CCG GGG-3'		

Xác định loài bằng giải trình tự gen vùng ITS2: PCR nhân lượng đoạn ADN đích bằng mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu cho *Gnathostoma* spp. của vùng trình tự gen 5.8S rRNA-ITS2 (bảng 1). Thành phần phản ứng PCR trong thể tích 50 µl, trong đó có chứa: 8 µl đệm Taq (10X), 5,6 µl MgCl₂ (25 mM), 1,5 µl mỗi loại dNTP's (10 mM), 0,5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), 2 µl sản phẩm PCR bước 1. Bổ sung nước khử ion tới thể tích 50 µl theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ.

Các bước được thực hiện theo chu kỳ nhiệt như sau: bước 1 (94°C, 5 phút); bước 2 (94°C, 1 phút); bước 3 (55°C, 1 phút); bước

4 (72°C, 1 phút); bước 5 (72°C, 7 phút). Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 35 chu kỳ, bước 6 ở điều kiện 4°C, bảo quản mẫu. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide.

Sản phẩm PCR của *Gnathostoma* spp. 600 bp được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch Wizard® SV Gel theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ và được gửi đến First BASE Laboratories-Axil Scientific, Malaysia để tiến hành giải trình tự.

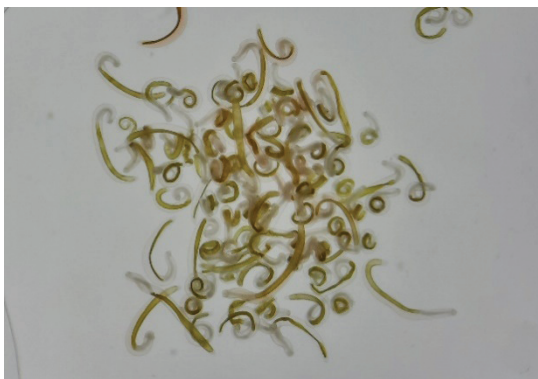
Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được nhập vào phần mềm Excel V16.0. Trình tự gen thu được sau giải trình tự được xử lý bằng phần mềm Bioedit v.2.6 (Tom Hall, 2017) và MEGA 6 (Temura, 2013). So sánh trình tự các mẫu trong nghiên cứu với trình tự *Gnathostoma* spp. đã được công bố trên ngân hàng gen trên BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) và dựng cây phân loài mối quan hệ di truyền.

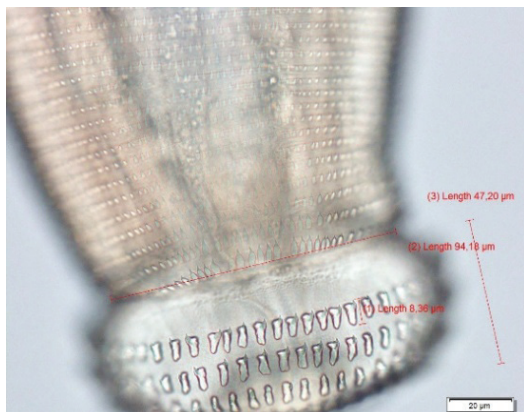
Kết quả nghiên cứu

Về hình thể ấu trùng

Ấu trùng dài 1-3 mm, màu trắng ánh vàng, đầu phình to thành vòm tròn, có 4 hàng gai nhỏ, bộ phận sinh dục còn nguyên sơ, toàn thân có nhiều gai mảnh (hình 1, 2).



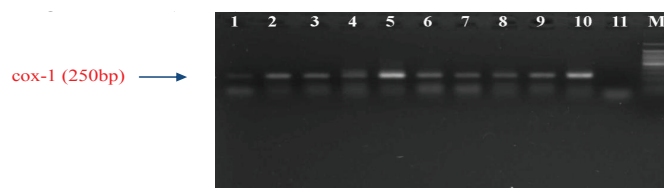
Hình 1. Ấu trùng tròn vện sau kỹ thuật tiêu cơ và gạn lọc.



Hình 2. Cấu trúc gai đầu và thân của 1 ấu trùng x100 lần.

Khảo sát mức độ biểu hiện gen *cox-1* đặc hiệu cho *Gnathostoma* spp.

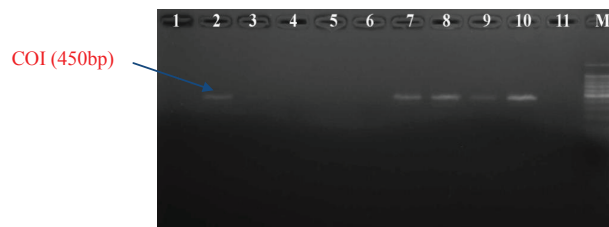
ADN tách chiết được từ 10 mẫu ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp nhân lượng PCR kích thước 250 bp gen *cox-1*. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5% (hình 3).



Hình 3. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện gen *cox-1* ở 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. bằng điện di agarose 1,5%. M: thang ADN 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng 11: chứng H_2O .

Khảo sát mức độ biểu hiện gen *COI* đặc hiệu cho *G. spinigerum*

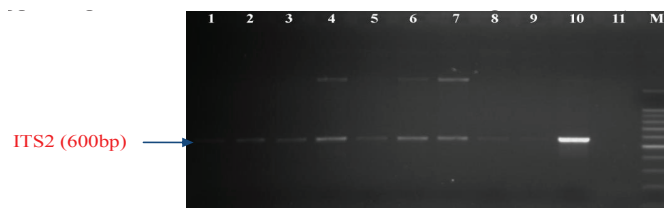
ADN tách chiết được từ 10 mẫu ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp nhân lượng PCR kích thước 450 bp vùng gen *COI* đặc hiệu cho *G. spinigerum*. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5% (hình 4).



Hình 4. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện vùng gen *COI* ở 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. bằng điện di agarose 1,5%. M: thang ADN 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng 11: chứng H_2O .

Khảo sát mức độ biểu hiện gen *5.8S rRNA-ITS2* đặc hiệu cho *Gnathostoma* spp.

ADN tách chiết được từ 10 mẫu ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp nhân lượng PCR kích thước 600 bp vùng gen *5.8S rRNA-ITS2* đặc hiệu cho *Gnathostoma* spp. Sản phẩm PCR được điện di trên bản thạch agarose 1,5% (hình 5).



Hình 5. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện vùng gen *5.8S rRNA-ITS2* ở 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. bằng điện di agarose 1,5%. M: thang ADN 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng 11: chứng H_2O .

Kết quả giải trình tự gen 5.8S rRNA-ITS2

Sau khi thực hiện tổng hợp nhân lượng PCR, tiến hành giải trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 của 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. để xác định loài. Kết quả giải trình tự so sánh bằng phần mềm Bio-edit v.7.2.6 và MEGA6 cho thấy các trình tự nucleotide 5.8S rRNA-ITS2 giống nhau ở cả 6 ấu trùng *G. spinigerum* đặc hiệu vùng gen COI ở thí nghiệm trên.

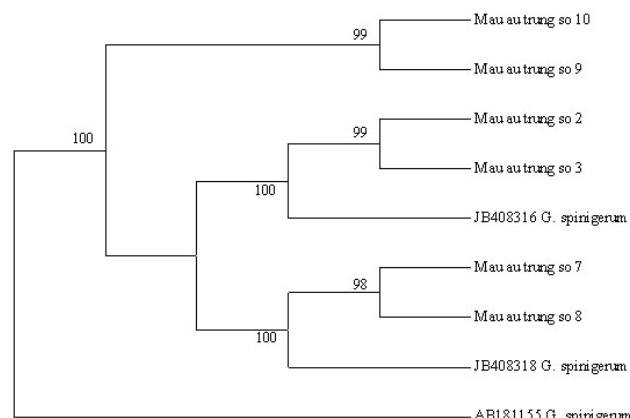
Mặt khác dùng chương trình BLAST truy cập ngân hàng gen tìm kiếm những chuỗi tương đồng đã được đăng ký. Kết quả cho thấy đoạn gen 5.8S rRNA-ITS2 của 6 mẫu ấu trùng *G. spinigerum* hoàn toàn tương đồng với ITS2 *G. spinigerum* trên thế giới (bảng 2 và hình 6A), 4 mẫu ấu trùng còn lại có 3 mẫu hoàn toàn tương đồng với ITS2 của *G. doloresi* trên thế giới và 1 mẫu hoàn toàn tương đồng với ITS2 *G. hispidum* thế giới (bảng 3 và hình 6B).

Bảng 2. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen 5.8S rRNA-ITS2 của 6 mẫu ấu trùng *G. spinigerum* và thế giới.

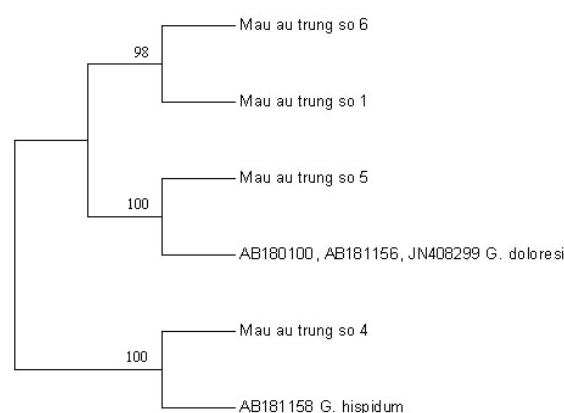
Hệ số tương đồng (%)							
Mẫu ấu trùng	2	3	7	8	9	10	Mã số gen của Ngân hàng gen thế giới
2	100	99,4	99,7	99,5	98,5	98,2	JN408316 <i>G. spinigerum</i>
3	0,6	100	98,4	98,5	99,0	98,1	JN408316 <i>G. spinigerum</i>
7	0,3	1,6	100	98,9	99,8	98,3	JN408318 <i>G. spinigerum</i>
8	0,5	1,5	1,1	100	98,3	99,7	JN408318 <i>G. spinigerum</i>
9	1,5	1,0	0,2	1,7	100	99,5	AB181155 <i>G. spinigerum</i>
10	1,8	1,9	1,7	0,3	0,5	100	AB181155 <i>G. spinigerum</i>
Mẫu ấu trùng	2	3	7	8	9	10	

Bảng 3. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen 5.8S rRNA-ITS2 của 3 mẫu ấu trùng *G. doloresi*, 1 mẫu ấu trùng *G. hispidum* và trên thế giới.

Hệ số tương đồng (%)					
Mẫu ấu trùng	1	5	6	4	Mã số gen của Ngân hàng gen thế giới
1	100	99,4	99,1	31,7	AB181156 <i>G. doloresi</i>
5	0,6	100	99,6	36,2	AB180100 <i>G. doloresi</i>
6	0,9	0,4	100	33,1	JN408299 <i>G. doloresi</i>
4	68,3	63,8	66,9	100	AB181158 <i>G. hispidum</i>
Mẫu ấu trùng	1	5	6	4	



(A)



(B)

Hình 6. Cây phát sinh loài xây dựng trên cơ sở so sánh trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 của 6 mẫu *G. spinigerum* (A), 3 mẫu *G. doloresi* và 1 mẫu *G. hispidum* (B).

Bàn luận

Nghiên cứu này đã thu được số lượng 10 mẫu theo yêu cầu đặt ra. Khảo sát về hình thể cho thấy các ấu trùng khá đồng nhất. Tất cả ấu trùng được định danh là ấu trùng giun tròn thuộc giống *Gnathostoma* spp. bởi cấu trúc hình ống với phần đầu nhô ra có 4 hàng gai vòng quanh. Cấu trúc miệng có 2 môi và gai chạy dọc theo thân. Với độ phóng đại lớn đã cho thấy rõ cấu trúc đầu của gai ở vùng thân trước, tận cùng chỉ đơn lẻ không phân chia nhánh (hình 1 và hình 2). Về phương diện hình thể, phân loài của giống *Gnathostoma* spp. sẽ dựa vào sự bố trí các hàng gai trên toàn bộ hay từng vùng của thân ấu trùng/giun và sự phân chia số lượng nhánh tại đầu tận của gai hay hình thể gai. Như vậy, việc thu thập ấu trùng và quan sát hình thể đã không thể xác định được các ấu trùng thu được trong nghiên cứu là loài *G. spinigerum* hay là loài nào khác dù rằng y văn đã ghi nhận hầu hết tác nhân gây bệnh là loài *G. spinigerum* [4].

Bước xác định giống *Gnathostoma* spp. kết quả từ hình 3 cho thấy, cặp mỗi gen cox-1 cả 10 cá thể ấu trùng *Gnathostoma* spp.

xuất hiện dải băng ADN kích thước khoảng 250 bp, đúng với kích thước theo thiết kế. Điều này một lần nữa khẳng định cả 10 ấu trùng thu được trong nghiên cứu này đều là ấu trùng *Gnathostoma* spp. vì đã được xác định bởi cả 2 phương diện hình thể học và sinh học phân tử. Đồng thời kết quả cũng cho thấy không có sự biến đổi chuyên biệt bên trong cấu trúc vùng trình tự gen *cox-1*. Như vậy, thiết kế về cặp mồi này có thể ứng dụng cho các nghiên cứu với quy mô cỡ mẫu lớn hơn, xác định có hoặc không nhiễm bệnh do giống *Gnathostoma* spp.

Tiếp sau bước định giống, nghiên cứu này tiến tới xác định loài *G. spinigerum* bởi gen COI đặc hiệu cho *G. spinigerum*. Kết quả hình 4 cho thấy, các cá thể ấu trùng *Gnathostoma* spp. tại vị trí giếng thứ 2, 3, 7, 8, 9 và 10 xuất hiện băng ADN kích thước khoảng 250 bp rõ ràng, đúng với kích thước theo lý thuyết thiết kế cho *G. spinigerum*. Như vậy, ấu trùng đã được xác định chính xác là loài *G. spinigerum* [1, 9]. Tuy nhiên, ở vị trí giếng thứ 3 dải băng ADN xuất hiện mờ hơn so với các giếng khác, có thể do hiệu suất phản ứng PCR thấp. Trường hợp này, chúng tôi nhận thấy nhiều khả năng là do kỹ thuật. Tuy nhiên, sự lặp lại thí nghiệm đã không cho kết quả khác hơn. Để lý giải điều này, bước giải trình tự gen tiếp theo sẽ chứng minh được chính xác mẫu 3 là *G. spinigerum* hay là loài khác và mức độ tương đồng của nó với ngân hàng gen như thế nào.

Kết quả giải trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 được biểu thị ở bảng 2, 3 và hình 6A, 6B khẳng định 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. thu thập được có 6/10 mẫu ấu trùng thuộc loài *G. spinigerum* tương tự kết quả thí nghiệm biểu hiện đặc hiệu gen COI ở trên. Phân tích phá hệ cho thấy, loài *G. spinigerum* của mẫu phân lập trong nghiên cứu ít có sự biến đổi về mặt di truyền, có mức độ tương đồng cao (98-100%) với loài *G. spinigerum* trên thế giới. Điểm mới trong nghiên cứu này là giải trình tự gen khẳng định có 3/10 mẫu ấu trùng thuộc loài *G. doloresi* và 1 mẫu ấu trùng thuộc loài *G. hispidum* cũng có mức độ tương đồng cao vùng trình tự gen 5.8S rRNA-ITS2 (99-100%) với thế giới đã công bố.

Chuỗi thí nghiệm trên cũng đồng thời cho thấy không có sự biến đổi chuyên biệt bên trong cấu trúc vùng trình tự gen JB. Như vậy, kỹ thuật này cho kết quả xác định loài *G. spinigerum* tốt và ổn định. Hơn nữa, khi kết chuỗi các thí nghiệm thành quy trình định loài để ứng dụng thực tế, nghiên cứu đã cho thấy có thể loại bỏ bước chẩn đoán giống *Gnathostoma* bằng sinh học phân tử bởi có sự đồng bộ cao với chẩn đoán hình thể. Vì vậy, chẩn đoán loài sẽ bao gồm các bước: định loại giống bằng hình thể, xác định loài *G. spinigerum* bằng vùng gen COI đặc hiệu bằng đoạn mồi như thiết kế trên và cuối cùng, giải trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 để xác định loài khác không phải loài *G. spinigerum*.

Trong kết quả nghiên cứu, loài *G. spinigerum*, *G. doloresi*, và *G. hispidum* chiếm tỷ lệ lần lượt là 6/10, 3/10 và 1/10 là cơ sở tham khảo bước đầu do số mẫu thực nghiệm còn nhỏ. Trong tương lai, lặp lại chuỗi thí nghiệm đã thiết lập với các mẫu thực nghiệm khác và quần thể lớn hơn, nhiều vùng địa lý hơn để xác định tỷ lệ chính xác của từng thành phần loài tương ứng nhằm bổ sung dữ liệu về phân bố loài trên các vùng khác nhau.

Kết luận

Nghiên cứu đã thực nghiệm thành công kỹ thuật chẩn đoán sinh học phân tử trên ADN ty thể giống *Gnathostoma* spp. với các đoạn mồi Gn_COI đặc hiệu vùng trình tự gen *cox-1* và *G. spinigerum* với các đoạn mồi JB đặc hiệu vùng trình tự gen COI. Hiệu quả của kỹ thuật này hoàn toàn chính xác với kết quả giải trình tự gen. Bên cạnh đó, hình thể học vẫn có giá trị tốt trong xác định giống *Gnathostoma*.

Thành phần *G. spinigerum* chiếm 6/10, *G. doloresi* chiếm 3/10 và *G. hispidum* chiếm 1/10 trong nghiên cứu thí điểm này và có sự tương đồng cao trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 với các loài trên thế giới.

Nghiên cứu cần mở rộng áp dụng quy trình đối với các mầm bệnh ký sinh trùng gây bệnh khác ở người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Jurairat, I.M. Pewpan, S. Oranuch, S. Lakkhana (2015), "Three human gnathostomiasis cases in Thailand with molecular identification of causative parasite species", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **93**(3), pp.615-618.
- [2] Lê Đức Vinh và cs (2013), "Khảo sát tình hình nhiễm *Gnathostoma* spp. trên gan lươn (*Monopterus albus*) tại chợ N. quận 10, TP Hồ Chí Minh từ tháng 3/2010- 2/2011", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **3**, tr.121-126.
- [3] Lê Đức Vinh và cs (2017), "Bước đầu thực nghiệm xây dựng quy trình tiêu cơ cải tiến trong chẩn đoán nhiễm *Gnathostoma* spp. ở lươn (*Monopterus albus*)", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **3**, tr.23-29.
- [4] Nguyễn Văn Thoại và cs (2014), "Định danh ấu trùng giai đoạn 3 *Gnathostoma* spp. thu thập trên cá lóc bông, ếch, lươn tại một số tỉnh phía nam bằng phương pháp sinh học phân tử", *Tạp chí Khoa học Công nghệ*, **1**, tr.48-54.
- [5] W. Saksirisampant, B. Wongsatayanon, Thanomsub (2012), "Positivity and intensity of *Gnathostoma spinigerum* infective larvae in farmed and wild-caught swamp eels in Thailand", *Korean J. Parasitol.*, **50**(2), pp.113-118.
- [6] Trần Thị Hồng và cs (2017), "*Gnathostoma* spp.", *Ký sinh trùng y học*, Nhà xuất bản Y học TP Hồ Chí Minh, tr.156-161.
- [7] Trần Thị Huệ Vân và cs (2018), "Chẩn đoán *Gnathostoma* spp. từ ký chủ trung gian 2 bằng kỹ thuật sinh học phân tử trên ADN ty thể", *Tạp chí Phòng chống Bệnh sốt rét và các Bệnh ký sinh trùng*, **5**, tr.40-45.
- [8] Almeyda-Artigas, R.J. Bargues, S. Mas-Coma (2000), "ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas", *Journal of Parasitology*, **86**, pp.537-544.
- [9] N. Charinthon, W.T. Jitra (2005), "Analysis of sequence variation in *Gnathostoma spinigerum* mitochondrial DNA by single-strand conformation polymorphism analysis and DNA sequence", *Parasitology International*, **54**, pp.65-68.

Khảo sát hiệu ứng của hỗn hợp selen nano/oligochitosan và *Spirulina platensis* đến số lượng bạch cầu ở chuột

Nguyễn Thị Mỹ Lan^{1*}, Võ Thị Loan Thảo¹, Quách Phương Đông¹, Đặng Văn Phú², Nguyễn Quốc Hiến²

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ

Ngày nhận bài 2/1/2019; ngày chuyển phân biên 24/1/2019; ngày nhận phân biên 13/3/2019; ngày chấp nhận đăng 22/3/2019

Tóm tắt:

Selen có vai trò quan trọng trong điều hòa miễn dịch và có ảnh hưởng tới các bệnh liên quan đến miễn dịch, đặc biệt là bệnh rối loạn bạch cầu trung tính. Bên cạnh đó, *Spirulina platensis* cũng có khả năng thúc đẩy tăng sinh các tế bào miễn dịch. Với mong muốn tạo sản phẩm góp phần thúc đẩy tăng sinh số lượng bạch cầu, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp *Spirulina platensis* và selen nano/oligochitosan đến số lượng bạch cầu trên chuột. Selen nano/oligochitosan được tổng hợp có kích thước $47,33 \pm 1,61$ nm bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 dung dịch SeO_2 /oligochitosan. Tính chất selen nano được khảo sát qua các đặc trưng: phổ UV-Vis, ảnh TEM, phổ tán sắc năng lượng EDX, phổ hồng ngoại IR. Chế phẩm selen nano được ổn định trong oligochitosan có thời gian bảo quản dưới 45 ngày (ở 4°C). Số lượng bạch cầu ở chuột tăng 1,59 lần khi sử dụng hỗn hợp selen nano/oligochitosan và *S. platensis* (với liều dùng 0,1 mg selen nano/kg/ngày và 0,1 g *S. platensis*/kg/ngày) so với đối chứng.

Từ khóa: bạch cầu (WBC), oligochitosan, selen nano (SeNPs), *spirulina*.

Chỉ số phân loại: 3.5

Mở đầu

Những năm gần đây, các bệnh liên quan đến giảm bạch cầu (giảm bạch cầu dưới $0,5 \times 10^9$ tế bào/l) ở trẻ em và người trưởng thành ngày càng tăng [1]. Có nhiều nguyên nhân gây nên hiện tượng này như: nhiễm trùng (lao, sốt xuất huyết, virus HIV), các phương pháp hóa trị, xạ trị, các bệnh liên quan đến tủy xương.

Có nhiều phương pháp để điều trị bệnh giảm bạch cầu như: điều trị nhiễm trùng bằng kháng sinh, truyền máu... Ngoài ra, còn sử dụng leukine để phục hồi đối với bệnh nhân hóa trị, xạ trị do ung thư. Trong thời gian gần đây, phương pháp kích thích bạch cầu hạt G-CSF, GM-CSF được sử dụng khá rộng rãi trong việc hỗ trợ các bệnh nhân giảm bạch cầu trung tính [2]. Tuy nhiên, các phương pháp này đều khá phức tạp.

Năm 2013, M.H. Yazdi và cộng sự nhận thấy selen nano có khả năng giúp phục hồi và có hiệu ứng gia tăng hàm lượng bạch cầu trên chuột khi chuột được chiếu xạ bởi tia X [3]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho thấy selen nano có khả năng chống oxy hóa [4], kháng virus, kháng khuẩn, phòng chống ung thư [3]. Selen nano cũng được chứng minh có khả năng tương thích sinh học hiệu quả, độc tính thấp hơn so với các dạng vô cơ và hữu cơ khác [5, 6]. Đồng thời, selen nano có phương pháp chế tạo khá đơn giản, dễ thực hiện.

Spirulina platensis và chiết xuất của nó có thể ngăn chặn hoặc ức chế ung thư ở người và động vật. *Spirulina* kích thích hệ miễn

dịch và giúp tăng cường khả năng tạo ra các tế bào máu mới của cơ thể như các bộ phận quan trọng của hệ miễn dịch, xương tủy gốc tủy, đại thực bào, tế bào T và tế bào NK. Các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn hoặc ký sinh trùng có thể được ngăn ngừa hoặc đáp ứng tốt hơn với việc điều trị và chữa lành vết thương của *S. platensis*. Các triệu chứng của thiếu máu, ngộ độc và suy giảm miễn dịch có thể được giảm bớt [7].

Với mong muốn tạo sản phẩm góp phần thúc đẩy tăng sinh số lượng bạch cầu, chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp *S. platensis* và selen nano/oligochitosan đến số lượng bạch cầu trên chuột. Mục tiêu nghiên cứu là khảo sát sự biến động số lượng bạch cầu của chuột khi cho uống kết hợp *S. platensis* và selen nano/oligochitosan nhằm hướng tới tạo thực phẩm chức năng dành cho các bệnh nhân có lượng bạch cầu thấp, như các bệnh nhân điều trị ung thư bằng các biện pháp xạ trị, hóa trị, các bệnh về nhiễm trùng, các bệnh giảm bạch cầu do đồng tủy.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu và nguyên liệu

Bột khô *S. platensis* là sản phẩm của Phòng thí nghiệm thực vật và chuyển hóa sinh học, Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

SeO_2 là sản phẩm tinh khiết (Merck, Đức), NH_4OH 5%, nước cất.

*Tác giả liên hệ: Email: ntmilan@hcmus.edu.vn.

Effect of the selenium nanoparticle/oligochitosan and *Spirulina platensis* mixture to the quantity of white blood cells in mice

Thi My Lan Nguyen^{1*}, Thi Loan Thao Vo¹,
Phuong Dong Quach¹, Van Phu Dang², Quoc Hien Nguyen²

¹University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

²Research and Development Center for Radiation Technology

Received 2 January 2019; accepted 22 March 2019

Abstract:

Selenium is important for regulating immune responses including the effects of immune-related diseases, especially neutrophil disorders. *Spirulina platensis* can also promote immune competent-cell proliferation. For these reasons, the study aims to investigate the effects of combining *S. platensis* and selenium nanoparticle/oligochitosan on white blood cell number in mice. Selenium nanoparticles (SeNPs) with the diameter of 47.33 ± 1.61 nm were synthesised by gamma Co-60 irradiation of SeO_2 /oligochitosan solution. SeNPs were characterised using UV-Vis spectroscopy, transmission electron microscope (TEM) images, energy dispersive X-ray (EDX) spectroscopy, and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Results showed that SeNPs/oligochitosan could be stored at 4°C within 45 days. The number of white blood cells in 10 days increased by 1.59 times as compared to the control mice thank to the supplementation of SeNPs/oligochitosan and *S. platensis* mixture (at a dose of 0.1 mg SeNPs/kg/day and 0.1 g *S. platensis*/kg/day).

Keywords: oligochitosan, selenium nanoparticles (SeNPs), *spirulina*, white blood cell (WBC).

Classification number: 3.5

Oligochitosan 5%, khối lượng phân tử trung bình (Mw) < 10 kDa, là sản phẩm của Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ.

Chuột bạch *Mus musculus* khỏe mạnh và có thể trọng 24-27 g do Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh cung cấp.

Các phương pháp thực nghiệm

Chế tạo selen nano/oligochitosan bằng phương pháp chiếu xạ Co-60:

- Trung hòa 80 ml oligochitosan 5% bằng dung dịch NH_4OH đến pH=7, thu được 400 ml dung dịch oligochitosan 1%. Bỏ sung 44,9 mg SeO_2 vào dung dịch thu được và khuấy 15 phút ở nhiệt độ thường thu được hỗn hợp dung dịch SeO_2 và oligochitosan 1%, pH=7.

- Chiếu xạ dung dịch SeO_2 /oligochitosan để tổng hợp selen nano. Theo Nguyen Quoc Hien, et al. (2018), với thí nghiệm có nồng độ H_2SeO_3 1,25 mM chiếu xạ với liều 10 kGy, H_2SeO_3 2,5 mM sẽ chiếu xạ liều 20 kGy [8].

- Phổ hấp thụ của oligochitosan và kết quả selen nano trong oligochitosan được xác định bằng phương pháp UV-Vis. Sử dụng pipetteman hút chính xác 1 ml vào bình định mức 10 ml, định mức bằng nước cất, lắc đều. sử dụng cuvette thạch anh, tiến hành đo dải bước sóng từ 200 đến 800 nm. Đo mẫu bằng máy UV-2401PC, Shimadzu, Nhật Bản tại Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ.

- Tiến hành chụp TEM (sử dụng máy JEM-1400, JEOL, Nhật Bản) để xác định kích cỡ và phân bố kích thước của selen nano. Dựa trên kết quả chụp TEM, tiến hành đếm khoảng 150 hạt. Sử dụng phần mềm Adobe Photoshop CS4 và Microsoft Excel 2010 để xử lý số liệu nhằm xác định kích thước cũng như sự phân bố hạt selen nano. Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm quốc gia về vật liệu polymer và composite, Trường Đại học Bách khoa TP Hồ Chí Minh.

- Tiến hành sấy phun selen nano và đo quang phổ UV-Vis.

- Sự phân bố kích thước của selen nano được xác định bằng phương pháp TEM truyền qua.

- Đo phổ hồng ngoại IR (thiết bị phổ hồng ngoại FTIR-8400S, Shimadzu, Nhật Bản) với mẫu selen nano đã sấy phun và oligochitosan 1% được sấy và nghiền mịn: cân 0,0012 g selen nano/oligochitosan và 0,17 g KBr trộn đều, ép viên và tiến hành đo IR.

- Đo EDX: mẫu sấy phun selen nano/oligochitosan được gửi đo phổ tán sắc năng lượng EDX (energy dispersive X-ray spectroscopy) bằng thiết bị JSM 6610 LA, JEOL, Nhật Bản.

Khảo sát tính ổn định của selen nano/oligochitosan ở hai điều kiện bảo quản (nhiệt độ thường và ở nhiệt độ 4°C):

- Bảo quản chế phẩm ở điều kiện: nhiệt độ thường (phòng thí nghiệm), nhiệt độ lạnh (4°C).

- Tiến hành quan sát phổ UV-Vis của chế phẩm tại ngày thứ 0, 7, 14, 21, 45.

Khảo sát ảnh hưởng bạch cầu chuột Mus musculus khi sử dụng hỗn hợp selen nano/oligochitosan và S. platensis được sử dụng ở dạng dung dịch với nồng độ 25 mg/ml:

- Chọn 27 con chuột khỏe mạnh từ 6 đến 8 tuần tuổi và có thể trọng từ 24-27 g. Chia thành 4 lô (bảng 1): lô 1: 9 con; lô 2, 3, 4: mỗi lô 6 con:

+ Lô 1 (đối chứng): chuột sử dụng nước uống là nước cất.

+ Lô 2: chuột sử dụng dịch uống selen nano/oligochitosan đã chế tạo.

+ Lô 3: chuột sử dụng dịch uống *S. platensis* (25 mg/ml).

+ Lô 4: chuột sử dụng dịch uống là dung dịch selen nano/oligochitosan và *S. platensis*.

- Cách tiến hành: cho chuột uống 1 lần/ngày, uống trong 10 ngày khảo sát với liều lượng như bảng 1.

Bảng 1. Thành phần, liều lượng sử dụng dung dịch cho uống.

Lô	Selen nano/oligochitosan	<i>Spirulina platensis</i>	
Lô 1 (đối chứng)			Chỉ sử dụng nước cất
Lô 2	2,5 µg/con/ngày		
Lô 3		2,5 mg/con/ngày	
Lô 4	2,5 µg/con/ngày	2,5 mg/con/ngày	

- Kiểm tra số lượng bạch cầu chuột tại các ngày 0, 5, 10:

+ Ngày 0: Lấy mẫu máu của 3 con lô đối chứng.

+ Ngày 5: 3 con/lô để lấy mẫu máu.

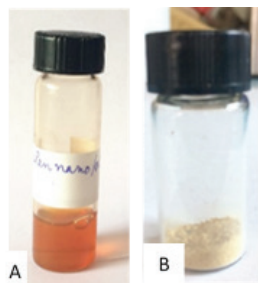
+ Ngày 10: 3 con/lô để lấy mẫu máu.

Mẫu máu được thu và đếm số lượng bạch cầu tại Viện Sốt rét

- Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh.

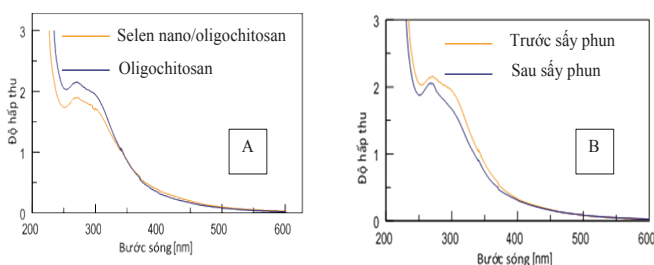
Kết quả và thảo luận

Chế tạo selen nano/oligochitosan bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60



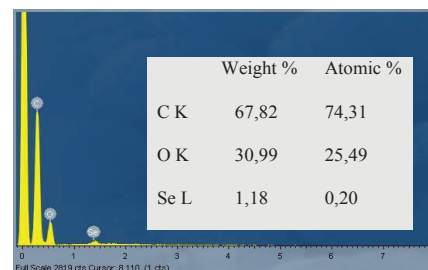
Hình 1. Dung dịch selen nano/oligochitosan sau khi chiếu xạ (A) và sau khi sấy phun (B).

Sau khi chiếu xạ selen nano/oligochitosan với liều 10 kGy, dung dịch Se^{4+} bị khử thành Se^0 bằng tia gamma Co-60, dung dịch trong suốt có màu đỏ (hình 1), kết quả màu sắc, kích thước hạt tương tự với nghiên cứu của Nguyen Quoc Hien, et al. đã công bố năm 2018 [8].



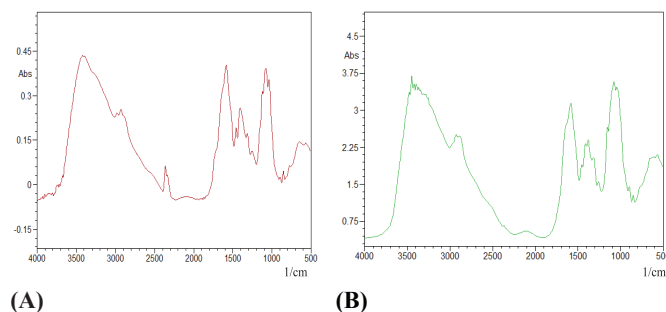
Hình 2. Phổ UV-Vis của hỗn hợp selen nano/oligochitosan và oligochitosan (A); selen nano/oligochitosan trước và sau khi sấy phun (B).

Tiến hành đo UV-Vis (200-800 nm) ta nhận thấy đỉnh của selen nano/oligochitosan chính là đỉnh của oligochitosan tại bước sóng 271 nm. Phổ UV-Vis trước và sau khi sấy phun selen nano/oligochitosan không thay đổi, với đỉnh là 271 cm^{-1} (hình 2). Do đó, sấy phun mẫu không làm thay đổi đặc tính của selen nano/oligochitosan.



Hình 3. Phổ EDX của mẫu sấy phun selen nano/oligochitosan.

Phổ EDX (hình 3) cho thấy, selen nano/oligochitosan chỉ chứa ba nguyên tố là selen (1,18%), carbon (67,82%) và oxy (30,99%). Do đó, có thể kết luận bột selen nano/oligochitosan được sấy phun từ selen nano/oligochitosan được tổng hợp bởi chiếu xạ tia gamma Co-60 có độ tinh khiết cao với thành phần chỉ có selen nano và oligochitosan.



Hình 4. Phổ IR của selen nano/oligochitosan (A) và oligochitosan sau khi sấy phun (B).

Phổ FT-IR của selen nano/oligochitosan (hình 4A) tương tự như phổ FT-IR của oligochitosan (hình 4B). Trong phổ của oligochitosan, ở cường độ hấp thụ 3421 cm^{-1} là do dao động kéo dài O-H, trong khi các cường độ hấp thụ tại 2927, 2885 và 1583 cm^{-1} tương ứng với các dao động kéo dài của C-H, C-C và các nhóm C-N, tương ứng.

Sự xuất hiện của các đỉnh trong phổ của selen nano/oligochitosan xác nhận sự hiện diện của chitosan trên bề mặt của selen nano. Hơn nữa, đỉnh đặc trưng của nhóm -OH trong selen nano/oligochitosan tương đối thấp hơn so với oligochitosan (3417 cm^{-1}), với đường dịch chuyển màu đỏ. Từ đó cho thấy oligochitosan được liên kết với bề mặt của selen nano qua nhóm -OH.

Kết quả này tương tự với kết quả của Yu, et al. (2012), đỉnh của chitosan là 3430 cm^{-1} và khi tạo thành chế phẩm cũng có cường độ hấp thụ là $3426,2 \text{ cm}^{-1}$ [9]. Tuy nhiên, kết quả đỉnh đặc trưng của phổ FT-IR có khác so với nghiên cứu của Yu, et al. do sử dụng oligochitosan nên cường độ hấp thụ đặc trưng có sự khác nhau so với phổ chitosan.

Khảo sát tính ổn định của selen nano/oligochitosan ở hai điều kiện bảo quản: nhiệt độ thường và ở 4°C

Bảo quản dung dịch selen nano/oligochitosan:

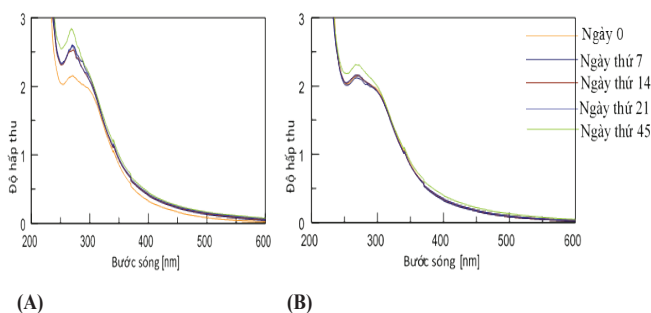
- Ở nhiệt độ thường sau 21 ngày: dung dịch bắt đầu đục.
- Bảo quản lạnh (4°C) sau 45 ngày: dung dịch bắt đầu đục.

Nhiệt độ thường: đỉnh của phổ UV ổn định tại ngày thứ 7, 14, 21 (với đỉnh 271 nm) và giảm dần ở ngày thứ 45 (với đỉnh 266 nm) (hình 5A).

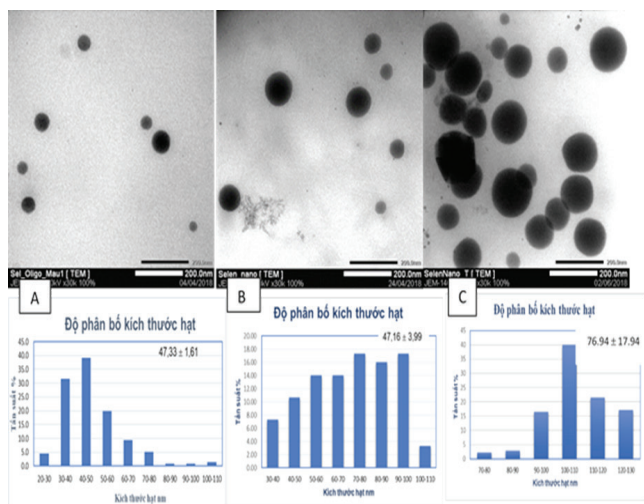
Nhiệt độ lạnh: đỉnh của phổ UV-Vis ổn định tại ngày thứ 7, 14, 21 (với đỉnh là 271 nm) và bắt đầu giảm tại ngày 45 (với đỉnh 267 nm) (hình 5B).

Tại ngày thứ 21, đỉnh của phổ là 271 nm không thay đổi so với ban đầu nhưng màu sắc đã trở đục.

Vậy mẫu selen nano/oligochitosan đã có sự biến đổi. Kết quả cho thấy có sự giảm kích thước đỉnh sau 45 ngày ở cả 2 điều kiện nhiệt độ, điều này là do có hiện tượng kết cụm của các hạt selen nano làm thay đổi cấu trúc bao quanh (oligochitosan) dẫn đến sự thay đổi phổ UV-Vis của oligochitosan (selen nano/oligochitosan).



Hình 5. Đồ thị thể hiện phổ UV-Vis ở nhiệt độ thường (A) và nhiệt độ lạnh (B).

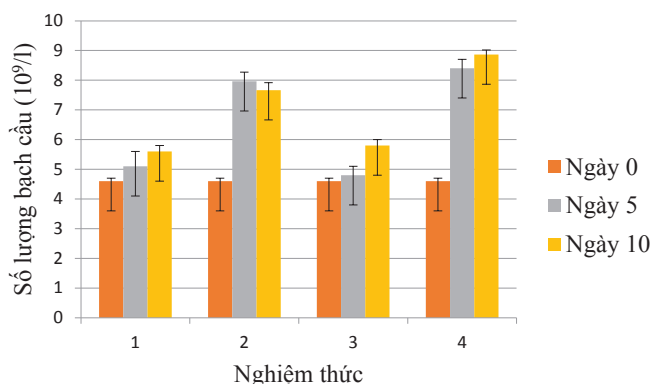


Hình 6. Ảnh TEM của mẫu: chế tạo (A), đã sấy phun (B), sau bảo quản (C).

Tiến hành đo kích thước hạt sau 45 ngày bảo quản, nhận thấy kích thước hạt tăng từ $47,16 \pm 3,99$ đến $76,94 \pm 17,94$ (gấp 1,6 lần kích thước ban đầu) (hình 6). Nguyên nhân là do selen nano có xu hướng kết cụm với nhau làm tăng kích thước hạt.

Như vậy, dung dịch selen nano/oligochitosan có thể bảo quản ở nhiệt độ thường là dưới 21 ngày và nhiệt độ lạnh là dưới 45 ngày.

Khảo sát hiệu ứng của hỗn hợp selen nano/oligochitosan và *S. platensis* đến số lượng bạch cầu chuột *Mus musculus*



Hình 7. Biểu đồ thể hiện số lượng bạch cầu theo các thí nghiệm.

Thí nghiệm 1: nước cất; thí nghiệm 2: selen nano/oligochitosan (2,5 $\mu g/con/ngày$); thí nghiệm 3: *S. platensis* (2,5 $mg/con/ngày$); thí nghiệm 4: selen nano/oligochitosan 2,5 $\mu g/con/ngày$ và *S. platensis* (2,5 $mg/con/ngày$).

- Từ hình 7 nhận thấy, đối chứng sử dụng nước cất có số lượng bạch cầu tăng nhưng không đáng kể, có thể là do quá trình tăng trưởng của chuột có sự biến đổi số lượng, hàm lượng bạch cầu. Kết quả đối chứng tương tự với nghiên cứu của Yazdi, et al. đã công bố năm 2013 là $5,99.10^9$ tế bào/l ở mẫu đối chứng và hầu như không thay đổi sau 30 ngày khảo sát [3].

- Sự khác biệt về số lượng bạch cầu chuột giữa các thí nghiệm 1, 2, 3 và 4 là có ý nghĩa với độ tin cậy >95%. Sự khác biệt về số lượng bạch cầu chuột ở các thời điểm khảo sát 0 ngày, 5 ngày và 10 ngày trong từng cặp thí nghiệm 1, 2, 3 và 4 là có ý nghĩa với độ tin cậy >95%.

- Ở thí nghiệm chuột sử dụng dung dịch selen nano/oligochitosan (hình 7), tại ngày thứ 5 có hiện tượng tăng mạnh hàm lượng bạch cầu từ $5,1.10^9$ tế bào/l đến $8,3.10^9$ tế bào/l (tăng khoảng 1,63 lần so với đối chứng). Đến ngày thứ 10, tiến hành xét nghiệm công thức máu thì hàm lượng bạch cầu là $7,7.10^9$ tế bào/l (tăng 1,38 lần so với đối chứng) - hàm lượng bạch cầu vẫn tăng so với ban đầu (trước khi cho uống). Tuy nhiên, số lượng bạch cầu có biến động so với ngày thứ 5, có thể do khả năng hấp thụ selen của từng con chuột khác nhau dẫn đến hàm lượng bạch cầu tăng nhưng không tuyến tính. Vậy sau 10 ngày, số lượng bạch cầu vẫn tăng sau khi sử dụng dung dịch selen nano/oligochitosan. Hàm lượng bạch cầu tăng ở chuột nhưng vẫn nằm trong giới hạn bình thường và chuột không có biểu hiện bệnh lý. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Shakibaie, et al. (2013), cho thấy khả năng tăng hàm lượng bạch cầu khi sử dụng selen nano [10]. Nghiên cứu của

Sirous, et al. (2012) trên cừu trong 10 ngày khảo sát cũng cho số lượng bạch cầu tăng 1,14 lần so với đối chứng với liều là 1 mg selen/kg/ngày [11].

- Ở nghiệm thức chuột sử dụng *S. platensis*, số lượng bạch cầu của chuột tại ngày thứ 5 và thứ 10 không thay đổi so với lô đối chứng (sử dụng nước cất). Tương đồng với nghiên cứu của Selmi và cộng sự (2011), hàm lượng bạch cầu trên chuột chỉ tăng từ giai đoạn 6 tuần sau khi sử dụng [12].

- Ở nghiệm thức chuột sử dụng *S. platensis* và kết hợp selen nano cho thấy số lượng bạch cầu của lô tăng mạnh trong 5 ngày cho uống là $8,4.10^9$ tế bào/l và có xu hướng tăng đến ngày thứ 10 là $8,9.10^9$ tế bào/l. Vậy khi kết hợp *Spirulina* và selen nano/oligochitosan có xu hướng làm bạch cầu của chuột tăng mạnh - 1,65 lần so với đối chứng (ngày 5) và có xu hướng tăng đến ngày thứ 10 là $8,9.10^9$ tế bào/l (tăng 1,06 lần so với ngày thứ 5 và 1,59 lần so với đối chứng). Có thể thấy rằng, khả năng kết hợp của hỗn hợp selen nano/oligochitosan và *S. platensis* có xu hướng làm tăng số lượng bạch cầu chuột sau 10 ngày sử dụng.

- Qua thử nghiệm nhận thấy rằng, selen nano/oligochitosan làm gia tăng hàm lượng bạch cầu trên chuột, sự kết hợp của hai dung dịch sinh khối *S. platensis* và selen nano/oligochitosan làm tăng mạnh hàm lượng bạch cầu trên chuột. Tuy nhiên khả năng hấp thụ selen nano hay *S. platensis* còn phụ thuộc vào khả năng hấp thụ khác nhau của từng con chuột.

Kết luận

- Đã tạo thành công chế phẩm selen nano/oligochitosan và sinh khối *S. platensis* dạng dung dịch uống và thử nghiệm ảnh hưởng của hỗn hợp này đến số lượng bạch cầu ở chuột.

- Thời gian bảo quản chế phẩm selen nano/oligochitosan: ở nhiệt độ thường là dưới 21 ngày, ở 4°C là dưới 45 ngày.

- Chế phẩm selen nano/oligochitosan làm tăng số lượng bạch cầu trên chuột là 1,38 lần so với đối chứng sau 10 ngày sử dụng với liều dùng 0,1 mg/kg/ngày.

- Sinh khối *S. platensis* không làm thay đổi số lượng bạch cầu trên chuột trong 10 ngày sử dụng với liều dùng 0,1 g/kg/ngày.

- Hỗn hợp chế phẩm selen nano/oligochitosan và sinh khối *S. platensis* làm tăng số lượng bạch cầu chuột lên 1,59 lần so với đối chứng (selen nano/oligochitosan 0,1 mg/kg/ngày, sinh khối *S. platensis* 0,1 g/kg/ngày).

- Nghiên cứu bước đầu cho thấy có sự tương tác giữa các thành phần của hỗn hợp chế phẩm selen nano/oligochitosan và sinh khối *S. platensis* khi kết hợp với nhau. Các thành phần tạo nên tác dụng làm tăng số lượng bạch cầu chuột cao hơn hẳn khi kiểm tra tác dụng của từng thành phần riêng lẻ. Điều này cho thấy nghiên cứu hứa hẹn khả năng ứng dụng cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. Lakshman, A. Finn (2001), "Neutrophil disorders and their management", *Journal of Clinical Pathology*, **54**(1), pp.7-19.
- [2] G. Cartron, L.Z. Yang, M. Baudard, T. Kanouni, V. Rouillé, P. Quittet, B. Klein, J.F. Rossi (2008), "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: results of a phase II study", *Journal of Clinical Oncology*, **26**(16), pp.2725-2731.
- [3] M.H. Yazdi, M. Masoudifar, B. Varastehmoradi, E. Mohammadi, E. Kheradmand, S. Homayouni, A.R. Shahverdi (2013), "Effect of oral supplementation of biogenic selenium nanoparticles on white blood cell profile of BALB/c mice and mice exposed to X-ray radiation", *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, **5**(3), pp.158-167.
- [4] H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew (2003), "The antioxidant role of selenium and seleno-compounds", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **57**(3-4), pp.134-144.
- [5] S. Chhabria, K. Desai (2016), "Chapter: Selenium Nanoparticles and Their Applications", *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publisher, pp.1-32.
- [6] M.P. Rayman, D. Phil (2000), "The importance of selenium to human health", *The Lancet*, **356** (9225), pp.233-241.
- [7] Z.H. Lin, C.R. Chris Wang (2005), "Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles", *Materials Chemistry and Physics*, **92**(2-3), pp.591-594.
- [8] Nguyen Quoc Hien, Phan Dinh Tuan, Dang Van Phu, Le Anh Quoc, Nguyen Thi Kim Lan, Nguyen Ngoc Duy, Tran Thai Hoa (2018), "Gamma Co-60 ray irradiation synthesis of dextran stabilized selenium nanoparticles and their antioxidant activity", *Materials Chemistry and Physics*, **205**, pp.29-34.
- [9] B. Yu, Y. Zhang, W. Zheng, C. Fan, T. Chen (2012), "Positive surface charge enhances selective cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles", *Inorganic Chemistry*, **51**(16), pp.8956-8963.
- [10] M. Shakibaie, A.R. Shahverdi, M.A. Faramarzi, G.R. Hassanzadeh, H.R. Rahimi, O. Sabzevari (2013), "Acute and subacute toxicity of novel biogenic selenium nanoparticles in mice", *Pharmaceutical Biology*, **51**(1), pp.58-63.
- [11] S. Sirous, A.K. Gholam, M. Abdonnaser (2012), "Nanoparticles of selenium as species with stronger physiological effects in sheep in comparison with sodium selenite", *Biological Trace Element Research*, **146**(3), pp.302-308.
- [12] C. Selmi, P.S. Leung, L. Fischer, B. German, C.Y. Yang, T.P. Kenny, G.R. Cysewski, M.E. Gershwin (2011), "The effects of *Spirulina* on anemia and immune function senior citizens", *Cellular & Molecular Immunology*, **8**(3), pp.248-254.

Nuôi cấy *in vitro* đốt thân cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi)

Lê Thị Tâm Hồng¹, Lê Thị Thủy Tiên², Trần Văn Minh^{1*}

¹Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 23/10/2018; ngày chuyển phản biện 25/10/2018; ngày nhận phản biện 20/11/2018; ngày chấp nhận đăng 6/12/2018

Tóm tắt:

Cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi) được coi là một dược liệu quý giúp phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư; có tác dụng làm giảm kích thước và sự phát triển của các khối u, bướu; và một số công dụng khác. Việc ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô thực vật trong bảo tồn và phát triển cây Xạ đen là cần thiết nhằm phát triển nguồn dược liệu quý của vùng nhiệt đới, phục vụ nhu cầu nâng cao sức khỏe nhân dân. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật nuôi cấy đoạn thân *in vitro* đã được sử dụng trong thời gian theo dõi là 12 tuần. Đoạn thân cây con trồng trong bầu đất được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy ban đầu. Môi trường khoáng thích hợp cho quá trình nuôi cấy đoạn thân là 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l). Môi trường thích hợp cho vi nhân giống đoạn thân là 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l) cho tỷ lệ tạo chồi 97,20%, số chồi là 1,22 chồi/đốt, chiều cao chồi 116,67 mm và số lá là 8 lá/chồi. Vị trí đoạn thân đưa vào nuôi cấy có ảnh hưởng đến quá trình nhân giống, đoạn thân ở vị trí từ 1 đến 4 có sinh trưởng chồi không sai khác về thống kê so với chồi ngọn trên môi trường nhân giống. Nuôi cấy tạo rễ thích hợp trên môi trường 1/2MS có bổ sung IBA (0,25 mg/l) đạt chiều cao chồi 113,33 mm, số rễ 5,40 rễ/chồi và chiều dài rễ 10,33 mm. Khảo sát động thái sinh trưởng cho thấy, chồi *in vitro* phát triển đến tuần thứ 10 đạt chiều cao 95,00 mm. Nghiên cứu ảnh hưởng của số lần cấy chuyển đến nhân giống *in vitro* cho thấy, sau lần cấy chuyển thứ 6, sinh trưởng cây *in vitro* chậm lại, có chiều cao của chồi 90,33 mm và số lá 6,33. Cây cấy mô trồng trong bầu đất sinh trưởng bình thường, sau 8 tháng đạt chiều cao thân 25,6 cm.

Từ khóa: bảo tồn, đốt thân, *in vitro*, nuôi cấy mô, vi nhân giống, Xạ đen.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Theo Tổ chức Y tế thế giới [1], ung thư là nguyên nhân gây tử vong thứ hai trên toàn cầu. Trong hơn 4000 loài thực vật được sử dụng làm dược liệu trong y học cổ truyền ở Việt Nam, cây Xạ đen được biết đến rộng rãi với tác dụng hỗ trợ điều trị ung thư.

Cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi) còn được gọi là cây đốt, dây gối Ấn Độ hoặc dây gối bắc. Gần đây, cây Xạ đen được xác định là *Ehretia asperula* Zoll. et Mor., họ vôi vôi (Boraginaceae) [2]. Trong cây Xạ đen có các hoạt chất flavonoid, quinone (có tác dụng phòng chống ung thư và làm cho tế bào ung thư hóa lỏng dễ tiêu), hợp chất saponin triterpenoid (có tác dụng chống nhiễm khuẩn), cây Xạ đen dùng để điều trị lở loét, kháng u và tiêu viêm [3], ung thư [4, 5]; được phân bố ở một số nước như Trung Quốc, Việt Nam, Myanmar, Thái Lan. Ở Việt Nam, phân bố chủ yếu ở vùng núi phía Bắc, đặc biệt ở các tỉnh Hòa Bình, Sơn La, Quảng Ninh, Nam Định và Quảng Bình [6].

Hiện nay, phương pháp nhân giống cây Xạ đen chủ yếu là giâm hom, cho số lượng cây giống còn hạn chế, mang nhiều bệnh từ cây mẹ. Các đề tài nghiên cứu quốc tế trên cây Xạ đen mới chỉ tập trung vào phân tích và khảo sát hoạt chất sinh học, trong khi số lượng nghiên cứu về nuôi cấy mô thực hiện trên

đối tượng Xạ đen còn hạn chế. Do vậy, nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật trong khâu nhân giống cây Xạ đen có ý nghĩa thiết thực, góp phần bảo tồn và phát triển vùng sản xuất nguyên liệu Xạ đen.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu: cây Xạ đen cao 30 cm có nguồn gốc ở Hòa Bình. Các cành non được sử dụng trong nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy: môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), 1/2MS, WPM (Woody Plant Medium), B5 (Gamborg B5). Môi trường được bổ sung các chất sinh trưởng BA (6-benzylaminopurine), NAA (α -naphthaleneacetic acid), IAA (Indole-3-acetic acid) và IBA (Indole-3-butyric acid); nước dừa (5%), đường sucrose (30 g/l), than hoạt tính (1 g/l), agar (0,8%). Môi trường nuôi cấy được chỉnh ở pH 5,8 và được khử trùng ở 121°C, áp suất 1 at.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng 24±2°C, cường độ bức xạ tại độ cao 350 mm: 22 μ mol/m²/s, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, độ ẩm tương đối 65%.

*Tác giả liên hệ: Email: drminh.ptntd@yahoo.com

In vitro nodal culture technique of *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi

Thi Tam Hong Le¹, Thi Thuy Tien Le²,
Van Minh Tran^{1*}

¹International University, Vietnam National University Ho Chi Minh city

²University of Technology, Vietnam National University Ho Chi Minh city

Received 23 October 2018; accepted 6 December 2018

Abstract:

Ehretia asperula Zollinger et Moritzi has been known as a valuable medicinal plant due to the ability to prevent and treat cancers, and reduce the expansion of tumours, etc. The application of plant tissue culture in preservation and development of *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi is necessary to enlarge the medicine sources of tropical areas for improving human health. The *in vitro* node culture technique was applied, and the duration for carrying the experiments and recording data was 12 weeks. The nodes from the soil inoculated plantlets were used as explants. The appropriate medium for node culture was the half-strength MS supplemented with BA 0.1 mg/l, which showed the shoot induction rate at 97.20%, number of shoot/node as 1.22, shoot length of 116.67 mm, and number of leaves/shoot as 8.00. The node position affected the micropropagation of the plant. The nodes from the uppermost position to the fourth one had the shoot proliferation insignificantly different to those from the shoot terminal bud. The medium sufficient for rooting of this plant species was the half strength MS supplemented with IBA 0.25 mg/l; as the result, the shoot length was 113.33 mm, the root number was 5.44 roots/shoot, and the root length was 10.33 mm. Investigation of the growth dynamics showed that the *in vitro* shoot at the week 10 of culture reached 95.00 mm shoot length. By investigating the effect of subculture generation on shoot proliferation, after the 6th subculture, the *in vitro* plant growth was retarded, with the shoot length of 90.33 mm and leave number of 6.33 leaves/shoot. Acclimatised plantlets grew well and reached 25.6 cm plant height after 8 months.

Keywords: conservation, *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi, *in vitro*, micropropagation, node, tissue culture.

Classification number: 4.1

Điều kiện vườn ươm ra cây bầu đất: che nắng trong thời gian một tháng, nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 100% (có phun sương). Cơ chất trong bầu đất: 1/3 đất sạch + 1/3 tro trấu + 1/3 phân hữu cơ hoai.

Phương pháp

Bố trí thí nghiệm: bố trí ngẫu nhiên theo khối đầy đủ, với 3 lần lặp lại, mỗi lần nuôi cấy 3 bình, mỗi bình cấy 4 mẫu. Số liệu được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy và được phân tích ANOVA (single factor) bằng phần mềm SPSS 20.0

Vô trùng mẫu: đốt thân cây Xạ đen có kích thước 2 cm được khử trùng bề mặt với cồn 70% trong 2 phút, Javen 10% trong 20 phút, HgCl_2 0,1% trong 5 phút. Sau một tuần nuôi cấy, loại bỏ mẫu nhiễm, những mẫu sạch được sử dụng để tiến hành thí nghiệm.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), chiều cao chồi (mm), số lá, chiều dài lá (mm), chiều dài rễ (mm), số rễ, số chồi, hệ số nhân giống

Thiết kế thí nghiệm:

Thí nghiệm 1: ảnh hưởng của môi trường khoáng đến tái sinh chồi *in vitro*: mẫu nuôi cấy là đoạn thân non 2 cm, được nuôi cấy vào các môi trường khác nhau gồm MS, 1/2MS, WPM và B5, có bổ sung BA (0,1 mg/l).

Thí nghiệm 2: ảnh hưởng của các nồng độ BA khác nhau đến nhân giống Xạ đen *in vitro*: mẫu nuôi cấy là đoạn thân non 2 cm, được nuôi cấy vào môi trường 1/2MS, có bổ sung BA (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l).

Thí nghiệm 3: ảnh hưởng của vị trí đoạn thân đến nhân giống *in vitro*: đốt thân ở vị trí chồi ngọn, đoạn thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư, có kích thước 2 cm, được nuôi cấy vào môi trường 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l).

Thí nghiệm 4: ảnh hưởng của auxin đến hình thành rễ: chồi *in vitro* có kích thước 2 cm, được nuôi cấy vào môi trường 1/2MS, có bổ sung các loại auxin (NAA, IAA và IBA) ở các nồng độ khác nhau mỗi chất (0,1; 0,25; 0,5 và 1,0 mg/l) để theo dõi khả năng tạo rễ.

Thí nghiệm 5: động thái sinh trưởng của chồi *in vitro*: đoạn thân có kích thước 2 cm, được nuôi cấy vào môi trường 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l).

Thí nghiệm 6: ảnh hưởng của số lần cấy chuyển đến nhân chồi trực tiếp từ đoạn thân: mẫu nuôi cấy là đốt thân thể hệ F1, F2, F3, F4, F5, F6 có kích thước 2 cm; được cấy vào môi trường 1/2MS bổ sung BA (0,1 mg/l).

Thí nghiệm 7: sinh trưởng và phát triển của cây đưa ra bầu đất: chồi cao 10 cm đã hình thành rễ được chuyển sang nuôi trồng trong bầu đất, với cơ chất: 1/3 đất + 1/3 tro trấu + 1/3 phân hữu cơ hoai. Kết quả thí nghiệm được theo dõi 1 lần/

tháng trong vòng 8 tháng (tháng 11/2017-6/2018).

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực vật, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh trong thời gian 2017-2018.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến tái sinh chồi *in vitro*

Đoạn thân cây trồng trong bầu đất 2 cm được nuôi cấy trong môi trường 1/2MS và WPM có bổ sung BA (0,1 mg/l) cho tỷ lệ tạo chồi và chiều cao chồi khác nhau không có ý nghĩa ($p < 0,05$), phát triển tốt hơn trên hai môi trường MS và B5. Môi trường 1/2MS thích hợp cho việc tái sinh chồi cây Xạ đen *in vitro*, với tỷ lệ tạo chồi đạt 97%, chiều cao chồi 121 mm, số lượng lá 8 lá/chồi và chiều dài lá 13,33 mm sau 12 tuần nuôi cấy (bảng 1). Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của môi trường khoáng đến tái sinh chồi *in vitro* tương tự như kết quả của Tạ Như Thực Anh và Nguyễn Thị Bích Thu [7] nuôi cấy cây Xạ đen (*Ehretia asperula*) thích hợp trên môi trường MS có bổ sung BA hay kinetin (0,1-0,5 mg/l); Phulwaria và Shekhawat [8] tái sinh mô sẹo *Arnebia hispidissima* (Boraginaceae) trên môi trường MS có bổ sung BA (3,33 μ M) và 2,4D (4,52 μ M); Malik và đồng tác giả [9] nuôi cấy lá non *in vitro* *Arnebia euchroma* (Boraginaceae) tái sinh chồi trực tiếp trên môi trường MS có bổ sung TDZ (20 μ M).

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến tái sinh chồi Xạ đen *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Môi trường khoáng	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (mm)	Số lá (/chồi)	Chiều dài lá (mm)
NT1	MS	82,67 $\pm$ 5,03 ^{ab}	66,00 $\pm$ 13,12 ^a	4,33 $\pm$ 0,58 ^a	7,00 $\pm$ 1,00 ^a
NT2	1/2MS	97,00 $\pm$ 2,65 ^c	121,00 $\pm$ 9,6 ^b	8,00 $\pm$ 1,00 ^b	13,33 $\pm$ 1,16 ^c
NT3	WPM	90,67 $\pm$ 6,11 ^{bc}	102,67 $\pm$ 6,43 ^b	5,33 $\pm$ 1,53 ^a	11,00 $\pm$ 1,00 ^b
NT4	B5	77,33 $\pm$ 5,03 ^a	77,00 $\pm$ 8,55 ^a	3,33 $\pm$ 1,53 ^a	6,67 $\pm$ 1,16 ^a
ANOVA		**	**	**	**
CV (%)		6,47	12,27	26,94	13,13

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của các nồng độ BA khác nhau đến nhân giống Xạ đen *in vitro*

Đoạn thân chồi *in vitro* 2 cm được nuôi cấy trên môi trường 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l), chồi phát triển mạnh nhất so với các nồng độ còn lại, đạt chiều cao chồi 116,67 mm, 8 lá/chồi, chiều dài 12,67 mm (bảng 2). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Sahoo và Chand [10] khi nuôi cấy đoạn thân cây hoàng kinh (*Vitex negundo*) trên môi trường MS có bổ sung BA (2 mg/l) cho quá trình cảm ứng tạo chồi; Tạ Như Thực Anh và Nguyễn Thị Bích Thu [7] nuôi cấy tạo cụm chồi cây Xạ đen (*Ehretia asperula*) trên môi trường MS có bổ sung BA (0,3 mg/l) hay kinetin (0,5 mg/l).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến nhân giống Xạ đen *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	BA (mg/l)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi (/đốt thân)	Chiều cao chồi (mm)	Số lá (/chồi)	Chiều dài lá (mm)
Đ/C	0,00	51,80 $\pm$ 4,47 ^a	0,40 $\pm$ 0,08 ^a	80,67 $\pm$ 11,02 ^d	3,33 $\pm$ 0,58 ^{ab}	6,00 $\pm$ 1,00 ^{ab}
NT1	0,05	61,37 $\pm$ 3,68 ^{ab}	0,55 $\pm$ 0,09 ^{ab}	85,00 $\pm$ 10,00 ^d	4,67 $\pm$ 0,58 ^{bc}	10,33 $\pm$ 1,53 ^c
NT2	0,10	97,20 $\pm$ 2,50 ^d	1,22 $\pm$ 0,04 ^c	116,67 $\pm$ 7,64 ^c	8,00 $\pm$ 1,00 ^d	12,67 $\pm$ 1,16 ^d
NT3	0,20	91,60 $\pm$ 4,08 ^d	1,07 $\pm$ 0,06 ^{bc}	104,00 $\pm$ 8,55 ^c	5,67 $\pm$ 0,58 ^c	9,67 $\pm$ 0,58 ^c
NT4	0,40	94,20 $\pm$ 5,14 ^d	1,02 $\pm$ 0,19 ^{cd}	76,67 $\pm$ 7,64 ^{cd}	4,33 $\pm$ 0,58 ^b	7,00 $\pm$ 1,00 ^b
NT5	0,60	88,40 $\pm$ 10,74 ^d	0,89 $\pm$ 0,06 ^{bc}	65,67 $\pm$ 6,03 ^{bc}	4,00 $\pm$ 1,00 ^b	4,67 $\pm$ 0,58 ^a
NT6	0,80	76,73 $\pm$ 5,88 ^c	0,76 $\pm$ 0,07 ^{cd}	57,00 $\pm$ 7,55 ^b	3,33 $\pm$ 0,58 ^{ab}	4,67 $\pm$ 0,58 ^a
NT7	1,00	60,00 $\pm$ 6,22 ^{bc}	0,68 $\pm$ 0,07 ^{bc}	41,67 $\pm$ 3,51 ^a	2,67 $\pm$ 0,58 ^a	4,67 $\pm$ 1,16 ^a
ANOVA		**	**	**	**	**
CV (%)		6,81	10,32	9,41	14,43	12,32

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của vị trí đoạn thân đến khả năng nhân giống Xạ đen *in vitro*

Vị trí đoạn thân *in vitro* đưa vào nuôi cấy có ảnh hưởng đến quá trình nhân giống, đoạn thân ở vị trí từ 1 đến 4 có sinh trưởng chồi không sai khác với chồi ngọn về thống kê so với chồi ngọn trên môi trường nhân giống (bảng 3). Đoạn thân ở vị trí thứ 2 và 3 cho kết quả phát triển tốt hơn so với đoạn 1 và 4, chồi cao hơn và lá dài hơn so với các vị trí còn lại, với chiều cao chồi lần lượt là 110,00 và 115,67 mm; chiều dài lá đạt 12,33 và 11,33 mm; hệ số nhân giống 6,67 và 6,33 sau 12 tuần nuôi cấy. Còn theo kết quả của Nagahatenna và Peiris [11] nuôi cấy *Hemidesmus indicus* tạo chồi ở vị trí đoạn thân 3 và 4 đạt số chồi cao nhất với 2,57 chồi/đốt thân, chiều cao chồi 3,32 cm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của vị trí đoạn thân đến khả năng nhân giống Xạ đen *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Vị trí đoạn thân	Chiều cao chồi (mm)	Số lá (/chồi)	Chiều dài lá (mm)	Hệ số nhân giống
NT1	Chồi ngọn	95,00 $\pm$ 5,00 ^a	6,33 $\pm$ 1,16 ^a	9,33 $\pm$ 0,58 ^{ab}	5,33 ^a
NT2	Đoạn 1	93,33 $\pm$ 7,64 ^a	6,00 $\pm$ 1,00 ^a	9,00 $\pm$ 1,00 ^{ab}	5,00 ^a
NT3	Đoạn 2	110,00 $\pm$ 5,00 ^b	7,67 $\pm$ 0,58 ^b	12,33 $\pm$ 1,53 ^c	6,67 ^b
NT4	Đoạn 3	115,67 $\pm$ 6,03 ^b	7,33 $\pm$ 0,58 ^b	11,33 $\pm$ 1,53 ^{bc}	6,33 ^b
NT5	Đoạn 4	95,00 $\pm$ 10,00 ^a	6,33 $\pm$ 0,58 ^a	8,33 $\pm$ 1,53 ^a	5,33 ^a
ANOVA		**	*	**	*
CV (%)		5,32	9,39	9,93	6,72

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (*): $p \leq 0,01$; (**): $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của auxin đến hình thành rễ Xạ đen *in vitro*

Môi trường 1/2MS có bổ sung IBA (0,25 mg/l) cải thiện đáng kể khả năng tạo rễ ở cây Xạ đen *in vitro* với chiều cao chồi 113,33 mm, số rễ 5,40 rễ/chồi và chiều dài rễ 10,33 mm (bảng 4). Chồi *in vitro* tạo sẹo ở gốc khi nuôi cấy trong môi trường bổ sung IAA (0,5 mg/l), IBA (0,5 và 1,0 mg/l) và NAA (0,5 và 1,0 mg/l). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nagahatenna và Peiris [11] khi nuôi cấy tạo rễ *Hemidesmus indicus* trên môi trường 1/2MS có bổ sung BA (1,5 mg/l); Tạ Như Thực Anh và Nguyễn Thị Bích Thu [7] nuôi cấy tạo rễ cây Xạ đen (*Ehretia asperula*) trên môi trường MS có bổ sung IBA hoặc NAA (0,01-0,1 mg/l).

Bảng 4. Ảnh hưởng của IAA, IBA, NAA đến sự hình thành và phát triển rễ Xạ đen *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Auxin (mg/l)	Chiều cao chồi (mm)	Số rễ (/chồi)	Chiều dài rễ (mm)	Tỷ lệ ra rễ sau 12 tuần nuôi cấy (%)
Đ/C	-	73,33±7,64 ^c	1,27±0,50 ^a	2,33±0,58 ^{ns}	100
IAA (mg/l)					
NT1	0,1	78,33±7,64 ^{ef}	3,53±0,61 ^{bc}	3,33±0,58 ^{ns}	100
NT2	0,25	85,00±5,00^{fg}	4,83±0,35^{de}	6,00±1,00^{cd}	100
NT3	0,5	58,33±7,64 ^{cd}	5,13±0,61 ^{de}	4,33±0,58 ^{bc}	100
NT4	1,0	50,67±4,16 ^{bcd}	8,70±1,37 ^s	2,33±0,58 ^{ns}	100
IBA (mg/l)					
NT5	0,1	92,67±6,43 ^s	5,10±0,56 ^c	8,00±2,00 ^c	100
NT6	0,25	113,33±7,64^b	5,40±0,72^c	10,33±1,53^f	100
NT7	0,5	56,67±7,64 ^{bcd}	6,67±0,61 ^f	7,00±1,00 ^{de}	100
NT8	1,0	45,00±5,00 ^{ab}	6,73±0,70 ^f	5,33±0,58 ^{cd}	100
NAA (mg/l)					
NT9	0,1	61,33±8,08^d	2,83±0,35^{bc}	4,33±1,53^{bc}	100
NT10	0,25	60,00±5,00 ^{cd}	3,93±0,70 ^d	2,67±1,16 ^{ab}	100
NT11	0,5	48,33±3,51 ^{abc}	2,97±0,4 ^{bc}	2,67±0,58 ^{ab}	100
NT12	1,0	37,67±7,50 ^a	2,67±0,50 ^b	1,33±0,58 ^a	100
ANOVA	**	**	**	ns	
CV (%)		11,71	16,45	29,36	

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$; hoặc (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm phân hạng Duncan.

Động thái sinh trưởng của chồi Xạ đen *in vitro*

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chồi bắt đầu sinh trưởng từ tuần thứ 2 nuôi cấy trên môi trường 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l) (bảng 5). Trong 3 tuần đầu, chiều cao chồi thay đổi không đáng kể. Tuy nhiên, từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 9, chiều cao chồi tăng dần, từ 21,33 đến 84,67 mm. Sau đó, chồi phát triển chậm dần,

đến tuần thứ 10 và 11 đạt chiều cao chồi 95,00 mm và 108,33 mm. Từ tuần thứ 12, chồi không cao lên nữa và cây bắt đầu ra lá.

Bảng 5. Động thái sinh trưởng của chồi cây Xạ đen *in vitro* trong 12 tuần nuôi cấy.

Thời gian	Chiều cao chồi (mm)
Tuần 1	-
Tuần 2	1,67±0,58 ^a
Tuần 3	6,00±2,00 ^a
Tuần 4	21,33±3,06 ^b
Tuần 5	32,67±3,06 ^c
Tuần 6	43,67±5,13 ^d
Tuần 7	60,00±5,00 ^e
Tuần 8	73,33±6,11 ^f
Tuần 9	84,67±5,03 ^s
Tuần 10	95,00±5,00^s
Tuần 11	108,33±7,64 ^b
Tuần 12	108,33±7,64 ^b
ANOVA	**
CV (%)	8,63

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của số lần cấy chuyển đến quá trình nhân giống *in vitro*

Từ lần cấy chuyển thứ nhất đến lần cấy chuyển thứ 5, chiều cao chồi không bị ảnh hưởng bởi số lần cấy chuyển và đạt chiều cao thân chồi 95-111 mm; số lá 7-8 lá/chồi; chiều dài lá dài nhất ở lần cấy chuyển thứ 4, đạt 13,00 mm (bảng 6). Từ lần cấy chuyển thứ 6, sinh trưởng chồi *in vitro* chậm lại, có chiều cao chồi 90,33 mm và có số lá 6,33 lá/chồi.

Bảng 6. Ảnh hưởng của số lần cấy chuyển đến khả năng nhân giống cây Xạ đen *in vitro*.

Nghiệm thức	Thế hệ	Chiều cao chồi (mm)	Số lá (/chồi)	Chiều dài lá (mm)	Hệ số nhân giống
NT1	F1	106,67±10,41 ^{bc}	7,00±1,00 ^{ab}	7,67±0,58 ^a	6,00 ^{ab}
NT2	F2	111,67±10,41 ^b	7,67±0,58 ^{bc}	10,33±0,58 ^{bc}	6,67 ^{bc}
NT3	F3	111,67±10,41^b	7,33±0,58^{abc}	10,67±1,16^b	6,33^{abc}
NT4	F4	110,00±8,66 ^{bc}	8,33±0,58 ^c	13,00±1,00 ^d	7,33 ^c
NT5	F5	95,00±5,00 ^{ac}	7,67±0,58 ^{bc}	9,00±1,00 ^{ab}	6,67 ^{bc}
NT6	F6	90,33±5,51 ^a	6,33±0,58 ^a	8,67±1,16 ^{ac}	5,33 ^a
ANOVA	**	**	**	**	**
CV (%)		6,90	7,44	7,87	7,28

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$.

Sinh trưởng và phát triển của chồi *in vitro* sau khi cho ra bầu đất

Cây Xạ đen cấy mô trồng trong bầu đất sinh trưởng và phát triển bình thường trong giai đoạn vườn ươm. Giai đoạn 3 tháng đầu phát triển chậm, có lẽ do bị ảnh hưởng của nhiệt độ vùng nhiệt đới TP Hồ Chí Minh. Sau 8 tháng, cây Xạ đen trồng trong bầu đất phát triển bình thường, mặc dù có chậm hơn so với thời tiết thuận lợi nơi bản địa (tỉnh Hòa Bình) (bảng 7).

Bảng 7. Sinh trưởng và phát triển cây Xạ đen cấy mô giai đoạn bầu đất.

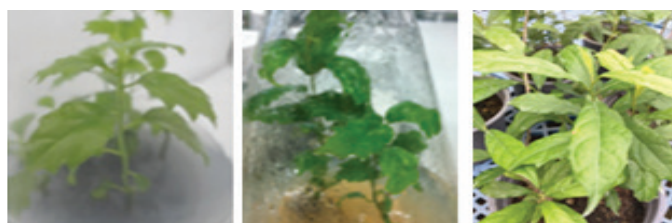
Tháng	1	2	3	4	5	6	7	8
Chiều cao thân (cm)	8,5	9,1	10,6	12,8	15,2	18,4	22,6	25,6
Số lá	4,2	4,4	5,8	6,4	7,8	8,2	9,4	10,8
Chiều dài lá (cm)	1,4	1,6	2,2	2,8	3,6	5,8	7,4	9,2
Chiều ngang lá (cm)	0,6	0,7	0,8	1,2	1,6	2,2	2,7	3,1
Tỷ lệ sống (%)	96,8	94,2	90,8	88,2	88,4	87,6	86,2	84,8

Kết luận

Kỹ thuật vi nhân giống qua nuôi cấy đoạn thân là một trong những phương pháp nâng cao hiệu suất sản xuất cây giống *in vitro* sạch bệnh và đảm bảo đặc điểm di truyền của bố mẹ, phục vụ công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cây thuốc Xạ đen. Môi trường thích hợp cho vi nhân giống cây Xạ đen là môi trường



(A) (B) (C)



(D) (E) (F)

Hình 1. Đoạn thân cây được sử dụng làm mẫu nuôi cấy (A), trên môi trường 1/2MS bổ sung BA (0,1 mg/l) 2 tuần sau cấy (B), 4 tuần sau cấy (C), 8 tuần sau cấy (D), 12 tuần sau cấy (E), và cây sau 8 tháng (F).

1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l), cho tỷ lệ tạo chồi 97,20%, số chồi 1,22 chồi/đốt, chiều cao chồi 116,67 mm và số lá 8 lá/chồi. Vị trí đốt thân đưa vào nuôi cấy có ảnh hưởng đến quá trình nhân giống, đốt thân ở vị trí từ 1 đến 4 có sinh trưởng chồi không sai khác về thống kê so với chồi ngọn trên môi trường nhân giống. Môi trường 1/2MS có bổ sung IBA (0,25 mg/l) thích hợp cho tạo rễ, cây đạt chiều cao chồi 113,33 mm, số rễ 5,40 rễ/chồi và chiều dài rễ 10,33 mm. Khảo sát động thái sinh trưởng cho thấy, chồi *in vitro* phát triển đến tuần thứ 10 đạt chiều cao chồi 95 mm. Sau lần cấy chuyển thứ 6, sinh trưởng cây *in vitro* chậm lại, chiều cao chồi 90,33 mm, số lá 6,33. Cây từ nuôi cấy mô đưa ra bầu đất trong vườn ươm sinh trưởng bình thường, sau 8 tháng đạt chiều cao thân 25,6 cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2015), *Annual Report*.
- [2] Trần Văn Sung, Nguyễn Huy Cường, Phạm Thị Ninh, Trịnh Thị Thuý (2009), “Phân lập, xác định cấu trúc và tổng hợp một số dẫn xuất của α -amyrin từ cây Cùm rậm răng (*Ehretia dentata*)”, *Tạp chí Hóa học*, **47**(6), pp.691-697.
- [3] T.N. Ly, M. Shimoyamada, R. Yamauchi (2006), “Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity”, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, pp.3786-3793.
- [4] Nguyễn Huy Cường (2008), *Nghiên cứu thành phần hoá học và thăm dò hoạt tính sinh học cây Xạ đen (Celastrus hindsii Benth & Hook) và cây Cùm rậm răng (Ehretia dentata couch)*, Luận án tiến sĩ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- [5] Lê Thế Trung (1999), *Nghiên cứu về cây Xạ đen và hiệu quả điều trị ung thư*, Học viện Quân y.
- [6] T.T. Thuy, N.H. Cuong, T.V. Sung (2007), “Triterpenes from *Celastrus hindsii* Benth.”, *Journal of Chemistry*, **45**(3), pp.373-376.
- [7] Tạ Như Thục Anh, Nguyễn Thị Bích Thu (2012), “Nghiên cứu nhân nhanh cây Xạ đen (*Ehretia asperula*)”, *Tạp chí Dược liệu*, **17**(4), tr.244-247.
- [8] M. Phulwaria, N.S. Shekhawat (2013), “An efficient in vitro shoot regeneration from immature inflorescence and ex vitro rooting of *Arnebia hispidissima* (Lehm). DC. - a red dye (Alkannin) yielding plant”, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **19**(3), pp.435-441.
- [9] S. Malik, S. Sharma, M. Sharma, P.S. Ahuja (2010), “Direct shoot regeneration from intact leaves of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston using thidiazuron”, *Cell Biol. Int.*, **34**(5), pp.537-542.
- [10] Y. Sahoo, P.K. Chand (1998), “Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation”, *Plant Cell Rep.*, **18**, pp.301-307.
- [11] D.S.K. Nagahatenna, S.E. Peiris (2007), “In vitro propagation of *Femidesmus indicus* (L.) R. BR. (*Iramusu*) through nodal culture”, *Trop. Agric. Res.*, **19**, pp.181-192.

Ảnh hưởng của môi trường khoáng và chất kháng vi sinh vật trong nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb.)

Phan Xuân Bình Minh*, Đỗ Thị Kim Trang, Nguyễn Thị Hiền
Nguyễn Phương Lan, Trần Bảo Trâm

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

Ngày nhận bài 9/11/2018; ngày chuyển phản biện 12/11/2018; ngày nhận phản biện 6/12/2018; ngày chấp nhận đăng 10/12/2018

Tóm tắt:

Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb.) là loại dược liệu quý có chứa alkaloid huperzine - hoạt chất chính trong điều trị bệnh mất trí nhớ ở người cao tuổi. Nghiên cứu được thực hiện nhằm nhân giống *in vitro* cây dược liệu này. Nguyên liệu nuôi cấy là chồi ngọn chưa phân nhánh được khử trùng bề mặt mẫu bằng cách ngâm trong dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút, sau đó tiếp tục xử lý với dung dịch H₂O₂ 30% trong 7 phút. Kết quả cho thấy, khi sử dụng môi trường khoáng MS2 (gồm MS + 0,3 mg/l BAP + 0,01 mg/l IBA) có bổ sung hỗn hợp các chất kháng vi sinh vật gồm: 0,5 mg/l malachite xanh và 100 ml/l kháng sinh AAS (gồm 30 mg/l penicillin, 50 mg/l streptomycin và 125 µg/l amphotericin B) cho tỷ lệ mẫu đạt yêu cầu cao nhất 56,67% sau 30 ngày nuôi cấy, chồi bắt đầu phân nhánh. Từ các mẫu ban đầu tiếp tục cấy chuyển sang môi trường MS1, sau 60 ngày nuôi cấy tỷ lệ mẫu phân nhánh đạt 34,11%, tỷ lệ mẫu ra rễ đạt 19,67% và sau 6 tháng nuôi cấy có hệ số nhân chồi là 3,48 và tỷ lệ cây ra rễ là 53,12%.

Từ khóa: chất kháng vi sinh vật, môi trường khoáng, nuôi cấy mô tế bào, Thạch tùng răng cưa.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb.) thuộc họ Thạch sam (Huperziaceae), là cây thân thảo mọc ở đất [1]. Cây sinh sản bằng hai hình thức hữu tính và vô tính. Bào tử là mầm sinh sản nhưng chúng thường không hoạt động hoặc hoạt động rất phức tạp, phải mất nhiều năm để có thể nảy mầm và phát triển. Theo nghiên cứu của Ma và cộng sự (2008) thì sự sinh sản của loài này rất chậm, phải mất 15 năm để một bào tử nảy mầm và phát triển thành cây trưởng thành có thể thu hoạch được [2], Wang và cộng sự (2011) cũng đã nghiên cứu quần thể của loài này trong tự nhiên tại khu Bảo tồn thiên nhiên của tỉnh Nam Hải, miền Nam Trung Quốc cho thấy, hầu hết các cây giống có nguồn gốc từ mầm [3]. Trên thế giới, Thạch tùng răng cưa được tìm thấy chủ yếu ở các khu rừng ẩm cận nhiệt đới và ôn đới với độ cao 900 đến 3.500 m ở Trung Quốc, Ấn Độ, Nepal, Myanmar, Sri Lanka, Nhật Bản, Hàn Quốc, Việt Nam, Úc và Cuba [4]. Ở Việt Nam, Thạch tùng răng cưa chỉ gặp trong những khu rừng quanh năm ẩm ướt, có tầng mùn dày ở vùng núi cao từ 1.000 m trở lên như Lào Cai, Cao Bằng, Hà Giang, Quảng Trị, Quảng Nam, Đà Nẵng, Khánh Hoà, Lâm Đồng. Thạch tùng răng cưa là loài dược

liệu quý hiếm, được đưa vào danh sách những loài dược liệu cần được bảo tồn và phát triển [5]. Trong y học cổ truyền, Thạch tùng răng cưa được sử dụng trong các bài thuốc chữa lợi tiểu, chống co thắt, giảm đau, cầm máu [1]. Năm 1986, các nhà khoa học Trung Quốc đã chiết xuất được huperzine A từ cây Thạch tùng răng cưa, đây là hoạt chất có tác dụng ức chế acetylcholinesterase thể hệ thứ hai để điều trị bệnh Alzheimer [6]. Nghiên cứu của Vũ Bích Ngọc và cộng sự (2016) cũng cho thấy, hàm lượng huperzine A có trong cây Thạch tùng răng cưa thu được ở Đà Lạt, Lâm Đồng vào mùa thu là 0,0925 mg/g mẫu khô, tương đương với mẫu Thạch tùng răng cưa của Trung Quốc [7]. Do điều kiện sống khắc khe, khả năng tái sinh trong tự nhiên kém cùng với sự khai thác quá mức vì mục đích thương mại dẫn đến nguy cơ tuyệt chủng của loài cây này [5]. Nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* là giải pháp được nhiều tác giả lựa chọn như Liang (2010) [8]; Wojciech, et al. (2013) [9]; Kannichiro, et al. (2013) [10]; Ying-Zi, et al. (2015) [11]. Ở Việt Nam, Lê Thị Lan Anh và cộng sự (2018) đã nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thạch tùng răng cưa bằng phương pháp giâm hom sau 4 tháng có tỷ lệ sống là 87,24% và tỷ lệ ra rễ là 30,32% [12]. Nhưng những kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa phục vụ sản

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

Effect of mineral medium and antimicrobial mixture on the *in vitro* propagation of *Huperzia serrata* Thunb.

Xuan Binh Minh Phan*, Thi Kim Trang Do,
Thi Hien Nguyen, Phuong Lan Nguyen, Bao Tram Tran

Center for Experimental Biology,
National Center for Technological Progress

Received 9 November 2018; accepted 10 December 2018

Abstract:

Huperzia serrata Thunb. is a valuable medicinal plant containing alcaloid huperzine - a major active compound in the treatment of Alzheimer's disease in the elderly. The aim of this study is to propagate *H. serrata* using the *in vitro* methods. The samples (crown buds without branching) were sterilised by immersing in the solution of NaOCl 3% in 30 minutes, then treating with 30% H₂O₂ solution for 7 minutes. The results showed that using the MS2 medium (including MS + 0.3 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) supplemented with a mixture of antimicrobial substances that consisted of 0.5 mg/l malachite green and 100 ml/l antibiotic AAS (including 30 mg/l penicillin, 50 mg/l streptomycin and 125 µg/l amphotericin B) gave the highest rate of the successful samples at 56.67% after 30 days of cultivation and shoots began to branch. The initial successful samples continued being transplanted into the MS1 medium, and then the branching rate and the rate of rooting reached 34.11% and 19.67%, respectively after 60 days of cultivation. After 6 months, shoots grew by 3.48 times and the rate of rooting was up to 53.12%.

Keywords: antimicrobial mixture, *Huperzia serrata* Thunb., *in vitro* propagation, mineral medium.

Classification number: 4.1

xuất được liệu còn hạn chế, vì vậy việc nhân giống *in vitro* được cây Thạch tùng răng cưa sẽ tạo hướng phát triển cho vùng trồng loài dược liệu này.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb.) trưởng thành cao từ 10 đến 15 cm thu hái ngoài tự nhiên tại Sa Pa (Lào Cai) được đưa về trồng tại vườn ươm của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm. Nguyên liệu sử dụng là các chồi ngọn chưa phân nhánh dài khoảng 3-4 cm.

Bố trí thí nghiệm

Điều kiện khử trùng: sử dụng 9 công thức như trong bảng 1.

Bảng 1. Các công thức khử trùng.

Công thức	Điều kiện khử trùng	Môi trường nuôi cấy
CT1		MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT2	Dung dịch NaOCl 3% trong 40 phút	1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT3		Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT4		MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT5	Dung dịch H ₂ O ₂ 30% trong 10 phút	1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT6		Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT7	Dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút và Dung dịch H ₂ O ₂ 30% trong 7 phút	MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT8		1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT9		Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP

Ghi chú: MS (Murashige and Skoog); Mr (Moore); BAP (6-Benzylaminopurine).

Môi trường nuôi cấy: sử dụng 6 công thức như trong bảng 2.

Bảng 2. Các môi trường nuôi cấy.

Công thức	Môi trường nuôi cấy
MS1	MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA/L
MS2	MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA + 100 ml hỗn hợp chất kháng vi sinh vật/L
1/2 MS1	1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA/L
1/2 MS2	1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA + 100 ml hỗn hợp chất kháng vi sinh vật/L
Mr1	Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA/L
Mr2	Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA + 100 ml hỗn hợp chất kháng vi sinh vật/L

Ghi chú: IBA (Indolbutylic acid).

Trong đó, hỗn hợp chất kháng vi sinh vật (/L) gồm: 0,5 mg malachite xanh (chất kháng nấm) và kháng sinh AAS (gồm 30 mg penicillin, 50 mg streptomycin và 125 µg amphotericin B) [11].

Thời gian nuôi cấy trong môi trường có bổ sung chất kháng vi sinh vật: sử dụng 3 công thức như trong bảng 3.

Bảng 3. Thời gian (TG) nuôi cấy.

Công thức	Thời gian nuôi cấy trong môi trường có bổ sung chất kháng vi sinh vật (ngày)
Đối chứng (Đ/C)	0
TG1	30
TG2	60

Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu không nhiễm, tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu phân nhánh, tỷ lệ mẫu ra rễ sau 30 ngày và 60 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng: sử dụng 9 công thức như bảng 4.

Bảng 4. Các công thức sử dụng chất điều hòa sinh trưởng.

Công thức	Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ IBA (mg/l)
ST1		0
ST2	0,1	0,01
ST3		0,02
ST4		0
ST5	0,3	0,01
ST6		0,02
ST7		0
ST8	0,5	0,01
ST9		0,02

Môi trường nuôi cấy là: MS + 8 g agar + 30 g đường, các chỉ tiêu theo dõi: hệ số nhân chồi, chiều cao cây, tỷ lệ cây ra rễ sau 60 ngày và 120 ngày nuôi cấy.

Mẫu thí nghiệm được nuôi cấy trong môi trường có pH 5,5, trong điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$; cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày. Các thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các số liệu thu được là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Xử lý số liệu: số liệu được xử lý trên phần mềm IRISTAT 5.0.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của điều kiện khử trùng và môi trường khoáng đến vật liệu nuôi cấy in vitro Thạch tùng răng cưa

Thạch tùng răng cưa là cây thân thảo mọc trên đất ẩm, hơn nữa thân lại có vẩy và lá mọc dày nên khả năng nhiễm vi sinh vật rất cao. Chính vì vậy việc làm sạch bề mặt mẫu là khâu hết sức quan trọng trước khi đưa mẫu vào nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu về điều kiện khử trùng và môi trường khoáng được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chất khử trùng và môi trường khoáng đến quá trình tạo vật liệu khởi đầu trong nhân giống in vitro Thạch tùng răng cưa.

Công thức	Sau 30 ngày nuôi cấy		Sau 60 ngày nuôi cấy	
	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
CT1	12,43 ^b	8,15 ^d	3,17 ^d	2,33 ^d
CT2	11,67 ^{bc}	6,37 ^f	2,67 ^e	1,63 ^e
CT3	11,14 ^c	4,72 ^g	2,31 ^e	0 ^f
CT4	13,21 ^b	10,72 ^c	4,81 ^c	2,57 ^d
CT5	12,09 ^b	7,69 ^e	3,23 ^d	1,91 ^e
CT6	11,93 ^{bc}	4,06 ^g	2,14	0 ^f
CT7	18,87 ^a	18,83 ^a	14,67 ^a	13,33 ^a
CT8	18,89 ^a	17,27 ^b	14,33 ^a	11,22 ^b
CT9	17,33 ^{ab}	10,21 ^c	12,67 ^b	8,23 ^c
LSD _{0,05}	1,71	1,53	1,63	1,57

Ghi chú: LSD_{0,05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả cho thấy, sau 30 ngày nuôi cấy ở hầu hết các công thức thí nghiệm đều có tỷ lệ nhiễm nấm rất cao (80-90%), sau 60 ngày nuôi cấy mẫu vẫn tiếp tục bị nhiễm. Đối với các mẫu sử dụng một dung dịch khử trùng, tỷ lệ nhiễm nấm lên đến hơn 90% dẫn đến tỷ lệ mẫu sống cũng rất thấp hoặc chết toàn bộ (mẫu chỉ khử trùng bằng NaOCl hoặc H₂O₂ trong môi trường khoáng Mr). Chỉ có mẫu được khử trùng bằng dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút và dung dịch H₂O₂ 30% trong 7 phút cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu không nhiễm >10% và tỷ lệ mẫu sống cũng không thấp hơn nhiều (1-4%). Do Thạch tùng có thời gian tạo vật liệu khởi đầu kéo dài (30-60 ngày) nên khả năng nhiễm nấm nội sinh trong mẫu gây ra trong quá trình nuôi cấy rất cao. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu đã tiến hành bổ sung một số chất kháng vi sinh vật với nồng độ thấp nhằm kiểm soát hiệu quả hiện tượng nhiễm bệnh trong môi trường mà không gây bất lợi cho sự sinh trưởng của tế bào thực vật nuôi cấy. Khử trùng mẫu bằng dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút và dung dịch H₂O₂ 30% trong 7 phút là lựa chọn của nghiên cứu này để tiếp tục thử nghiệm trong các môi trường nuôi cấy khác nhau. Kết quả được thống kê trong bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến khả năng kháng vi sinh vật trong nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa.

Công thức	Sau 30 ngày nuôi cấy		Sau 60 ngày nuôi cấy	
	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
MS1	18,31 ^d	17,63 ^d	14,74 ^d	13,07 ^d
MS2	65,56 ^a	62,43 ^a	64,89 ^a	56,67 ^a
1/2 MS1	18,27 ^d	15,25 ^e	13,41 ^{de}	11,65 ^e
1/2 MS2	63,84 ^b	52,67 ^b	48,22 ^b	37,78 ^b
Mr1	17,21 ^{de}	9,73 ^f	12,78 ^e	7,83 ^f
Mr2	62,33 ^c	47,23 ^c	42,56 ^c	32,73 ^c
LSD _{0,05}	1,54	1,84	1,49	1,72

Ghi chú: LSD_{0,05} sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả cho thấy, sau 30 ngày nuôi cấy ở các công thức không bổ sung chất kháng vi sinh vật (MS1, 1/2 MS1, Mr1) tỷ lệ mẫu không nhiễm đều rất thấp (<20%) và sau 60 ngày nuôi cấy các mẫu này vẫn tiếp tục bị nhiễm (tỷ lệ mẫu không nhiễm còn dưới <15%), dẫn đến tỷ lệ mẫu sống cũng rất thấp, có mẫu dưới 10% (công thức Mr1). Trong khi đó, cả 3 thí nghiệm có bổ sung chất kháng vi sinh vật sau 30 ngày tỷ lệ mẫu không nhiễm đạt >60%, sau 60 ngày tỷ lệ mẫu không nhiễm vẫn đạt >40%. Bên cạnh đó, tỷ lệ mẫu sống sau 30 ngày nuôi cấy đều >40% và sau 60 ngày nuôi cấy đạt >30%. Kết quả này cho thấy, việc bổ sung chất kháng vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy là phương pháp khá hiệu quả trong việc ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật, và nồng độ các chất kháng vi sinh vật được bổ sung vào môi trường cũng vừa đủ để hạn chế ảnh hưởng đến các tế bào thực vật. Kết quả này cũng hoàn toàn tương tự như nghiên cứu của nhóm tác giả Ying-Zi (2015) trong nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa của Trung Quốc [11].

Việc sử dụng môi trường khoáng thích hợp có tác dụng bổ sung nguồn khoáng kịp thời, giúp các tế bào đủ dinh dưỡng để hồi phục và phát triển sau những tổn thương do khử trùng và những hạn chế do sử dụng chất kháng vi sinh vật. Kết quả bảng 5 và bảng 6 đều cho thấy, môi trường MS là môi trường thích hợp cho sự hồi phục và tái sinh của chồi ngọn Thạch tùng răng cưa, trong đó môi trường MS2 cho kết quả cao nhất với tỷ lệ mẫu không nhiễm là 64,89 và tỷ lệ mẫu sống là 56,67%. So sánh với các nghiên cứu khác cho thấy: Liang (2010) khi nhân Thạch tùng răng cưa nuôi cấy trong môi trường 1/2 MS bổ sung IBA và BA ở nồng

độ thích hợp không những gia tăng về sinh khối mà còn gia tăng sự tổng hợp huperzine [8]; nghiên cứu của nhóm tác giả Wojciech J. Szypuła (2013) đã xác định môi trường Mr bổ sung 0,015 mg/l IBA và 0,3 mg/l kinetin là môi trường thích hợp cho sự gia tăng sinh khối của *Huperzia selago* khi nhân nuôi bằng bào tử [9], hay như nghiên cứu nhân giống *Huperzia serrata* của Ying-Zi và cộng sự (2015) lại cho rằng, môi trường MS thích hợp cho sự phân nhánh của chồi ngọn [11].

Ảnh hưởng của thời gian bổ sung chất kháng vi sinh vật đến sinh trưởng và phát triển của chồi Thạch tùng răng cưa nuôi cấy *in vitro*

Việc bổ sung chất kháng vi sinh vật trong thời gian bao lâu để vừa có tác dụng kháng vi sinh vật, vừa không ảnh hưởng nhiều đến sự sinh trưởng và phát triển của chồi là yếu tố cần được xem xét tiếp theo. Môi trường MS2 được lựa chọn trong nghiên cứu này để đánh giá ảnh hưởng của thời gian bổ sung chất kháng vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy. Kết quả được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung chất kháng vi sinh vật đến sinh trưởng và phát triển của chồi.

Công thức	Sau 30 ngày nuôi cấy			Sau 60 ngày nuôi cấy		
	Tỷ lệ chồi đạt (%)	Tỷ lệ chồi phân nhánh (%)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Tỷ lệ chồi đạt (%)	Tỷ lệ chồi phân nhánh (%)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)
Đ/C	17,63 ^b	2,31 ^a	0	13,07 ^c	4,47 ^c	2,09 ^c
TG1	62,34 ^a	1,78 ^{ab}	0	51,33 ^b	34,11 ^a	19,67 ^a
TG2	62,27 ^a	2,00 ^a	0	56,67 ^a	23,33 ^b	8,81 ^b
LSD _{0,05}	2,14	1,07	0	2,31	2,84	2,63

Ghi chú: LSD_{0,05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ mẫu đạt ở công thức thí nghiệm sau 60 ngày nuôi cấy >50% không thấp hơn nhiều so với tỷ lệ mẫu đạt sau 30 ngày nuôi cấy tỷ lệ mẫu đạt là >60%, và sau 60 ngày nuôi cấy ở công thức không bổ sung chất kháng vi sinh vật tỷ lệ mẫu đạt cũng không thấp hơn nhiều so với công thức bổ sung chất kháng vi sinh vật (5,34%). Điều đó cho thấy, việc bổ sung chất kháng vi sinh vật trong vòng 30 ngày đầu đã ức chế được nấm nội sinh. Nhưng nếu tiếp tục bổ sung chất kháng vi sinh vật trong 30 ngày tiếp theo sẽ ức chế sự phát triển của tế bào, điển hình là tỷ lệ mẫu phân nhánh ở công thức TG1 cao hơn TG2 là 10,78% và tỷ lệ mẫu ra rễ cũng cao hơn là 10,86%. Vậy việc bổ sung chất kháng vi sinh vật là cần thiết, nhưng chỉ nên bổ sung trong giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu (30 ngày đầu nuôi cấy).

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến sinh trưởng và phát triển của Thạch tùng răng cưa nuôi cấy *in vitro*

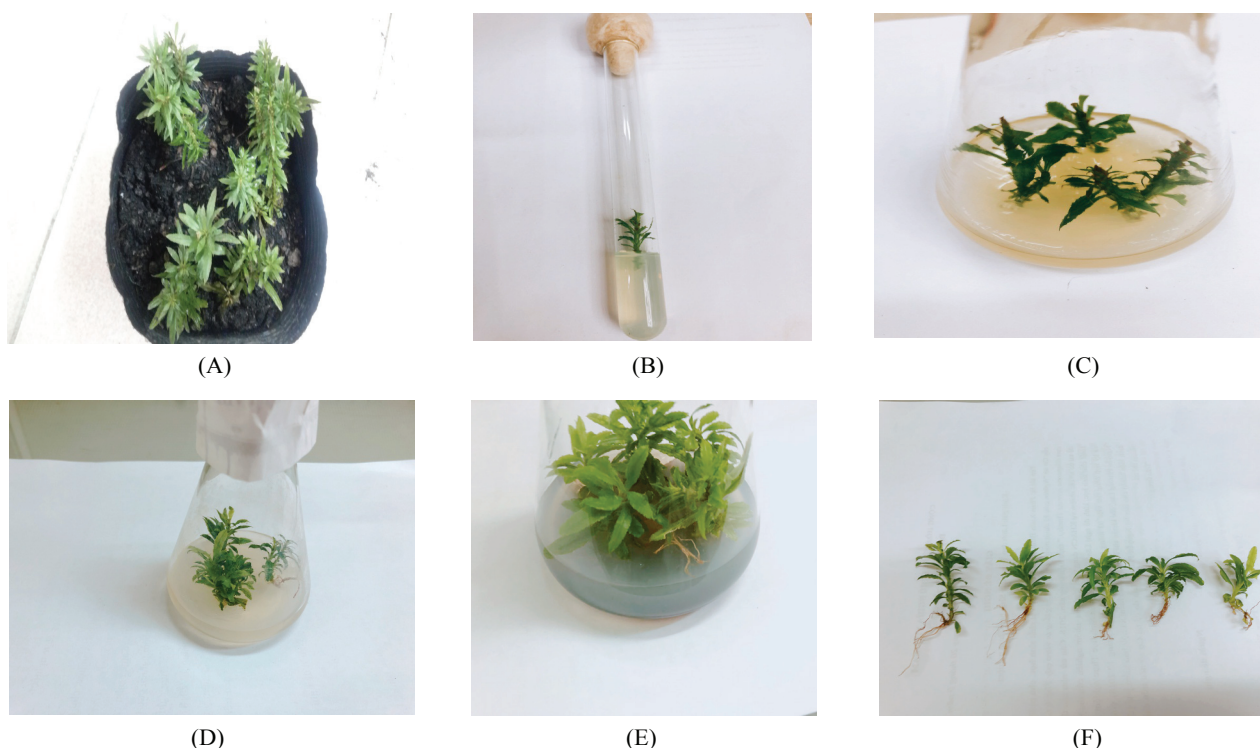
Vật liệu sau 60 ngày nuôi cấy được cấy chuyển sang môi trường có bổ sung nồng độ BAP và IBA khác nhau để đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của chồi. Kết quả được thể hiện ở bảng 8.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, BAP ảnh hưởng đến hệ số nhân và chiều cao của chồi, ở các công thức bổ sung 0,3 mg BAP/l môi trường thì hệ số nhân và chiều cao của chồi Thạch tùng răng cưa phát triển tốt hơn nhiều so với ở các công thức có nồng độ 0,1 mg BAP/l môi trường nhưng ở các công thức có nồng độ 0,5 mg BAP/l môi trường thì hệ số nhân chồi và chiều cao chồi lại không tăng do mẫu hình thành nhiều các mô sẹo. Kết quả này tương tự như kết quả nghiên cứu của Wojciech và cộng sự trên đối tượng *H. selago*. Còn IBA ảnh hưởng đến quá trình ra rễ và sự phát triển của lá, ở các công thức bổ sung 0,01 mg IBA/l môi trường cây phát triển đồng đều và có tỷ lệ ra rễ tốt nhất, ở các công thức không bổ sung 0,01 mg IBA cây ra rễ chậm hơn và sự phát triển của cây cũng kém hơn, còn ở các công thức có bổ sung 0,02 mg IBA/l môi trường không làm tăng tỷ lệ ra rễ cho cây mà làm tăng lượng rễ trên cây ở mức không cần thiết. Vậy môi trường thích hợp cho nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa là MS + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA (trong 1l môi trường).

Bảng 8. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của Thạch tùng răng cưa nuôi cấy *in vitro*.

Công thức	Sau 60 ngày nuôi cấy			Sau 120 ngày nuôi cấy		
	Hệ số nhân chồi	Chiều cao Trung bình của chồi (mm)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Hệ số nhân chồi	Chiều cao Trung bình của chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)
ST1	1,27 ^f	7,2 ^f	17,32 ^f	1,43 ^g	13,4 ^f	32,18 ^g
ST2	1,83 ^d	9,7 ^d	21,16 ^{de}	2,07 ^e	16,5 ^d	38,2 ^f
ST3	1,46 ^e	8,3 ^e	23,47 ^c	1,92 ^f	14,8 ^e	42,21 ^e
ST4	2,08 ^c	13,1 ^a	20,21 ^e	2,51 ^{cd}	21,3 ^a	47,62 ^{bc}
ST5	2,45 ^a	12,9 ^a	27,31 ^a	3,48 ^a	21,1 ^a	53,12 ^a
ST6	2,21 ^b	11,3 ^{bc}	24,63 ^{bc}	2,95 ^b	19,7 ^{bc}	48,31 ^b
ST7	2,36 ^{ab}	12,4 ^{ab}	22,72 ^{cd}	2,86 ^{bc}	20,3 ^b	44,72 ^d
ST8	2,14 ^{bc}	11,6 ^b	25,37 ^b	2,62 ^c	19,1 ^c	46,26 ^c
ST9	1,96 ^{cd}	10,7 ^c	21,87 ^d	2,31 ^d	18,6 ^{cd}	43,56 ^{de}
LSD _{0.05}	0,21	0,9	1,62	0,23	1,2	2,34

Ghi chú: LSD_{0.05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.



Hình 1. Thạch tùng răng cưa. **A)** Nguyên liệu ban đầu; **B)** Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS2 sau 30 ngày; **C)** Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS2 sau 30 ngày và cấy chuyển sang môi trường MS1 30 ngày; **D)** Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS1 sau 60 ngày; **E)** Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS1 sau 120 ngày; **F)** Cây con nuôi cấy *in vitro*.

Kết luận

Điều kiện khử trùng thích hợp cho mẫu Thạch tùng răng cưa là bằng dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút và dung dịch H₂O₂ 30% trong 7 phút, nhưng để việc khử trùng đạt hiệu quả cao cần bổ sung chất kháng vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy *in vitro* nhằm hạn chế sự phát triển của các vi sinh vật nội sinh. Môi trường thích hợp cho nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa là MS + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA (trong 1l môi trường) có bổ sung hỗn hợp chất kháng vi sinh vật trong 30 ngày đầu nuôi cấy.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả trân trọng cảm ơn Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Tiến Bân (2005), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, tập II, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [2] X. Ma, C. Tan (2008), “In vitro production of Huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer’s disease”, *Phytochemistry*, **69**(10), pp.2022-2028.
- [3] Y. Wang, Q.G. Zeng (2011), “Isolation and characterization of endophytic huperzine A- producing fungi from *Huperzia serrata*”, *Plant Science*, **168**, pp.1443- 1452.
- [4] J.G. Ai, Y.Q. Zhang (2005), “Study on community property of *Huperzia serrata* habitat in Tianmushan nature reserves”, *J. Zhejiang Sci. Technol.*, **25**, pp.14-17.
- [5] Nông Văn Duy (2015), *Tình hình nghiên cứu Thạch tùng răng cưa tại Việt Nam*, Nhà xuất bản Tây Nguyên.
- [6] J.S. Liu, C.M. Yu, Y.Z. Zhou, Y.Y. Han, B.R. Qi, Y.L. Zhu

(1986), “Study on the chemistry of Huperzine A and B”. *Acta Chimica Sinica*, **44**, pp.1035-1040.

[7] Vũ Bích Ngọc, Phạm Thị Hạnh, Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Tiến Đạt, Lê Thị Bích Thủy (2016), “Định tính và định lượng Huperzine A trong cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) ở Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **14**(3), tr.473-478.

[8] H. Liang (2010), “Establishment of the tissue culture system of *Huperzia serrata* and effects of phytohormones on multiple shoot growth and Huperzine A accumulation”, *Thesis Master*, Hefei Univ. Tech., Hefei.

[9] Wojciech J. Szypuła, Paulina Mistrzak, Olga Olszowska (2013), “A new and fast method to obtain in vitro cultures of *Huperzia selago* (Huperziaceae) porophytes, a club moss which is a source of huperzine A”, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **82**(4), pp.313-320.

[10] Kanichiro Ishiuchi, Jeong-Jin Park, Robert M. Long, David R. Gang (2013), “Production of huperzine A and other Lycopodium alkaloids in *Huperzia* species grown under controlled conditions and in vitro”, *Phytochemistry*, **9**, pp.208-219.

[11] Ying-Zi MA, LIU Jiang-Hai, XU Huan, LIU Fen (2015), “In Vitro Culture of *Huperzia serrata*”, *Plant Physiology Journal*, **51**(4), pp.465- 470.

[12] Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Bùi Tuấn Anh, Hồ Thị Hương, Ngô Thị Thùy Linh, Lê Thị Bích Thủy, Nguyễn Đức Thành (2018), “Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài Thạch tùng răng cưa *Huperzia serrata* bằng phương pháp giảm cành”, *Kỷ yếu Hội thảo khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, tr.1411-1416.

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật đến khả năng nhân giống hữu tính cây Xạ can (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.)

Trần Thị Lan^{1*}, Nguyễn Văn Tâm¹, Phan Thúy Hiền¹, Phạm Thị Ngọc Bích²

¹Viện Dược liệu

²Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 5/11/2018; ngày chuyển phản biện 9/11/2018; ngày nhận phản biện 14/12/2018; ngày chấp nhận đăng 25/12/2018

Tóm tắt:

Xạ can (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.) được trồng ở nhiều nơi để làm cảnh và lấy củ làm thuốc. Nghiên cứu tập trung vào các kỹ thuật về thời vụ, giá thể, khoảng cách gieo hạt và ảnh hưởng của các biện pháp này đến khả năng nhân giống hữu tính cây Xạ can. Kết quả thu được cho thấy, thời vụ tốt nhất là khoảng 15/2; giá thể tốt nhất là đất + cát + bã được ủ hoai mục với tỷ lệ 1:1:1, khoảng cách gieo hạt thích hợp là 4-5 cm. Kết quả này góp phần hoàn thiện kỹ thuật nhân giống hữu tính, phục vụ cho việc sản xuất giống Xạ can.

Từ khóa: *Belamcanda chinensis*, nhân giống hữu tính, Xạ can.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Xạ can (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.) là một vị thuốc quý chữa các bệnh về họng, viêm amidan có mủ, ho nhiều đờm, khản tiếng. Ngoài ra, Xạ can còn được sử dụng trong y học cổ truyền ở một số quốc gia để chữa sốt, đại tiểu tiện không thông, thông vũ tắc tia sữa, bong gân, làm thuốc lọc máu, đau lưng... [1].

Bệnh tai mũi họng (TMH) là bệnh phổ biến trên thế giới cũng như ở nước ta. Mặc dù hiện nay, y học đã đạt được nhiều thành tựu nổi bật, chuyên ngành TMH đang phát triển mạnh, nhưng bệnh TMH vẫn là gánh nặng cho xã hội. Các bệnh viêm mũi xoang, viêm tai giữa, viêm họng mạn tính còn là nỗi ám ảnh đối với bệnh nhân và thầy thuốc TMH, ngay cả với các nước phát triển có nền y học hiện đại. Bệnh lý TMH không chỉ gây tổn thất về kinh tế, giảm chất lượng cuộc sống của người bệnh, mà còn làm giảm năng suất lao động, ảnh hưởng đến sự phát triển kinh tế chung của xã hội [2].

Xạ can với hai hợp chất *tectorigenin* và *tectoridin* - thành phần chính trong thân rễ là đối tượng phù hợp để giải quyết vấn đề trên [3-6]. Đánh giá hoạt tính sinh học cho thấy, căn nước của thân rễ Xạ can có hoạt tính kháng viêm theo đường uống với mức độ ức chế khối viêm 52,12-70%. Tất cả các căn chiết thân rễ Xạ can không thể hiện hoạt tính khi thử nghiệm theo đường bôi. *Tectorigenin* tách chiết từ thân rễ Xạ can có tác dụng giảm đau rõ rệt nhất ở liều 100 mg/kg cân nặng chuột nhắt. Với liều 60 mg/kg cân nặng chuột cống, *tectorigenin* có tác dụng chống viêm cấp và mạn. Độ tính cấp tính của *tectorigenin* được xác định với giá trị LD₅₀ là 1,78±0,13 g/kg cân nặng. Độ tính bán trường diễn: *tectorigenin* với các liều thử 100 mg/kg cân nặng và 300 mg/kg cân nặng, cho chuột uống thuốc liên tục 28 ngày không làm ảnh hưởng đến cân

nặng, không làm thay đổi chức phận tạo máu và chức năng gan, thận so với lô chứng [7].

Hiện nay, kỹ thuật trồng, nhân giống cây Xạ can chưa được nghiên cứu nhiều tại Việt Nam. Do đó “Nghiên cứu ảnh hưởng một số biện pháp kỹ thuật đến khả năng nhân giống hữu tính cây Xạ can (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.)” góp phần bổ sung cơ sở khoa học cho nhân giống Xạ can tại Việt Nam, qua đó giúp phát triển các vùng chuyên canh loài cây này.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 12/2017-8/2018 tại vùng trồng dược liệu Xạ can của Công ty Dược Khải Hà ở Thái Bình.

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu được sử dụng trong nghiên cứu là hạt Xạ can được thu từ vườn lưu giữ cây giống thuộc Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội, Viện Dược liệu.

Phương pháp nghiên cứu

Các nghiên cứu được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCB) với 3 lần nhắc lại, các lần nhắc lại được thực hiện trên các ô thí nghiệm có diện tích 1 m², trừ nghiên cứu giá thể thực hiện trong thùng xốp kích thước 40x60 cm.

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời vụ gieo hạt tới khả năng hình thành cây giống và chất lượng cây giống khi xuất vườn: nghiên cứu được bố trí 4 công thức: TV1: hạt được gieo vào 15/1; TV2: hạt được gieo vào 15/2; TV3: hạt được gieo vào 15/3; TV4: hạt được gieo vào 15/4.

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

The influence of some techniques on the sexual propagation capacity of *Belamcanda chinensis* (L.) DC.

Thi Lan Tran^{1*}, Van Tam Nguyen¹, Thuy Hien Phan¹,
Thi Ngoc Bich Pham²

¹National Institute of Medicinal Materials
²Vietnam National University of Agriculture

Received 5 November 2018; accepted 25 December 2018

Abstract:

Belamcanda chinensis (L.) DC. is cultivated as a kind of ornament and medicinal plants in many places. This research focused on sowing season, substrate and sowing distance and their influences on the sexual propagation of *B. chinensis*. The results showed that the best planting season was around February 15th; the best sowing substrate included soil + sand + biodegradable residue of medicinal herbs with a ratio of 1:1:1; the sowing distance was 4-5 cm. These results contribute to the improvement of sexual propagation techniques for producing seedlings of *B. chinensis*.

Keywords: *Belamcanda chinensis*, blackberry lily, sexual propagation.

Classification number: 4.1

Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể gieo hạt tới khả năng hình thành cây giống và chất lượng cây giống khi xuất vườn: nghiên cứu được bố trí 3 công thức: GT1: gieo trên nền đất; GT2: gieo trên nền cát; GT3: gieo trên nền đất + cát + bã được liệu ủ hoai mục tỷ lệ 1:1:1.

Nghiên cứu ảnh hưởng của khoảng cách gieo hạt tới khả năng hình thành cây giống và chất lượng của cây giống khi xuất vườn: nghiên cứu được bố trí 3 công thức: K1: hạt được gieo với khoảng cách 3x3 cm; K2: hạt được gieo với khoảng cách 4x4 cm; K3: hạt được gieo với khoảng cách 5x5 cm.

Sau khi gieo hạt 1 tháng theo dõi động thái của cây: tỷ lệ nảy mầm (%), tỷ lệ hình thành cây giống (%), chiều cao cây (cm), số lá trên cây (lá). Sau khi cây xuất vườn theo dõi chất lượng cây giống: số rễ (rễ), chiều dài rễ (cm), đường kính thân giả (mm), đường kính thân củ (mm). Số lượng theo dõi: 10 cây/lần nhắc lại, 30 cây/công thức.

Sơ đồ bố trí nghiên cứu và xử lý số liệu được thực hiện bằng phần mềm IRRISTAT phiên bản 5.0 và Microsoft Excel 2010.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của thời vụ đến khả năng hình thành cây giống và chất lượng cây giống khi xuất vườn

Kết quả nghiên cứu (bảng 1) cho thấy, chiều cao cây Xạ can

gieo ở các thời vụ khác nhau có sự sai khác nhau rõ rệt. Sau khi gieo 30 ngày, chiều cao cây dao động 4,86-9,37 cm, cao nhất là công thức TV2 (9,37 cm), thấp nhất là TV4 (4,86 cm). Sau 60 ngày, công thức TV2 vẫn giữ chiều cao cây cao nhất (19,84 cm), TV4 thấp nhất (7,87 cm). Sau 90 ngày, chiều cao cây Xạ can dao động 10,83-28,33 cm. Cao nhất vẫn là công thức TV2 (28,33 cm), tiếp theo là TV1 (24,67 cm), TV3 (18,93 cm) và thấp nhất là TV4 (10,83 cm).

Bảng 1. Động thái tăng trưởng cây giống Xạ can ở các thời vụ.

Công thức	Chiều cao cây sau gieo... (cm)			Số lá xanh sau gieo... (lá)		
	30 ngày	60 ngày	90 ngày	30 ngày	60 ngày	90 ngày
TV1	5,63±0,44	15,45±1,80	24,67±0,63	3,63±0,44	5,60±0,53	5,53±0,35
TV2	9,37±1,36	19,84±2,23	28,33±1,75	3,60±0,35	5,47±0,42	5,43±0,12
TV3	7,73±0,32	11,59±0,56	18,93±0,49	3,00±0,62	5,27±0,95	5,50±0,35
TV4	4,86±0,67	7,87±0,35	10,83±0,60	3,17±0,70	4,42±0,20	4,41±0,20

Bảng 2. Chất lượng cây giống Xạ can ở các thời vụ.

TT	Công thức	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Đường kính thân giả (mm)	Đường kính thân củ (mm)
1	TV1	26,13	13,30	7,27	11,90
2	TV2	33,63	17,66	9,33	30,55
3	TV3	24,40	13,61	8,49	25,77
4	TV4	20,63	13,21	7,31	20,63
LSD _{0,05}		3,13	2,74	1,02	2,86
CV%		6,0	9,70	6,40	6,40

Kết quả bảng 2 cho thấy, khi xuất vườn, số rễ của cây Xạ can trong nghiên cứu thời vụ có sự chênh lệch rõ nét, dao động từ 20,63 đến 33,63 rễ. Thời vụ 15/2 (TV2) có số rễ nhiều nhất (33,63 rễ), vượt hơn hẳn các thời vụ khác ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$. Thời vụ 15/4 có số rễ thấp nhất (20,63 rễ), tuy nhiên giá trị này không sai khác so với 2 thời vụ còn lại ở cùng mức ý nghĩa $\alpha=0,05$. Tương tự số rễ, chiều dài rễ giữa công thức TV2 (17,66 cm) cũng sai khác với các công thức TV1 (13,30 cm), TV3 (13,61 cm) và TV4 (13,21 cm) ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$. Đường kính thân giả giữa các công thức TV2 (9,33 mm) và TV3 (8,49 mm) không sai khác có ý nghĩa, tuy nhiên, cả 2 thời vụ này đều sai khác với thời vụ 15/1 (7,27 mm) và 15/4 (7,31 mm). Đường kính thân củ cao nhất là của công thức TV2 (30,55 mm) và thấp nhất là TV1 (11,90 mm). Các công thức đều có đường kính thân củ khác nhau ở mức ý nghĩa ($\alpha=0,05$).

Bảng 3. Tỷ lệ nảy mầm và hình thành cây giống của Xạ can ở các thời vụ.

TT	Công thức	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ hình thành cây giống (%)
1	TV1	35,85	35,85
2	TV2	58,04	58,04
3	TV3	51,43	51,43
4	TV4	40,43	40,43
LSD _{0,05}		4,44	4,44
CV%		7,1	7,1

Kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ nảy mầm của các công thức có sự sai khác rất lớn ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$, công thức TV2 cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất (58,04%), TV1 cho tỷ lệ nảy mầm rất thấp (chỉ đạt 35,85%). Công thức TV3 là 51,43% và TV4 là 40,43% có sự khác nhau rõ rệt. Tỷ lệ hình thành cây giống của Xạ can có giá trị ngang bằng với tỷ lệ nảy mầm. Kết quả này cho thấy 100% hạt Xạ can nảy mầm đều hình thành cây giống. Như vậy, thời vụ gieo hạt thích hợp cho Xạ can là vào khoảng 15/2 hàng năm.

Ảnh hưởng của giá thể gieo hạt đến khả năng nảy mầm, hình thành cây giống và chất lượng cây giống Xạ can

Kết quả bảng 4 cho thấy, chiều cao cây Xạ can trung bình sau 30 ngày gieo dao động trong khoảng 4,93-5,74 cm. Cao nhất là công thức GT3 (5,74 cm), thấp nhất là GT1 (4,93 cm). Chiều cao cây Xạ can sau gieo 60 ngày dao động trong khoảng 9,80-13,36 cm. Thấp nhất là công thức GT1 (9,80 cm), GT2 cao nhất (13,36 cm). Chiều cao cây sau khi gieo hạt 90 ngày của công thức GT2 tăng trưởng chậm nhất và đạt giá trị thấp nhất (29,15 cm), GT3 tăng trưởng mạnh nhất (34,97 cm). Ban đầu, cát (GT2) tơi xốp khi cây còn sử dụng dinh dưỡng trong hạt thì sinh trưởng phát triển tốt hơn, sau đó hết dinh dưỡng trong hạt, kích thích cây lớn, lượng dinh dưỡng và nước trong cát không bằng các giá thể khác nên cây có xu hướng sinh trưởng phát triển chậm hơn. Tương tự, giá thể mùn dớn liệu + đất + cát (GT3) vừa tơi xốp vừa có đủ dinh dưỡng, giữ được nước giúp cây phát triển vượt trội hơn hẳn.

Bảng 4. Động thái tăng trưởng chiều cao và số lá xanh cây Xạ can gieo ở các giá thể.

Công thức	Chiều cao cây từ khi gieo đến... (cm)			Số lá xanh từ khi gieo đến... (lá)		
	30 ngày	60 ngày	90 ngày	30 ngày	60 ngày	90 ngày
GT1	4,93±0,36	9,80±0,01	29,15±2,81	3,15±0,36	4,33±0,12	5,33±0,45
GT2	5,15±0,60	13,36±4,43	27,95±2,50	3,93±0,60	4,73±0,31	5,10±0,35
GT3	5,74±1,05	12,87±2,52	34,97±1,57	3,74±1,05	4,73±0,23	5,67±0,51

Số lá xanh trên cây Xạ can trong nghiên cứu giá thể không có sự khác biệt rõ rệt. Sau khi gieo 30 ngày, công thức GT2 có số lá trung bình nhiều nhất (3,93 lá), GT1 thấp nhất (3,15 lá). Sau gieo 60 ngày, GT1 chỉ đạt 4,33 lá, GT2 và GT3 đạt 4,73 lá. Sau 90 ngày, số lá ở GT2 tăng trưởng chậm hơn và có giá trị thấp nhất (5,10 lá), GT3 có số lá cao nhất (5,67 lá).

Bảng 5. Chất lượng cây giống Xạ can ở các giá thể.

Công thức	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Đường kính thân giả (mm)	Đường kính thân củ (mm)
GT1	6,33	9,38	7,46	9,14
GT2	10,39	16,58	5,51	7,05
GT3	10,02	13,19	9,58	11,51
<i>LSD</i> _{0,05}	2,25	1,7	1,27	1,83
<i>CV</i> %	11,1	5,8	7,4	8,8

Kết quả bảng 5 cho thấy, số rễ cây trung bình giữa GT1 có sự khác biệt với GT2 và GT3, dao động từ 6,33 đến 10,39 rễ. GT1 cho số rễ ít nhất (6,33 rễ), thấp hơn GT3 (10,02 rễ) và GT2 (10,39 rễ) ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$. Chiều dài rễ Xạ can ở các công thức giá thể

khác nhau có giá trị sai khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$ và dao động từ 9,38 đến 16,58. Chiều dài rễ lớn nhất là của công thức GT2 (16,58 cm), thấp nhất là công thức GT1 (9,38 cm). Kết quả này là do công thức GT2 với nền giá thể là cát, tơi xốp nhưng không giữ được nước trên bề mặt dẫn đến bộ rễ cây dễ phát triển và đâm sâu hơn để hút nước và muối khoáng; công thức GT1 có nền giá thể là đất, kết cấu chặt hơn so với công thức GT1 và GT3 nên bộ rễ kém phát triển và đâm sâu kém hơn. Đường kính thân giả cây Xạ can giống ở các công thức giá thể khác nhau có sự sai khác ($\alpha=0,05$). Đường kính thân giả nhỏ nhất là của công thức GT2 (5,51 mm), cao nhất là của công thức GT3 (9,58 mm).

Đường kính thân củ là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng cây giống Xạ can. Trong nghiên cứu này, đường kính thân củ của công thức GT3 (mùn dớn liệu + đất + cát) cao nhất (11,51 mm), GT2 (cát) thấp nhất (7,05 mm). Giá thể cát giúp bộ rễ phát triển tốt, nhưng ít dinh dưỡng nên sau 90 ngày thì cây sinh trưởng và phát triển không bằng các giá thể khác. Ngược lại, giá thể mùn dớn liệu + đất + cát vừa tơi xốp vừa giàu dinh dưỡng cung cấp cho cây sinh trưởng và phát triển.

Bảng 6. Tỷ lệ nảy mầm và hình thành cây giống Xạ can ở các giá thể.

TT	Công thức	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ hình thành cây giống (%)
1	GT1	50,02	50,02
2	GT2	53,83	53,83
3	GT3	34,44	34,44
	<i>LSD</i> _{0,05}	4,54	4,54
	<i>CV</i> %	6,7	6,7

Kết quả bảng 6 cho thấy, tỷ lệ nảy mầm của hạt giống Xạ can trong công thức giá thể gieo hạt không sai khác có ý nghĩa ($\alpha=0,05$). Công thức GT1 (giá thể đất) cho tỷ lệ nảy mầm là 50,02%, GT2 (cát) là 53,83%, GT3 (mùn dớn liệu + đất + cát) là 34,44%. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy 100% hạt nảy mầm đều hình thành cây giống.

Như vậy, giá thể hỗn hợp mùn dớn liệu + đất + cát (tỷ lệ 1:1:1) phù hợp nhất để gieo hạt giống Xạ can.

Ảnh hưởng của khoảng cách gieo hạt đến khả năng nảy mầm, hình thành cây và chất lượng cây giống Xạ can

Kết quả bảng 7 cho thấy, chiều cao cây giống Xạ can gieo từ hạt ở các khoảng cách khác nhau không sai khác nhau nhiều ở giai đoạn đầu (trước 60 ngày sau gieo) nhưng có sự thay đổi mạnh mẽ sau 90 ngày sau khi gieo. Sau 30 ngày, chiều cao vượt lá dao động trong khoảng 4,34-4,59 cm và sau 60 ngày là 14,99-15,98 cm. Sau 90 ngày khoảng cách 4x4 cm (K2) và 5x5 cm (K3) có chiều cao lần lượt là 28,51 và 26,60 cm, thấp hơn hẳn so với khoảng cách 3x3 cm (K1). Ban đầu cây Xạ can giống còn nhỏ, khoảng cách mật độ chưa có sự ảnh hưởng sai khác. Sau khoảng 90 ngày sau gieo, khoảng cách 3x3 cm có mật độ cây dày hơn, giữa các cây có sự cạnh tranh mạnh mẽ về ánh sáng nên chiều cao cây có xu hướng vươn cao để đón nhận ánh sáng. Ở các khoảng cách 4-5 cm, kích thước cây ở giai đoạn này chưa cạnh tranh nhau về ánh sáng nhiều nên cây không vươn cao.

Bảng 7. Động thái tăng trưởng chiều cao và số lá xanh trên cây Xạ can ở các khoảng cách gieo hạt.

Công thức	Chiều cao từ khi gieo đến... (cm)			Số lá xanh từ khi gieo đến... (lá)		
	30 ngày	60 ngày	90 ngày	30 ngày	60 ngày	90 ngày
K1	4,43±0,21	14,99±0,57	32,91±0,90	2,20±0,35	4,37±0,20	5,13±0,64
K2	4,34±0,29	15,75±0,65	28,51±1,38	2,20±0,35	4,33±0,61	6,90±0,53
K3	4,59±0,39	15,98±0,70	26,06±1,62	2,00±0,20	4,60±0,20	7,37±0,41

Số lá xanh cây giống Xạ can trung bình ở các khoảng cách gieo hạt khác nhau cũng không có sự sai khác nhiều trong giai đoạn 60 ngày sau gieo (4,33-4,60 lá). Sau 90 ngày sau gieo, số lá xanh đã có sự thay đổi khác biệt, khoảng cách thưa hơn có xu hướng tỷ lệ thuận với số lá xanh. Khoảng cách K1 chỉ đạt 5,13 lá, các khoảng cách K2 và K3 có số lá nhiều hơn và lần lượt đạt 6,90 và 7,37 lá (bảng 7). Kết quả này tương tự như chiều cao vượt lá do nguyên nhân cạnh tranh ánh sáng ở giai đoạn 90 ngày sau gieo.

Bảng 8. Chất lượng cây giống Xạ can ở các khoảng cách gieo hạt.

Công thức	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Đường kính thân giả (mm)	Đường kính thân củ (mm)
K1	10,75	9,53	5,85	11,08
K2	14,75	13,90	8,53	15,56
K3	18,84	15,14	9,82	20,88
LSD _{0,05}	2,6	2,42	1,36	2,66
CV%	7,8	8,3	7,5	7,4

Kết quả bảng 8 cho thấy, số rễ cây giống Xạ can trung bình trong nghiên cứu khoảng cách gieo hạt có sự khác biệt rõ rệt ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$. Cao nhất là công thức K3 với 18,84 rễ/cây, thấp nhất là công thức K1 với 10,75 rễ/cây. Chiều dài rễ của cây giống Xạ can giữa các công thức khoảng cách K2 (đạt 13,90) và K3 (đạt 15,14 cm) là sự sai khác không có ý nghĩa (LSD_{0,05}=2,42). Tuy nhiên, cả 2 công thức này đều có chiều dài rễ vượt hơn công thức khoảng cách K1 chỉ đạt chiều dài rễ 9,53 cm. Đường kính thân của các công thức cũng có những khác biệt nhất định. Đường kính thân giả thấp nhất là của công thức K1 (đạt 5,85 mm), sai khác có ý nghĩa (LSD_{0,05}=1,36) so với công thức K2 (đạt 8,53 mm) và công thức K3 (9,82 mm), tuy nhiên đường kính thân giả giữa 2 công thức khoảng cách gieo hạt K2 và K3 sai khác không ý nghĩa. Đường kính thân củ giống cây Xạ can trong nghiên cứu này có sự khác nhau rất lớn. Đường kính thân củ thấp nhất là của công thức K1 với 11,08 mm, cao nhất là công thức K3 với 20,88 mm. Sự khác nhau về đường kính thân củ cây giống Xạ can trong nghiên cứu khoảng cách gieo hạt là có ý nghĩa (với LSD_{0,05}=2,66). Ở khoảng cách gieo hạt thưa hơn (4x4 cm và 5x5 cm), các cây Xạ can không có sự cạnh tranh nhiều về dinh dưỡng như ở khoảng cách gieo hạt 3x3 cm nên cây sinh trưởng phát triển tốt hơn về số lượng rễ, chiều dài rễ, đường kính thân giả và đường kính thân củ.

Bảng 9. Ảnh hưởng của khoảng cách gieo hạt đến tỷ lệ nảy mầm và hình thành cây giống Xạ can.

STT	Công thức	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ hình thành cây giống (%)
1	K1	50,68	50,68
1	K2	53,26	53,26
3	K3	51,11	51,11
LSD _{0,05}		4,08	3,08
CV%		6,0	6,0

Kết quả bảng 9 cho thấy, tỷ lệ nảy mầm của các công thức khoảng cách gieo hạt sai khác không có ý nghĩa và dao động trong khoảng 50,68-53,26%. Tỷ lệ hình thành cây giống ngang bằng với tỷ lệ nảy mầm.

Như vậy, khoảng cách gieo hạt tối ưu nhất là 4-5 cm, tức là gieo với mật độ 400-625 hạt/m². Ở khoảng cách này, cây giống có đầy đủ không gian để phát triển chiều cao, lá, chiều dài rễ cũng như số rễ ở giai đoạn cây con và không tổn quá nhiều diện tích đất gieo hạt.

Kết luận

Nhân giống hữu tính cho hệ số nhân giống cao và giá thành rẻ. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy thời vụ gieo hạt giống Xạ can thích hợp là vào khoảng 15/2 hàng năm; giá thể tốt nhất là đất + cát + bã được liệu ủ hoai mục với tỷ lệ 1:1:1; khoảng cách gieo hạt thích hợp 4-5 cm. Tỷ lệ nảy mầm đã được nâng cao, đạt hơn 50% và chất lượng cây giống ổn định, khỏe mạnh. Kết quả này sẽ góp phần hoàn thiện kỹ thuật nhân giống hữu tính, phục vụ cho việc sản xuất giống Xạ can.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Huy Bích và cs (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [2] Nguyễn Tuấn Sơn, Đào Đình Thơi, Nguyễn Như Đua, Nguyễn Lê Hoa, Phạm Việt Hà (2016), “Thực trạng bệnh TMH thông thường của cựu chiến binh phường Dịch Vọng, quận Cầu Giấy, Hà Nội năm 2015”, *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội*, **32(2)**, tr.111-116.
- [3] Kuk Hyun Shin, et al. (1999), “Inhibition of Prostaglandin E2 Production by the Isoflavones Tectorigenin and Tectorigenin Isolated from the Rhizomes of *Belamcanda chinensis*”, *Planta Med.*, **65(8)**, pp.776-777.
- [4] Yong Pil Kim, et al. (1999), “Inhibition by tectorigenin and tectoridin of prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 induction in rat peritoneal macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*”, *Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1438(3)**, pp.399-407.
- [5] Sang Hoon Jung, et al. (2003), “Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activities of Isoflavonoids from the Rhizomes of *Belamcanda chinensis*”, *Planta Med.*, **69(7)**, pp.617-622.
- [6] Paul Thelen, et al. (2004), “Tectorigenin and other phytochemicals extracted from leopard lily *Belamcanda chinensis* affect new and established targets for therapies in prostate cancer”, *Carcinogenesis*, **26(8)**, pp.1360-1367.
- [7] Đỗ Thị Thanh Huyền (2016), *Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của hai loài sâm đại hành (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb) và Xạ can (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.)*, Luận án tiến sĩ hóa học, Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST.

Xác định khoảng cách cắt thích hợp cho cây thức ăn xanh *Moringa oleifera* ở năm thứ nhất

Từ Quang Hiền^{1*}, Hoàng Thị Hồng Nhung², Từ Quang Trung³

¹Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên

²Trường Đại học Hùng Vương Phú Thọ

³Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên

Ngày nhận bài 24/12/2018; ngày chuyển phản biện 28/12/2018; ngày nhận phản biện 28/1/2019; ngày chấp nhận đăng 31/1/2019

Tóm tắt:

Thí nghiệm này nhằm xác định khoảng thời gian thích hợp giữa 2 lứa thu hoạch, hay còn gọi là khoảng cách cắt (KCC) đối với cây thức ăn xanh *Moringa oleifera* trong năm thứ nhất. Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức (NT) tương ứng với 5 KCC khác nhau, đó là NT1: 30, NT2: 40, NT3: 50, NT4: 60 và NT5: 70 ngày. Mỗi NT được bố trí trên diện tích 24 m² với 5 lần nhắc lại. Thí nghiệm được bố trí theo mô hình khối hoàn toàn ngẫu nhiên. Kết quả cho thấy, tăng KCC từ 30 lên 50 ngày đã tăng sản lượng vật chất khô (VCK) từ 7,7 lên 10,15 tấn và tăng sản lượng protein thô từ 2,65 lên 3,475 tấn/ha/năm; tăng KCC lên 60 hoặc 70 ngày, sản lượng VCK và protein thô đều giảm xuống so với KCC 50 ngày. Tăng KCC đã làm giảm tỷ lệ protein thô trong VCK từ 34,42 xuống 31,71% và làm tăng tỷ lệ xơ trong VCK từ 7,02 lên 10,53%. Sản lượng VCK và sản lượng protein thô của KCC 40 và 50 ngày cao hơn rõ rệt so với các KCC khác nhưng giữa chúng không sai khác nhau có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, nên thu hoạch *M. oleifera* với KCC 40 hoặc 50 ngày, tối ưu nhất là KCC 50 ngày.

Từ khóa: khoảng cách cắt, *Moringa oleifera*, sản lượng.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Các nghiên cứu về cây *M. oleifera* chủ yếu phục vụ sản xuất rau xanh cho người và làm dược liệu. Với hàm lượng protein thô và carotenoids rất cao trong lá của *M. oleifera* thì bột lá của cây này có thể sử dụng làm nguồn bổ sung protein và carotenoids lý tưởng cho vật nuôi, đặc biệt là gà.

Kỹ thuật trồng, thu hoạch *M. oleifera* làm rau xanh, dược liệu và làm thức ăn chăn nuôi có sự khác nhau. Ví dụ: thu hoạch làm rau xanh cho người thì KCC giữa các lứa phải ngắn để có rau non, nhưng thu hoạch để sản xuất bột lá sử dụng trong chăn nuôi thì KCC phải bảo đảm có sản lượng VCK và protein thô cao.

Chính vì lý do trên, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích xác định KCC thích hợp đối với canh tác cây *M. oleifera* dùng làm thức ăn chăn nuôi.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là cây thức ăn xanh *M. oleifera* ở năm trồng thứ nhất.

Thí nghiệm được thực hiện tại Thái Nguyên trong năm 2018. Thí nghiệm gồm 5 NT, tương ứng với 5 KCC khác nhau, NT1: 30, NT2: 40, NT3: 50, NT4: 60 và NT5: 70

ngày. Mỗi nghiệm thức được trồng trên diện tích 24 m² với 5 lần nhắc lại (24 m² x 5 = 120 m²), bố trí thí nghiệm theo mô hình khối hoàn toàn ngẫu nhiên. Phân bón cho 5 nghiệm thức như nhau, cụ thể: phân chuồng 20 tấn, phân lân 40 kg P₂O₅, phân kali 80 kg K₂O/ha/năm và phân đạm 60 kg N/ha/lúa. Cây con được ươm bằng hạt trong bầu, trồng sau khi ươm 1 tháng, trồng hàng cách hàng 60 cm, cây cách cây 20 cm (60 x 20 cm), thu hoạch sau khi trồng 3 tháng đối với cả 5 NT. Cắt cây cách mặt đất 40-50 cm ở lứa đầu.

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: khí tượng, thành phần hóa học đất, năng suất, sản lượng sinh khối, lá tươi, VCK, protein thô và thành phần hóa học lá.

Phương pháp theo dõi các chỉ tiêu như sau:

Số liệu khí tượng (nhiệt độ, độ ẩm, lượng mưa) thu thập tại trạm quan trắc khí tượng thủy văn tỉnh Thái Nguyên.

Thành phần hóa học đất: độ pH, nitơ tổng số, P₂O₅ tổng số và dễ tiêu, K₂O tổng số và trao đổi được phân tích theo Đoàn Văn Cung và cs (1998) [1].

Năng suất và sản lượng sinh khối, lá tươi, VCK được xác định theo Từ Quang Hiền và cs (2002) [2].

Thành phần hóa học lá được phân tích theo A.O.A.C

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

Determination of optimal harvesting interval for *Moringa oleifera* in the first year production

Quang Hien Tu^{1*}, Thi Hong Nhung Hoang²,
Quang Trung Tu³

¹Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry (TUAF)

²Hung Vuong University

³Thai Nguyen University of Education

Received 24 December 2018; accepted 31 January 2019

Abstract:

This experiment was carried out in order to determine the optimal time between harvests or in other words the harvesting interval (HI) for *Moringa oleifera* in the first year of production. The study consisted of 5 formulas for 5 different harvesting intervals of 30, 40, 50, 60, and 70 days. Each harvesting interval was tested on the area of 24 m² with 5 replications. The trial was designed in the randomized complete block. The results showed that when the harvesting interval increased from 30 days to 50 days, the yield of dry matter (DM) increased from 7.7 tons to 10.15 tons and that of crude protein (CP) went up from 2.65 tons to 3.475 tons/ha/year. When the harvest interval increased to 60 or 70 days, the yield of DM and crude protein went down. The elongated harvesting interval decreased the CP in DM from 34.42 to 31.71% but increased the crude fiber from 7.02 to 10.35%. The DM and CP yields with the intervals of 40 and 50 days were higher than those with other harvesting intervals with considerable differences; however, this differences were not significant between the two above intervals. Therefore, the best harvesting interval of *M. oleifera* was 40 or 50 days; the most optimal interval was 50 days.

Keywords: harvesting interval, *Moringa oleifera*, yield.

Classification number: 4.1

(1990) [3].

Năng lượng thô được xác định bằng bomcalorimeter.

Kết quả thí nghiệm được xử lý thống kê theo Đỗ Thị Ngọc Oanh và Hoàng Văn Phụ (2012) [4] bằng phần mềm IRRISTART 5.0.2009.

Kết quả và thảo luận

Khí tượng và thành phần hóa học đất khu vực thí nghiệm

Khí tượng khu vực thí nghiệm:

Khu vực thí nghiệm nằm trong tỉnh Thái Nguyên, khí tượng của tỉnh trong năm 2017 theo Trạm quan trắc khí tượng thủy văn Thái Nguyên như sau:

Nhiệt độ trung bình năm là 24,2°C, nhiệt độ trung bình tháng từ tháng 4 đến 10 dao động trong khoảng 24,2-25,2°C, các tháng còn lại dao động từ 12-21,7°C, nhiệt độ cao nhất là 40°C (tháng 6), thấp nhất là 7,8°C (tháng 12).

Ẩm độ trung bình năm là 81%, tháng cao nhất là 87% (tháng 8), tháng thấp nhất là 73% (tháng 2 và 12).

Tổng lượng mưa cả năm là 2.045,9 mm, lượng mưa khá cao trong các tháng 6, 7, 8, 9 (từ 233,9 đến 481,1 mm), các tháng còn lại lượng mưa rất thấp (9,6-170,4 mm).

Nhiệt độ, ẩm độ, lượng mưa từ tháng 4-10 thuận lợi cho cây thức ăn xanh sinh trưởng phát triển, các tháng còn lại kém thuận lợi hơn.

Thành phần hóa học đất:

Độ pH của đất thí nghiệm là 6,51. Độ pH này thể hiện đất trung tính, phù hợp với cây *M. oleifera*.

Tỷ lệ và hàm lượng của một số thành phần dinh dưỡng cơ bản của đất khu vực thí nghiệm như sau: nitơ tổng số: 0,16%, P₂O₅ tổng số: 0,13%, P₂O₅ dễ tiêu: 21,05 mg%, K₂O tổng số: 0,91%, K₂O trao đổi: 59,72 mg%. Số liệu này cho thấy, đất thí nghiệm thuộc loại màu mỡ trung bình. Để cây thức ăn có năng suất cao và thu hoạch được lâu dài thì cần phải bón phân cho cây khi trồng và sau mỗi lứa thu hoạch.

Ảnh hưởng của KCC đến năng suất *M. oleifera*

Khoảng thời gian giữa 2 lứa thu hoạch của cây thức ăn xanh được gọi là KCC, thuật ngữ này được sử dụng khá phổ biến trên thế giới. KCC đồng nghĩa với tuổi thu hoạch của cây thức ăn xanh từ sau lứa thu hoạch thứ nhất trở đi.

Số lứa thu hoạch trong một năm phụ thuộc vào KCC, nếu KCC ngắn thì số lứa thu hoạch nhiều và ngược lại. Trong năm thứ nhất số lứa cắt của NT1 là 7, NT2 là 6, NT3 là 5, NT4 và NT5 đều là 4.

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của KCC đến năng

suất của *M. oleifera* trong năm thứ nhất được trình bày trong các mục dưới đây.

Ảnh hưởng của KCC đến năng suất sinh khối của M. oleifera: năng suất sinh khối là toàn bộ khối lượng thân, cành, lá của cây thức ăn thu được trong 1 lứa cắt, đơn vị tính là tạ/ha/lứa. Năng suất sinh khối của các nghiệm thức được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Năng suất sinh khối *M. oleifera* ở các KCC khác nhau.

Lứa	NT1 30 ngày	NT2 40 ngày	NT3 50 ngày	NT4 60 ngày	NT5 70 ngày	SEM	P
1	202,72	290,16	376,29	459,94	538,82		
2	191,79	272,42	352,66	443,27	514,04		
3	162,25	222,34	276,12	326,83	345,12		
4	134,87	120,60	115,26	131,84	127,82		
5	97,69	81,29	84,14				
6	64,71	66,87					
7	60,74						
$\bar{X}_1$	130,68 ^a	175,61 ^d	240,89 ^c	340,47 ^b	381,45 ^a	0,5893	0,0031

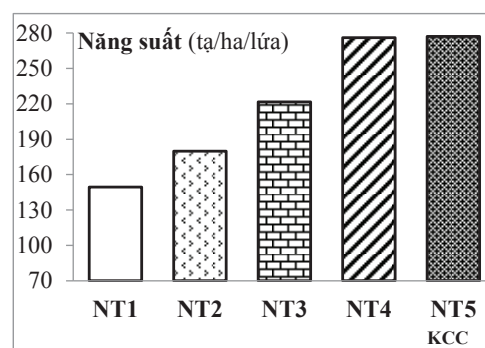
Số liệu bảng 1 cho thấy, diễn biến năng suất sinh khối của các nghiệm thức như sau: ở lứa 1 và 2, cả 5 NT cùng nằm trong mùa mưa nên tác động của KCC đến năng suất sinh khối khá rõ rệt. Năng suất sinh khối lứa 1 và 2 của NT2 cao hơn NT1 là 43,1 và 42,0%, của NT3 cao hơn NT2 là 29,7 và 29,5%, của NT4 cao hơn NT3 là 22,2 và 25,7%, của NT5 cao hơn NT4 là 17,2 và 16,0%.

Lứa 3 có sự khác biệt với lứa 1 và 2, đó là các NT1, NT2 và NT3 vẫn nằm trong mùa mưa, còn NT4 và NT5 đã có một nửa thời gian tái sinh nằm trong mùa khô. Do đó, năng suất sinh khối của NT2 vẫn cao hơn 37,0% so với NT1, NT3 cao hơn 24,2% so với NT2 (gần tương tự như lứa 1 và 2), nhưng năng suất sinh khối của NT4 chỉ cao hơn 18,4% so với NT3 và NT5 chỉ cao hơn 5,6% so với NT4 (thấp hơn so với lứa 1 và 2).

Lứa 4 năng suất sinh khối có diễn biến khác với lứa 1, 2 và 3, năng suất sinh khối của NT2 thấp hơn 10,6% so với NT1; NT3, NT4 và NT5 thấp hơn so với NT1 lần lượt là 14,5; 2,2 và 5,2%. Nguyên nhân là NT1 vẫn nằm trong mùa mưa, các nghiệm thức còn lại do kéo dài KCC nên đã đẩy lùi thời gian tái sinh lứa 4 vào mùa khô, từ đó dẫn đến giảm năng suất sinh khối của cây thức ăn.

Tăng KCC từ 30 lên 70 ngày đã tăng năng suất sinh khối trung bình/lứa của *M. oleifera* từ 130,68 lên 381,45 tạ/ha/lứa. Năng suất sinh khối trung bình/lứa của các nghiệm thức sai khác nhau khá rõ rệt ($p < 0,01$). Nếu các nghiệm thức có cùng số lứa cắt trong một năm thì năng suất bình quân/

lứa tăng cũng có nghĩa là tăng sản lượng/ha/năm, nhưng trong thí nghiệm này số lứa cắt trong năm của các nghiệm thức khác nhau nên năng suất không phải là yếu tố duy nhất quyết định tới sản lượng của cây thức ăn xanh mà sản lượng còn phụ thuộc vào yếu tố thứ 2, đó là số lứa cắt trong 1 năm. Mối quan hệ giữa KCC và năng suất sinh khối còn được minh họa bằng biểu đồ 1.



Biểu đồ 1. Mối quan hệ giữa KCC và năng suất sinh khối.

Năng suất sinh khối trung bình/lứa của cả 5 nghiệm thức của *M. oleifera* là 253,82 tạ/ha/lứa. Năng suất sinh khối trung bình của keo giậu là 151 tạ/ha/lứa [5], của *S. guianensis* CIAT 184 là 194 tạ/ha/lứa [6], của sắn trồng thu lá là 174 tạ/ha/lứa [7]. Như vậy, năng suất sinh khối trung bình/lứa của *M. oleifera* trong thí nghiệm này cao hơn năng suất sinh khối trung bình/lứa của một số cây thức ăn xanh được thông báo bởi các tác giả nêu trên. Các cây này được xếp hàng đầu trong việc sản xuất bột lá bổ sung vào thức ăn cho gà.

Ảnh hưởng của KCC đến năng suất lá tươi: năng suất lá tươi được tính trên cơ sở nhân năng suất sinh khối với tỷ lệ giữa lá tươi/sinh khối. Tỷ lệ lá tươi/sinh khối của 5 NT có sự khác nhau ở các KCC khác nhau. Tỷ lệ này của NT1 đến NT5 lần lượt là 42,79; 43,92; 38,68; 29,28 và 24,72%. Lúc 30 ngày tuổi, lá non chiếm đa số nhưng thân cây vẫn còn bé nên lá chiếm tỷ lệ khá lớn so với toàn bộ sinh khối của cây; lúc 40 ngày tuổi phần lớn lá đã trưởng thành về diện tích và độ dày của lá, do đó tỷ lệ lá/sinh khối cao hơn giai đoạn 30 ngày tuổi; lúc 50 ngày tuổi thân cây phát triển mạnh, đồng thời lá non vẫn còn tiếp tục tăng sinh nên tỷ lệ lá/sinh khối có giảm nhưng không lớn; lúc 60 ngày tuổi thân cây tiếp tục tăng trưởng mạnh nhưng phần lớn lá đã ổn định không tăng sinh thêm, do đó tỷ lệ lá/sinh khối giảm mạnh. Lúc 70 ngày tuổi, diễn biến về tăng trưởng của thân và lá tương tự như lúc 60 ngày tuổi nhưng phần lá ở gốc đã già, chuyển sang màu vàng, phần lá này bị loại bỏ, vì vậy tỷ lệ lá trên sinh khối chỉ còn 24,72%, giảm 19,2% so với KCC 40 ngày. Năng suất lá tươi của các nghiệm thức được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Năng suất lá tươi của *M. oleifera* ở các KCC khác nhau.

Lúa	NT1 30 ngày	NT2 40 ngày	NT3 50 ngày	NT4 60 ngày	NT5 70 ngày	SEM	P
1	86,74	127,44	145,55	134,67	133,20		
2	82,07	119,65	136,41	129,79	127,07		
3	69,43	97,65	106,80	95,70	85,31		
4	57,71	52,97	55,58	38,60	31,60		
5	41,80	35,70	32,55				
6	27,69	29,37					
7	25,99						
$\bar{X}_1$	55,92 ^d	77,13 ^c	93,18 ^b	99,69 ^a	94,30 ^b	0,0874	0,0195

Kết quả bảng 2 cho thấy, năng suất lá tươi của các nghiệm thức có diễn biến tương tự như năng suất sinh khối. Khi tăng KCC từ 30 lên 40 ngày, năng suất lá tươi trung bình/lúa tăng thêm 37,9%; tăng từ 40 lên 50 ngày và từ 50 lên 60 ngày, năng suất lá tươi trung bình tăng lên tương ứng là 20,8 và 7,0%. Tăng KCC từ 60 lên 70 ngày, năng suất sinh khối tăng 12,0%, nhưng năng suất lá tươi không những không tăng thêm mà còn giảm 5,4%. Nguyên nhân là tỷ lệ lá tươi/sinh khối ở KCC 70 ngày thấp hơn so với KCC 60 ngày.

Phân tích thống kê cho thấy, năng suất lá tươi trung bình/lúa của các KCC sai khác rõ rệt ($p < 0,05$), trừ NT3 so với NT5.

Ảnh hưởng của KCC đến năng suất VCK: tỷ lệ VCK trong lá tươi có sự khác nhau giữa các NT; tỷ lệ này thấp ở khoảng cách ngắn (lá non có tỷ lệ VCK thấp), và cao khi KCC tăng lên (lá già có tỷ lệ VCK cao). Tỷ lệ VCK trong lá của NT1 đến NT5 lần lượt là 19,67; 20,68; 21,79; 22,32 và 23,68%. Năng suất VCK của các NT được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Năng suất VCK của *M. oleifera* ở các KCC khác nhau.

Lúa	NT1 30 ngày	NT2 40 ngày	NT3 50 ngày	NT4 60 ngày	NT5 70 ngày	SEM	P
1	17,06	26,36	31,72	30,06	31,54		
2	16,14	24,74	29,72	28,97	30,09		
3	13,66	20,19	23,27	21,36	20,20		
4	11,35	10,95	12,11	8,62	7,48		
5	8,22	7,38	7,09	-	-		
6	5,45	6,07	-	-	-		
7	5,11	-	-	-	-		
$\bar{X}_1$	11,00 ^d	15,95 ^c	20,30 ^b	22,25 ^a	22,33 ^a	0,0249	0,0056

Kết quả bảng 3 cho thấy, năng suất VCK ở các lúa 1, 2, 3 và 4 có diễn biến tương tự như năng suất lá tươi. Vì mặc dù năng suất VCK phụ thuộc vào 2 yếu tố (năng suất lá tươi và tỷ lệ VCK trong lá tươi), nhưng tỷ lệ VCK trong lá tươi chênh lệch nhau không lớn giữa các nghiệm thức. Khi tăng KCC từ 30 lên 40 ngày, từ 40-50, từ 50-60 ngày, năng suất

VCK trung bình/lúa tăng tương ứng là 45,0; 27,3 và 9,6%. Giai đoạn 60-70 ngày, năng suất VCK chỉ tăng 0,4%. Số liệu các bảng 1, 2 và 3 cho thấy, năng suất sinh khối lá tươi và VCK tăng ở giai đoạn 30-50 ngày lớn hơn so với giai đoạn sau (50-70 ngày).

Năng suất VCK trung bình/lúa của các NT sai khác nhau khá rõ rệt ($p < 0,01$), trừ NT 4 so với NT5 (KCC 60 ngày so với 70 ngày). Tuy nhiên, năng suất VCK không hoàn toàn quyết định sản lượng VCK, vì ngoài yếu tố năng suất, sản lượng VCK còn phụ thuộc vào số lúa cắt trong một năm (sản lượng VCK = năng suất VCK trung bình x số lúa cắt trong năm).

Nghiên cứu của các tác giả khác về ảnh hưởng của khoảng cách đến năng suất của một số cây thức ăn xanh khác cũng có kết quả tương tự [8-10].

Fadiyimu và cs (2011) [11], Amaglo và cs (2006) [12], Sanchez (2006) [13] nghiên cứu trên cây *M. oleifera* có cùng nhận định, đó là KCC quá ngắn (thu hoạch sớm quá) sẽ cho năng suất/lúa thấp, kéo dài KCC sẽ tăng năng suất/lúa nhưng khi KCC quá dài, năng suất không tăng thêm nhiều, đôi khi còn giảm xuống.

Ảnh hưởng của KCC đến thành phần hóa học lá *M. oleifera*

Thành phần hóa học của *M. oleifera* bao gồm VCK, protein thô, lipit, xơ, khoáng tổng số đã được phân tích và năng lượng thô đã được xác định. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Thành phần hóa học lá *M. oleifera* ở các tuổi thu hoạch khác nhau.

KCC (ngày)	DM trong lá tươi (%)	% DM					GE Kcal/kg DM
		CP	EE	CF	Ash	NFE	
30	19,67 ^f	34,42 ^{ab}	6,81 ^c	7,02 ^d	8,95 ^d	42,80 ^e	4672 ^a
40	20,68 ^d	35,11 ^a	6,96 ^{bc}	7,16 ^d	8,99 ^d	41,78 ^{bc}	4691 ^a
50	21,79 ^c	34,24 ^{ab}	7,07 ^{abc}	7,94 ^c	9,41 ^c	41,34 ^{ab}	4667 ^a
60	22,32 ^b	33,51 ^b	7,26 ^{ab}	9,05 ^b	9,72 ^b	40,46 ^a	4664 ^a
70	23,68 ^a	31,71 ^c	7,43 ^a	10,35 ^a	10,47 ^a	40,04 ^a	4637 ^a
SEM	0,0166	0,0329	0,0122	0,0201	0,0084	0,0435	5,4104
P	0,0037	0,0074	0,0027	0,0045	0,0018	0,0097	0,9800

Ghi chú: DM: VCK, CP: protein thô, EE: lipit thô, CF: xơ thô, Ash: khoáng tổng số, NFE: dẫn xuất không chứa nitơ, GE: năng lượng thô.

Kết quả bảng 4 cho thấy, khi tăng KCC từ 30 lên 70 ngày đã có sự biến động rõ rệt về các thành phần hóa học của lá *M. oleifera*. Cụ thể: tỷ lệ VCK trong lá tươi thấp hơn ở KCC ngắn (30, 40 ngày) và cao hơn ở các KCC dài (50, 60 và 70 ngày). Tỷ lệ này có sự sai khác khá rõ rệt giữa các KCC ($p < 0,01$). Như vậy, tăng KCC đã làm tăng tỷ lệ VCK trong lá tươi. Trong VCK, tỷ lệ protein thô, dẫn xuất không chứa nitơ và năng lượng thô giảm; tỷ lệ lipit, xơ, khoáng

tổng số tăng. Tỷ lệ protein thô đạt cao nhất ở NT2 và thấp nhất ở NT5 với khoảng chênh lệch là 3,4% (35,11 so với 31,71%), tỷ lệ này của NT1 đến NT3 không sai khác nhau nhưng chúng sai khác rõ rệt so với NT5 ($p<0,01$); tỷ lệ xơ trong VCK tăng 3,33% (từ 7,02 lên 10,35%), tỷ lệ này của NT5 cao hơn với sự sai khác rõ rệt so với các nghiệm thức còn lại ($p<0,01$). Như vậy, tăng KCC quá dài (70 ngày) đã làm giảm chất lượng thức ăn xanh (tỷ lệ protein thấp, tỷ lệ xơ cao sẽ làm giảm khả năng thu nhận và tiêu hóa thức ăn của vật nuôi).

Vì KCC có ảnh hưởng lớn đến chất lượng của cây thức ăn xanh nên vấn đề này đã được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Bùi Quang Tuấn (2005) [8] nghiên cứu về KCC đối với cỏ voi, cỏ ghi nê, Từ Quang Hiền và cs (2013) [14] nghiên cứu trên cỏ *B. decumhens*, Nguyễn Văn Quang và cs (2013) [10] nghiên cứu đối với cỏ *S. guianensis*, Fadiyimu và cs (2011) [11], Sanchez (2006) [13], Amaglo và cs (2006) [12], Nouman (2012) [15] nghiên cứu đối với *M. oleifera*. Các tác giả này đều chỉ ra rằng, KCC tăng đã làm tăng tỷ lệ VCK, xơ và giảm tỷ lệ protein. KCC càng dài các tỷ lệ trên càng tăng hoặc giảm mạnh, làm ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ sử dụng, tỷ lệ tiêu hóa của cây thức ăn xanh.

Tóm lại, khi tăng KCC, tỷ lệ VCK trong lá tươi cũng tăng theo. Trong VCK, tỷ lệ lipid, khoáng tổng số có biến động không lớn, tỷ lệ protein thô giảm và tỷ lệ xơ tăng mạnh khi KCC quá dài (70 ngày). Đây là những điều cần lưu ý khi thu hoạch cây thức ăn xanh.

Ảnh hưởng của KCC đến sản lượng của *M. oleifera*

Sản lượng được tính bằng cách cộng năng suất của tất cả các lứa trong năm hoặc nhân năng suất trung bình/lứa với số lứa cắt trong năm, sau đó đổi đơn vị tính từ tạ sang tấn (tấn/ha/năm), cách tính thứ hai sai lệch 1-3% so với cách tính thứ nhất do làm tròn số năng suất trung bình/lứa. Sản lượng sinh khối, lá tươi, VCK và protein thô được trình bày tại bảng 5.

Bảng 5. Sản lượng *M. oleifera* ở các KCC khác nhau (tấn/ha/năm).

Chỉ tiêu	NT1 30	NT2 40	NT3 50	NT4 60	NT5 70	SEM	P
Sinh khối	91,476 ^c	105,366 ^d	120,445 ^c	136,188 ^b	152,580 ^a	0,1267	0,028
Lá tươi	39,144 ^b	46,278 ^c	46,590 ^c	39,876 ^b	37,720 ^a	0,0279	0,0062
VCK	7,700 ^c	9,570 ^{ab}	10,150 ^b	8,900 ^a	8,932 ^a	0,0039	0,0009
CP	2,650 ^f	3,360 ^b	3,475 ^a	2,982 ^c	2,832 ^d	0,0016	0,0003

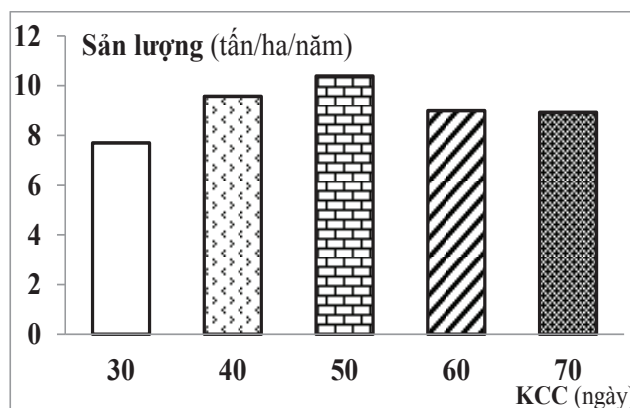
Kết quả bảng 5 cho thấy, tăng KCC từ 30 lên 70 ngày các chỉ tiêu sản lượng có diễn biến như sau: sản lượng sinh khối

tăng từ 91,476 lên 152,580 tấn/ha/năm, tăng KCC từ 30 lên 40 ngày, từ 40-50, từ 50 lên 60 và 60 lên 70 ngày, sản lượng sinh khối tăng thêm tương ứng là 13,890; 15,079; 15,743 và 16,392 tấn/ha/năm. Sản lượng sinh khối của các nghiệm thức sai khác nhau rõ rệt ($p<0,05$).

Sản lượng lá tươi tăng từ 39,144 tấn (NT1) lên 46,590 tấn (NT3), sau đó giảm xuống còn 37,720 tấn/ha/năm ở NT5. Sản lượng lá tươi của các nghiệm thức sai khác nhau rõ rệt ($p<0,01$), trừ NT2 so với NT3.

Sản lượng VCK cũng có diễn biến tương tự như sản lượng lá tươi, tăng dần từ NT1 đến NT3, sau đó giảm xuống. Tuy nhiên, chỉ có sản lượng của NT1 sai khác rõ rệt so với các nghiệm thức còn lại và của NT3 sai khác rõ rệt với NT4, NT5 ($p<0,01$). VCK là chỉ tiêu quan trọng hàng đầu trong việc đánh giá khả năng sản xuất của cây thức ăn xanh. Vì vậy, có thể sơ bộ nhận định *M. oleifera* thu hoạch ở KCC 40 đến 50 ngày là phù hợp.

Mối quan hệ giữa KCC và sản lượng VCK còn được minh họa bằng biểu đồ 2.



Biểu đồ 2. Mối quan hệ giữa KCC và sản lượng VCK.

Biểu đồ 2 cho thấy, sản lượng protein thô tăng dần từ KCC 30 đến 50 ngày, sau đó giảm xuống ở KCC 60 và 70 ngày. Như vậy, kéo quá dài KCC sẽ không làm tăng sản lượng protein thô, vì tỷ lệ protein thô trong VCK giảm xuống. Sản lượng protein thô của các KCC sai khác nhau rõ rệt ($p<0,001$).

Các tác giả Nguyễn Văn Quang và cs (2013) [10], Bùi Quang Tuấn (2005) [8], Từ Quang Hiền và cs (2013) [14], Từ Trung Kiên và cs (2010) [9] đã nghiên cứu về ảnh hưởng của KCC đến sản lượng một số cây thức ăn xanh. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng tăng KCC làm tăng sản lượng chất xanh, VCK, protein thô, nhưng khi tăng KCC quá dài, sản lượng tăng thêm không đáng kể, thậm chí còn giảm xuống.

Nghiên cứu đối với cây *M. oleifera*, Fadiyimu và cs (2011) [11] cho biết, KCC 28-42 ngày trong mùa mưa và 84 ngày trong mùa khô cho sản lượng cao nhất; Amaglo và

cs (2006) [12] cho rằng KCC 35 ngày là phù hợp nhất; theo Nouman (2012) [15] thì KCC 30 ngày là hợp lý, trừ mùa khô; nhưng Sanchez (2006) [13] lại thông báo rằng KCC 75 ngày cho sản lượng chất xanh, VCK cao nhất đối với tất cả các mật độ trồng mà ông đã nghiên cứu.

Nhìn chung, KCC dài hay ngắn tùy thuộc vào điều kiện khí tượng, dinh dưỡng đất và phải đảm bảo cây tích tụ đủ chất dinh dưỡng dùng cho tái sinh lứa sau [16, 17].

Kết luận

Căn cứ vào sản lượng VCK và protein thô thì không nên thu hoạch *M. oleifera* ở KCC 30, 60 và 70 ngày, nên lựa chọn các KCC 40 hoặc 50 ngày, tối ưu nhất là KCC 50 vì KCC này có sản lượng VCK và protein thô cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đoàn Văn Cung, Phạm Văn Luyến, Trần Thúc Sơn, Nguyễn Văn Sứ, Trần Thị Tâm (1998), *Sổ tay phân tích đất, nước, phân bón và cây trồng*, Viện Thổ nhưỡng nông hóa, NXB Nông nghiệp.
- [2] Từ Quang Hiền, Nguyễn Khánh Quắc, Trần Trang Nhung (2002), *Giáo trình đồng cỏ và cây thức ăn gia súc*, NXB Nông nghiệp.
- [3] A.O.A.C. (1990), *Official Methods of Analysis of the*, 15th edition. A.O.A.C., Inc. Arlington, Virginia, USA. 746.p.
- [4] Đỗ Thị Ngọc Oanh, Hoàng Văn Phú (2012), *Giáo trình phương pháp thí nghiệm đồng ruộng*, NXB Nông nghiệp.
- [5] Trần Thị Hoan, Từ Quang Hiền, Từ Quang Trung (2017), “Nghiên cứu khả năng sản xuất chất xanh và bột lá của cây keo giậu (*Leucaena leucocephala*) tại Thái Nguyên”, *Kỷ yếu Hội nghị chăn nuôi thú y toàn quốc*, tr.290-296.
- [6] Từ Quang Hiền, Trần Thị Hoan, Từ Quang Trung (2017), “Nghiên cứu năng suất chất xanh và bột cỏ của cỏ *Stylosanthes guianensis* CIAT 184”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **19(8)**, tr.23-27.
- [7] Từ Quang Hiền, Từ Quang Trung (2016), “Nghiên cứu khả năng sản xuất chất xanh và bột lá của sản trồng thu lá tại tỉnh Thái Nguyên”, *Tạp chí Chăn nuôi, Hội chăn nuôi Việt Nam*, **214**, tr.52-56.
- [8] Bùi Quang Tuấn (2005), “Ảnh hưởng của tuổi thu hoạch đến năng suất và chất lượng thức ăn của cỏ voi (*P. purpureum*), cỏ Ghi nê (*P. maximum*) trồng tại Đan Phượng, Hà Nội”, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*, **3(3)**, tr.202-206.
- [9] Từ Trung Kiên, Từ Quang Hiền, Trần Thị Hoan, Trần Trang Nhung (2010), “Nghiên cứu ảnh hưởng của KCC khác nhau đến khả năng thu nhận, tỷ lệ cỏ được sử dụng và tỷ lệ tiêu hóa của một số giống cỏ nhập nội (*P. atratum*, *B. brizantha*, *B. decumhens*) trên bò thịt”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, **67(5)**, tr.109-112.
- [10] Nguyễn Văn Quang, Hoàng Đình Hiếu, Bùi Việt Phong, Phí Như Liễu (2013), “Ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật đến năng suất chất xanh của giống cỏ *S. guianensis* CIAT 184 và *S. guianensis plus* tại Bến Cát, Bình Dương”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Chăn nuôi, Viện Chăn nuôi*, **44**, tr.21-32.
- [11] A.A. Fadiyimu, et al. (2011), “Effect of cutting regimes on seasonal fodder yield of *Moringa oleifera* in the tropical rainforest of Nigeria”, *Livestock Research for Rural Development*, **23(2)**.
- [12] N.K. Amaglo, et al. (2006), “Effect of spacing and harvest frequency on the growth and leaf yield of moringa (*M. oleifera*), a leafy vegetable crop”, *Moringa and other highly nutritious plant resources: Strategies, standards and markets for a better impact on nutrition in Africa*.
- [13] N.R. Sanchez (2006), *Moringa oleifera and cratylia argentea: potential fodder species for ruminants in Nicaragua*, Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- [14] Từ Quang Hiền, Từ Trung Kiên, Trần Thị Hoan (2013), “Xác định KCC thích hợp cho cỏ *Brachiria decumhens* basilisk trồng tại Thái Nguyên”, *Tạp chí Khoa học và công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, **104(4)**, tr.23-27.
- [15] W. Nouman (2012), “Biomass production and nutritional quality of *Moringa oleifera* as field crop”, *Turk. Agric. Fores.*, **37**, pp.410-419.
- [16] C.R. Latt, et al. (2000), “Interaction among cutting frequency, reserve carbohydrates, and post-cutting biomass production in *Gliricidia sepium* and *leucaena leucocephala*”, *Agrofor. Syst.*, **50**, pp.27-46.
- [17] G. Assefa (1998), “Biomass yield, botanical fractions and quality of tagasaste (*Chamaecytisus palmensis*) as affected by harvesting interval in the highlands of Ethiopia”, *Agrofor. Syst.*, **42**, pp.13-23.

Đánh giá sự biến đổi chất lượng của tôm sú nhằm xác định hạn sử dụng bằng các phương pháp bảo quản khác nhau

Lê Nhất Tâm^{1*}, Đoàn Như Khuê¹, Huỳnh Nguyễn Quế Anh¹,
Trương Huỳnh Anh Vũ², Chu Văn Hải²

¹Trường Đại học Công nghiệp TP Hồ Chí Minh

²Trung tâm Dịch vụ phân tích thí nghiệm TP Hồ Chí Minh,
Sở KH&CN TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 27/12/2018, ngày chuyển phản biện 7/1/2019; ngày nhận phản biện 18/3/2019; ngày chấp nhận đăng 25/3/2019

Tóm tắt:

Những biến đổi chất lượng cảm quan, hóa sinh và vi sinh của tôm sú sau thu hoạch được xem xét trong nghiên cứu này. Tôm được xử lý và bảo quản bằng các phương pháp khác nhau ở 0°C trong 14 ngày. Ba mẫu tôm xử lý được đánh giá so với mẫu đối chứng (bảo quản 0°C). Các phương pháp xử lý, bảo quản bao gồm ngâm trong dịch polyphenol 2,5%, bảo quản chân không, và kết hợp ngâm trong dịch polyphenol trước khi bảo quản chân không. Các chỉ số chất lượng bao gồm TVC (total viable count), QI (quality index), TVB-N (total volatile base nitrogen) và TMA-N (trimethylamine nitrogen) được xác định trong suốt quá trình bảo quản. Kết quả cho thấy, TVC tăng đáng kể vào cuối thời gian bảo quản. TVB-N và TMA-N tăng cùng với thời gian bảo quản nhưng ở hai giai đoạn khác nhau. Giá trị QI tương quan tuyến tính với thời gian bảo quản. Hạn sử dụng của các mẫu xử lý dài hơn so với mẫu đối chứng. Các mẫu đóng gói chân không có thể duy trì chất lượng tôm trong 12 ngày. Thời hạn sử dụng còn lại có thể ước tính thông qua phương trình hồi quy tuyến tính.

Từ khóa: polyphenol, QI, TMA-N, tôm sú, TVB-N, TVC.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Tôm sú và tôm thẻ chân trắng là hai loài tôm xuất khẩu mạnh ở Việt Nam trong những năm gần đây. Kim ngạch xuất khẩu từ tôm so với tổng kim ngạch xuất khẩu ngành thủy sản năm 2016: 47% (3,3 tỷ USD/7,45 tỷ USD); năm 2017: 45% (3,8 tỷ USD/8,30 tỷ USD); năm 2018: 39,80% (3,58 tỷ USD/9 tỷ USD). Tuy nhiên, tôm cũng như các loài thủy sản khác, dễ bị hư hỏng sau thu hoạch so với các loài súc sản. Nguyên nhân do cấu trúc cơ thịt của các loài thủy sản lỏng lẻo hơn so với các loài sinh vật trên cạn, thêm vào đó mạng collagen của chúng cũng kém chặt chẽ hơn [1]. Tôm sau khi thu hoạch thường được bảo quản bằng nước đá, sau đó chuyển đến điểm thu mua. Tại đây, tôm được bảo quản đông lạnh. Vì vậy, chất lượng tôm suy giảm đáng kể trong khoảng thời gian bảo quản bằng nước đá. Đây chính là lý do tại sao nhiều nghiên cứu hướng tới kéo dài hạn sử dụng trong khoảng thời gian này [2-4]. Các phương pháp nghiên cứu nhằm kéo dài hạn bảo quản thực phẩm có thể được chia làm 2 nhóm. Nhóm truyền thống như các phương pháp bảo quản lạnh, lên men, ướp muối, và nhóm hiện đại như phương

pháp bảo quản trong biến đổi thành phần khí (MAP), xử lý bằng nước ozon, xử lý bằng các muối acid hữu cơ, xử lý bằng các hợp chất có hoạt tính sinh học [5]. Tiến trìnhươn hổng tôm sau khi chết trải qua 2 giai đoạn tự phân và phân hủy. Trong đó, vi khuẩn là tác nhân chính ở giai đoạn sau [6]. Các yếu tố bao gồm enzyme, vi khuẩn, và phản ứng hóa học được xem là nguyên nhân gây ra tiến trình này [1]. Sự tác động của 3 yếu tố trên gây nên những biến đổi trạng thái cảm quan, vật lý, thành phần hóa học, và lượng vi sinh vật ở tôm. TVB-N và TMA-N là hai chỉ số luôn được sử dụng để đánh giá chất lượng thủy sản, và Howgate (2010) đã có 2 công bố về hai chỉ số này [7]. Quality index method (QIM) được xem là phương pháp cảm quan được ưa chuộng nhất hiện nay trong đánh giá chất lượng thủy sản do đặc tính ưu việt của nó. Sự khác biệt của phương pháp này so với các phương pháp trước đây như EC scheme hay Quantitative Descriptive Analysis (QDA) là phương pháp đánh giá được xây dựng trên một loài cụ thể [8, 9]. Điều này giúp cho các chuyên gia đánh giá dễ dàng cảm nhận mức độ biến đổi của các thuộc tính cảm quan. Vì vậy, công tác huấn luyện hội đồng đánh giá cảm quan sản phẩm được tiến hành dễ dàng

*Tác giả liên hệ: Email: lenhattam@iuh.edu.vn

Evaluation on the changes in black tiger shrimp quality to determine its shelf-life using different preservation methods

Nhat Tam Le^{1*}, Nhu Khue Doan¹, Nguyen Que Anh Huynh¹,
Huynh Anh Vu Truong², Van Hai Chu²

¹Industrial University of Ho Chi Minh City

²Center of Analytical Services and Experimentation Ho Chi Minh City

Received 27 December 2018, accepted 25 March 2019

Abstract:

The changes in sensory, biochemical, and microbiological qualities of post-harvest black tiger shrimp were investigated in this research. Shrimp was treated and stored by different methods during 14 days at 0°C. Three treated shrimp samples were evaluated in comparison to the control sample (stored at 0°C only). The preservation methods included immersing in polyphenol solution, vacuum packing, and combination of polyphenol solution and vacuum packing. Quality indices including total viable count (TVC), quality index (QI), total volatile basic nitrogen (TVB-N) and trimethylamine nitrogen (TMA-N) were determined during the storage. Results showed that TVC increased dramatically at the end of the storage period. TVB-N and TMA-N increased in accordance with the increase of storage time but at two different stages. The QI was linearly correlated with the storage time. The shelf-life of the treated samples was longer than that of the control samples. Vacuum packing could maintain the quality of shrimp samples for 12 days. Shelf-life remaining can estimate through the linear regression equation.

Keywords: black tiger shrimp, polyphenol, QI, TMA-N, TVB-N, TVC.

Classification number: 4.5

hơn, và kết quả đánh giá chính xác hơn. Hyldig cùng cộng sự (2004) dự đoán QIM là một phương pháp sẽ được sử dụng chính thức trong đánh giá chất lượng thủy sản ở cộng đồng châu Âu trong tương lai [8]. Vi khuẩn được xem là nguyên nhân chủ yếu gây nên quá trình hư hỏng thủy sản ở giai đoạn 2 [10]. Vì vậy, chỉ số TVC luôn được xem xét đánh giá [11, 12]. Ở nước ta hiện nay xu hướng phân loại các loại tôm nói chung vẫn theo tiêu chuẩn TCVN 3726-89 [13], và chưa có quy định đánh giá cho từng loại như phương pháp

QIM. Xu hướng nghiên cứu đánh giá kết hợp giữa các yếu tố cảm quan, hóa học, vi sinh đến độ tươi, đồng thời đánh giá phân loại chất lượng bằng các chỉ số chất lượng vẫn ít được đề cập. Đốm đen hay còn gọi là melanin xuất hiện rất nhanh ở loài giáp sát nói chung và tôm nói riêng nếu như bảo quản không hợp lý. Mặc dù đã có những công bố là melanin không ảnh hưởng tới sức khỏe người tiêu dùng, nhưng chúng làm giảm đáng kể giá trị kinh tế của tôm [14]. Nguyên nhân hình thành các đốm đen ở tôm bắt đầu từ các sinh vật gây bệnh chứa các thành phần như PGBP (phức peptidoglycan và protein), LGBP (phức lipopolysaccharide và β -1,3-glucan - protein) và BGBP (β -1,3-glucan kết hợp protein) kích hoạt các enzyme polyphenoloxidase (PPO) từ vô hoạt trở nên có hoạt tính. Tiếp theo, PPO xúc tác chuyển hóa các nhóm phenol ở các acid amine thành quinone không màu. Cuối cùng các phân tử quinone bị oxy hóa bởi oxy không khí hình thành các sắc tố màu đen gọi là melanin [14]. Như vậy, có hai yếu tố liên quan đến sự tạo đốm đen, thứ nhất là sự có mặt các nhóm phenolic tồn tại ở các acid amine như tyrosine, phenylalanine; thứ hai là sự có mặt của oxygen trong quá trình oxy hóa các phân tử quinon thành melanin.

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xem xét mối tương quan giữa các chỉ số chất lượng QI, TVC, TVB-N, TMA-N và thời gian bảo quản, xem xét khả năng ức chế hình thành đốm đen ở tôm. Hai phương pháp bao gồm bảo quản chân không, xử lý tôm với dung dịch polyphenol trước khi bảo quản, và kết hợp cả hai phương pháp trên được đưa vào thực hiện trong nghiên cứu này. Từ đó đưa ra phương pháp cải thiện chất lượng và kéo dài hạn sử dụng tôm sú sau thu hoạch.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu

Tôm sú: tôm sú được thu mua ở chợ đầu mối Bình Điền (TP Hồ Chí Minh). Tôm được lựa chọn có cấu trúc nguyên vẹn, còn sống, kích cỡ 35-40 con/kg. Khối lượng tôm dùng thí nghiệm là 30 kg, tôm được rửa bằng nước sạch, phân vào 300 túi polyethylene vô trùng. Các túi mẫu được bảo quản trong thùng polystyrene chứa đá bào với tỷ lệ tôm: đá = 1:2 (w/w), và được chuyển đến phòng thí nghiệm sau 2 giờ. Tại phòng thí nghiệm, các túi mẫu được tiếp tục đặt trong thùng xốp và giữ lạnh ở 0°C bằng tủ lạnh.

Hóa chất, thiết bị phân tích:

- Dung dịch polyphenol 2,5%: dung dịch polyphenol được chiết từ rong sụn *Cottonii* (*Kappaphycus alvarezii*) dạng khô, được mua từ một cửa hàng ở phường Trung Mỹ Tây, quận 12, TP Hồ Chí Minh. Cân chính xác 20 g rong sụn, nghiền nhỏ. Dung môi ethanol cho vào rong sụn theo tỷ lệ 15 ml ethanol/1 g rong sụn, trích ly ở nhiệt độ 40°C trong

5 giờ [15]. Dịch chiết thu được được cô quay chân không để lấy cao ethanol có khối lượng từ 1,6 đến 2,0 g. Dung dịch polyphenol 2,5% được chuẩn bị từ kết quả đo tổng hàm lượng polyphenol.

- Hóa chất: chuẩn TMA được đặt mua từ Công ty Sigma-Aldrich (Singapore). Các dung môi và hóa chất sử dụng trong phân tích như ethanol, toluene, acid picric, trichlormethanol được cung cấp từ Công ty Merck.

- Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu: thiết bị cô quay chân không eyela/Nhật (N-1200AS, 243110), thiết bị quang phổ hấp thụ UV-Vis Thermo - Mỹ (GENESYS 50 UV-Vis), thiết bị đóng gói chân không Falcon 80 (Henkelmen Hà Lan), thiết bị đo độ chân không Testo 552 (Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp bố trí thí nghiệm: tại phòng thí nghiệm, 300 túi tôm được chia làm 4 phần, được bảo quản ở 0°C theo 4 kỹ thuật như sau:

Phần 1: mẫu đối chứng (ĐC): tôm được giữ nguyên và được bảo quản ở 0°C.

Phần 2: mẫu bảo quản trong túi chân không (CK): tôm được cho vào túi hút chân không đạt tới giá trị 2,50 mbar, xác định bởi thiết bị Testo 552, bảo quản ở 0°C.

Phần 3: mẫu xử lý trong dịch chiết polyphenol 2,5% (PP) trước khi bảo quản: tôm được nhúng trong dịch chiết polyphenol 2,5% (PP) trong khoảng thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4°C, bảo quản ở 0°C.

Phần 4: mẫu xử lý trong dịch chiết polyphenol 2,5% (PP), sau đó được bảo quản trong túi chân không (PP/CK): tôm được nhúng trong dịch chiết polyphenol 2,5% trong khoảng thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó các túi mẫu được hút chân không đạt tới giá trị 2,50 mbar, xác định bởi thiết bị Testo 552, bảo quản ở 0°C.

Thời gian, nhiệt độ và nồng độ các dung dịch dùng xử lý tôm trước khi bảo quản được áp dụng như nghiên cứu của Sallam cùng cộng sự (2007) [16]. Tôm được bảo quản trong 14 ngày, tần suất lấy mẫu 1 ngày/lần. Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm TVC, TMA, TVC, và QI.

Phương pháp phân tích:

- Phương pháp xác định TVC: phương pháp xác định TVC được thực hiện theo thông báo của Leboffe và Pierce (2012) [17]. Trong đó, 10 g tôm bảo quản ở những khoảng thời gian khác nhau được nghiền mịn với 90 ml dung dịch NaCl 0,9%, ly tâm và thu lấy phần dịch. Dịch thu được tiến hành pha loãng 10 lần. Các dung dịch có nồng độ pha loãng bao gồm 10^{-3} , 10^{-4} và 10^{-5} được chọn để nghiên cứu. Mật độ vi sinh vật được đánh giá theo phương pháp đếm trên đĩa. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và giá trị TVC được trình

bày dưới dạng log CFU/g (colony forming units).

- Phương pháp QIM cho tôm sú: phương pháp đánh giá QIM cho tôm sú được thực hiện như của Lê Nhất Tâm và cộng sự (2017) [18]. Hội đồng gồm 6 chuyên gia tham gia xây dựng phương pháp QIM cho tôm sú. Đầu tiên tôm được để ương tự nhiên, các chuyên gia sẽ quan sát, mô tả các chỉ tiêu bao gồm màu sắc, cấu trúc và mùi. Các thuộc tính của các chỉ tiêu này sẽ được ghi nhận cẩn thận theo trình tự từ lúc tươi cho đến khi ương hỏng hoàn toàn. Tiếp theo, các chuyên gia sẽ sắp xếp thứ tự các thuật ngữ mô tả vào trong khung điểm từ 0 đến 3 theo độ tươi giảm dần. Bảng 1 là khung đánh giá điểm chất lượng cho các mục tiêu màu, cấu trúc và mùi. Các thuộc tính đánh giá bao gồm đầu, thân, đuôi, hình dáng và thịt.

Bảng 1. Chương trình đánh giá QIM cho tôm sú (*Penaeus monodon*)

Thuộc tính	Mô tả	QI
Đầu	Hồng sáng	0
	Xanh đồng sáng, không có điểm đen	1
	Xanh đồng, hơi đen, có vài vài đốm đen.	2
	Đen	3
Thân	Xanh đồng, sáng óng ánh	0
	Xanh nâu, độ sáng giảm, hơi đục.	1
	Đỏ nâu, đục, có vài đốm đen	2
	Đen	3
Màu	Hồng sáng,	0
	Xanh đồng, sáng	1
	Xanh đồng, hơi đen, có vài đốm đen	2
	Đen	3
Đuôi	Trắng sáng	0
	Trắng đục	1
	Hơi hồng	2
	Hồng hay hơi vàng	3
Hình dáng	Săn chắc, đầu gắn chặt vào thân	0
	Săn chắc, đầu gắn vào thân hơi lỏng.	1
	Đầu gắn vào thân lỏng, vỏ gắn vào thịt hơi yếu.	2
	Đầu gần như rụng khỏi thân, thịt dễ tách khỏi vỏ	3
Cấu trúc	Cứng, đàn hồi	0
	Hơi mềm, độ đàn hồi giảm	1
	Mềm vừa phải	2
	Mềm và chảy nước	3
Mùi	Tươi	0
	Rong biển	1
	Không mùi, hơi chua	2
	Chua nồng	3

- Phương pháp xác định TVB-N: hàm lượng TVB-N trong tôm được xác định theo công bố của Jinadasa [19]. Tôm sau khi lột vỏ, bỏ đầu được cân khoảng 5 g rồi xay nhuyễn với 90 ml acid perchloric bằng máy xay (MX-SM1031S, Panasonic, Japan). Dịch sau khi trích ly được ly tâm và lọc qua giấy lọc định lượng Whatman số 1 (Sigma Aldrich, Germany) và định mức bằng nước cất thành 100 ml. Tiến hành chưng cất dịch thu được trong môi trường kiềm, các thành phần của TVB được hấp thu bằng một lượng dư NaOH 0,1N và dùng HCl 0,1N để chuẩn độ.

- Phương pháp xác định TMA-N: hàm lượng TMA-N được xác định theo tiêu chuẩn AOAC 971-14 [20]. Cân $10 \pm 0,01$ g thịt tôm rồi tiến hành trích ly 3 lần, mỗi lần 30 ml dung dịch TCA 7,5% (w/v). Toàn bộ dịch trích ly đem đi ly tâm bằng máy ly tâm (Hetich-EBA 20S, Sigma-Aldrich, Germany) ở 4.000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó định mức 100 ml bằng nước cất. Tiếp theo trimethylamine cho phản ứng với acid picric tạo muối pirat có màu vàng. Lượng muối này được xác định bằng phương pháp phổ hấp thụ UV-Vis, với bước sóng hấp thụ cực đại ở 410 nm.

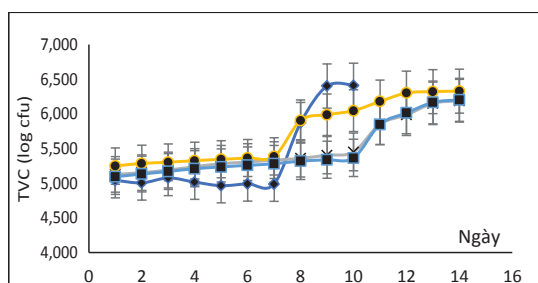
- Phương pháp định lượng tổng polyphenol: hàm lượng polyphenol được xác định theo tiêu chuẩn ISO 145021:2005 [21].

Phương pháp xử lý số liệu: tất cả các thí nghiệm được tiến hành 3 lần. Dữ liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics centurion, xác định mô hình tuyến tính bằng MS. Excel (2010). Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$.

Kết quả và bàn luận

Biến đổi Total viable count (TVC)

Kết quả đánh giá lượng TVC ở các mẫu tôm theo ngày bảo quản được trình bày ở hình 1. Giá trị TVC của các mẫu khảo sát ở ngày 1 gần như không có sự khác biệt đáng kể. Giá trị TVC bằng 5,04; 5,13; 5,25 và 5,09 mg/100 g tương ứng với mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK. Giá trị TVC ở các ngày tiếp theo tăng rất chậm (CK, PP, PP/CK), hay hầu như không đổi (mẫu ĐC).



Hình 1. Giá trị TVC của các mẫu thí nghiệm theo thời gian bảo quản (♦ mẫu ĐC, x mẫu CK, ● mẫu PP, ■ mẫu PP/CK).

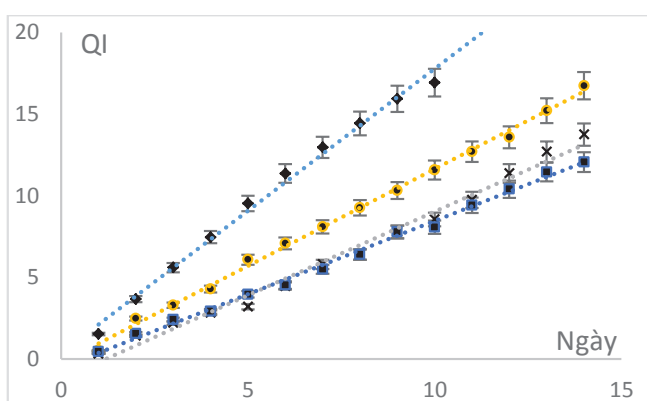
Thời điểm giá trị TVC tăng đột ngột vào ngày thứ 7 cho mẫu ĐC, ngày 10 cho mẫu CK, ngày 7 cho mẫu PP và ngày 10 cho mẫu PP/CK. Điều này có thể giải thích do giai đoạn đầu của quá trình ươn hỏng là tự phân, tác nhân chính trong giai đoạn này được xem là các enzyme nội sinh. Vì vậy lượng TVC tăng không đáng kể [1]. Giá trị TVC của các mẫu vượt ngưỡng $\log \text{cfu} = 6$ tại thời điểm ngày 9, ngày 13, ngày 11 và ngày 13, tương ứng với mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK. Theo Ủy ban quốc tế quy định vi sinh thực phẩm (International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF) đối với tôm đông lạnh giá trị TVC = 6 ($\log \text{cfu/g}$). Như vậy, hạn sử dụng của mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK tương ứng là 8 ngày, 12 ngày, 10 ngày và 12 ngày. Nguyên nhân chủ yếu gây ra sự hư hỏng thực phẩm nói chung và thủy sản nói riêng do tác nhân vi sinh vật [22]. Naik cùng cộng sự nghiên cứu trên tôm sú bảo quản ở 0°C cho thấy, giá trị TVC ban đầu là 3,72; 4,76; 5,33; 5,52 ($\log \text{cfu/g}$) tương ứng ở ngày 0, ngày 2, ngày 4, ngày 6 và đạt giá trị cao nhất là 6,3 ở ngày 8 [12]. Rohani cùng cộng sự (2008) thông báo giá trị TVC đạt ngưỡng $\log \text{cfu} = 6$ tại thời điểm ngày 11 và ngày 15 ứng với điều kiện bảo quản đá và bảo quản trong điều kiện biến đổi thành phần khí (40% CO_2 , 30% O_2 và 30% N_2) [23].

Biến đổi QIM

Kết quả cho thấy, các giá trị QI của 4 mẫu thí nghiệm đều có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các ngày bảo quản như mô tả ở hình 2. Ở ngày đầu tiên, QI có giá trị là 1,53; 0,33; 0,54; 0,45 tương ứng với các mẫu ĐC, CK, PP, PP/CK. Như vậy, ba mẫu được xử lý bằng PP, và bảo quản chân không có giá trị QI ban đầu thấp hơn mẫu đối chứng. Giá trị QI của các mẫu khảo sát tăng tuyến tính theo thời gian bảo quản. Tuy nhiên, do mức độ ảnh hưởng của hoạt chất xử lý và điều kiện bảo quản khác nhau nên độ tăng giá trị QI của mẫu khác nhau. Điều này có thể thấy qua sự tương quan tuyến tính giữa QI và ngày bảo quản (hình 2).

Dựa trên kết quả TVC, chất lượng mẫu đối chứng có hạn sử dụng cho người tiêu dùng là 8 ngày. Tôm bảo quản ở ngày 9 có các dấu hiệu cảm quan: đầu hầu như tách khỏi thân, vỏ tôm tách khỏi phần thịt, thịt biến vàng hay hồng nhạt. Đặc biệt, tôm có mùi chua và tanh rõ rệt. Các đặc tính này cũng thể hiện ở ngày 13, 11, 13 tương ứng với các mẫu CK, PP, PP/CK còn lại. Như vậy, hạn sử dụng của các mẫu tôm là 8 ngày với mẫu ĐC, 12 ngày với mẫu CK, 10 ngày với mẫu PP và 12 ngày với mẫu PP/CK. Tại thời điểm này, các giá trị QI của các mẫu có giá trị 14,33; 11,37; 11,58 và 10,40 tương ứng với mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK. Như vậy, QI của các mẫu PP, CK và PP/CK có giá trị thấp hơn mẫu đối chứng tại thời điểm chất lượng không chấp nhận cho người tiêu dùng. Điều này được giải thích liên quan đến sự hình thành các đốm đen ở tôm như đã trình bày ở phần mở

đầu [14]. Các phân tử polyphenol bổ sung vào tôm sẽ tham gia vào các phản ứng chuyển hóa từ phenol thành quinone, bảo vệ thịt tôm không bị biến đen. Ngoài ra, môi trường chân không sẽ ức chế quá trình oxy hóa quinone thành melanin. Thêm vào đó, polyphenol còn có tính khử, chúng có thể ức chế các tiến trình oxy hóa xảy ra ở tôm. Vì vậy, các tiến trình hình thành đốm đen ở các mẫu này bị ức chế, QI của chúng thấp hơn so với mẫu đối chứng. Nghiên cứu ức chế tạo đốm đen ở tôm cũng được thông báo bởi Nirmal, et al. và Padio, et al. Các tác giả này nghiên cứu ảnh hưởng của các dung dịch acid feruvic, acid ascorbic, acid citric, potassium sorbate và 4-hexyl resorcinol đến sự tạo đốm đen ở tôm (*Panaeus aztecus*) [24, 25].



Hình 2. Giá trị QI của các mẫu thí nghiệm theo thời gian bảo quản (♦ mẫu ĐC, x mẫu CK, ● mẫu PP, ■ mẫu PP/CK). Phương trình hồi quy tuyến tính tương ứng: $y = 1,7392x + 0,3778$, $R^2 = 0,9928$; $y = 1,0253x - 1,2198$, $R^2 = 0,9876$; $y = 1,1875x - 0,2446$, $R^2 = 0,9973$; $y = 0,8974x - 0,5181$, $R^2 = 0,996$, với y là QI, x là ngày bảo quản.

Biến đổi TVB-N

Nhìn chung, giá trị TVB-N của các mẫu có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các ngày ($p \leq 0,05$) và tăng dần theo thời gian bảo quản (bảng 2).

Bảng 2. Giá trị TVB-N của các mẫu tôm thí nghiệm theo thời gian bảo quản.

Thời gian bảo quản	Mẫu ĐC	Mẫu CK	Mẫu PP	Mẫu PP/CK
1	6,47 ^a ±0,05	4,32 ^a ±0,01	6,39 ^a ±0,01	4,61 ^a ±0,00
2	7,77 ^b ±0,01	5,07 ^b ±0,04	7,41 ^b ±0,02	4,89 ^b ±0,01
3	9,09 ^c ±0,01	5,48 ^c ±0,08	8,31 ^c ±0,01	5,25 ^c ±0,02
4	11,37 ^d ±0,03	6,72 ^d ±0,03	9,03 ^d ±0,04	6,77 ^d ±0,04
5	14,58 ^e ±0,08	8,89 ^e ±0,07	11,65 ^e ±0,07	8,28 ^e ±0,01
6	18,89 ^f ±0,02	9,49 ^f ±0,04	14,89 ^f ±0,04	9,12 ^f ±0,05
7	22,73 ^g ±0,02	12,19 ^g ±0,09	17,84 ^g ±0,03	11,71 ^g ±0,04
8	26,17 ^h ±0,04	14,41 ^h ±0,07	20,62 ^h ±0,02	13,87 ^h ±0,02

9	32,30 ⁱ ±0,05	15,73 ⁱ ±0,03	23,68 ⁱ ±0,05	15,50 ⁱ ±0,07
10	37,52 ^j ±0,01	18,67 ^j ±0,02	28,05 ^j ±0,02	18,38 ^j ±0,02
11		23,16 ^k ±0,01	32,45 ^k ±0,01	22,71 ^k ±0,01
12		27,49 ^l ±0,01	37,14 ^l ±0,05	27,19 ^l ±0,06
13		32,36 ^m ±0,07		31,78 ^m ±0,03
14		36,12 ⁿ ±0,04		35,15 ⁿ ±0,03
Phương trình hồi quy tuyến tính	$y = 1,60x + 4,67$ $R^2 = 0,979$ x: 1 đến 4	$y = 1,10x + 2,81$ $R^2 = 0,949$ x: 1 đến 6	$y = 1,2x + 4,92$ $R^2 = 0,929$ x: 1 đến 5	$y = 0,92x + 3,19$ $R^2 = 0,894$ x: 1 đến 6
y: TVB x: ngày	$y = 4,52x - 8,57$ $R^2 = 0,991$ x: 5 đến 10	$y = 3,54x - 14,61$ $R^2 = 0,972$ x: 7 đến 14	$y = 4,05x - 11,17$ $R^2 = 0,988$ x: 6 đến 12	$y = 3,49x - 14,59$ $R^2 = 0,991$ x: 7 đến 14

Giá trị TVB-N ở ngày 1 bằng 6,46 mg/100 g; 4,32 mg/100 g; 6,39 mg/100 g và 4,41 mg/100 g, tương ứng với mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK. Như vậy, các mẫu được bảo quản chân không có giá trị TVB-N thấp hơn. Điều này giải thích do liên quan đến khả năng tăng sinh của vi sinh vật trong môi trường chân không. Đối với mẫu ĐC, TVB-N ở ngày 1 (6,47 mg/100 g) thấp hơn so với nghiên cứu của Reddy cùng cộng sự [2] trên tôm sú là 8,92 mg/100 g và tôm pacific white là 8,01 mg/100 g [24], 7,9 mg/100 g [26], 7,2 mg/100 g [27]. Sự khác biệt này có thể giải thích là do có sự khác nhau về thành phần hóa học giữa các loài tôm, điều kiện nuôi, môi trường nước, chế độ thức ăn cũng như điều kiện sinh lý ở mỗi loại [28, 29]. Bảng 2 cho thấy, sự biến đổi giá trị TVB-N trải qua 2 giai đoạn chậm và nhanh. Khoảng thời gian giai đoạn 1 từ ngày 1 đến ngày 4 đối với mẫu ĐC, đến ngày 6 đối với mẫu CK, đến ngày 5 đối với mẫu PP và đến ngày 6 đối với mẫu PP/CK. Sau đó, giá trị TVB-N tăng nhanh ở những ngày tiếp theo.

TVB-N là tổng lượng các chất dễ bay hơi có tính kiềm. Các chất chủ yếu tạo nên thành phần này là trimethylamine (TMA, sản phẩm từ vi khuẩn gây ươn hỏng), ammonia (sản phẩm từ quá trình deamine hóa các amino acid) và DMA (sản phẩm từ quá trình tự phân bởi enzyme trong suốt quá trình bảo quản lạnh). Các hoạt động này xảy ra trong giai đoạn phân hủy [30]. Điều đó giải thích tại sao TVB-N tăng nhanh ở giai đoạn 2. Tại thời điểm được xem là hạn sử dụng (theo kết quả TVC) giá trị TVB-N là 26,17 mg/100 g; 34,39 mg/100 g; 28,05 mg/100 g và 27,19 mg/100 g, tương ứng với các mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK. Các giá trị này đều thấp hơn 35 mg/100 g được xem là giới hạn cho phép đối với người tiêu dùng [30].

Biến đổi TMA-N

TMA-N là một thành phần của TVB-N, được hình thành từ TMAO thông qua hoạt động của enzyme TMAOase [31]. Giá trị TMA-N của các mẫu được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Giá trị TMA-N của các mẫu tôm thí nghiệm theo thời gian bảo quản.

Thời gian bảo quản	Mẫu ĐC	Mẫu CK	Mẫu PP	Mẫu PP/CK
1	0,67±0,04	0,40±0,03	0,59±0,02	0,40±0,04
2	0,89±0,05	0,59±0,03	0,75±0,02	0,51±0,04
3	1,08±0,02	0,79±0,01	0,98±0,05	0,66±0,01
4	1,53±0,02	0,89±0,02	1,37±0,04	0,85±0,02
5	2,09±0,01	1,21±0,02	1,63±0,04	1,21±0,03
6	3,34±0,01	1,66±0,05	2,48±0,01	1,43±0,06
7	5,15±0,04	2,24±0,05	3,27±0,01	1,90±0,07
8	7,36±0,07	3,02±0,06	4,94±0,04	2,39±0,02
9	9,14±0,04	3,97±0,07	5,83±0,03	3,28±0,04
10	10,48±0,01	4,42±0,03	7,19±0,02	4,22±0,01
11		6,01±0,05	9,21±0,07	5,41±0,02
12		7,24±0,01	11,41±0,01	7,02±0,03
13		10,13±0,05		9,57±0,05
14		12,24±0,01		11,88±0,05
Phương trình hồi quy tuyến tính y: TMA x: ngày	y = 0,28x + 0,35 R ² = 0,957 x: 1 đến 4	y = 0,24x + 0,10 R ² = 0,948 x: 1 đến 6	y = 0,27x + 0,25 R ² = 0,980 x: 1 đến 5	y = 0,21x + 0,10 R ² = 0,964 x: 1 đến 6
	y = 1,76x - 6,93 R ² = 0,994 x: 5 đến 10	y = 1,39x - 8,46 R ² = 0,936 x: 7 đến 14	y = 1,46x - 6,82 R ² = 0,977 x: 6 đến 12	y = 1,41x - 9,06 R ² = 0,940 x: 7 đến 14

Kết quả nghiên cứu cho thấy, giá trị TMA-N của ngày 1 là 0,67 mg/100 g; 0,4 mg/100 g; 0,59 mg/100 g và 0,4 mg/100 g, tương ứng với các mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK. Tương tự như biến đổi TVB-N, giá trị TMA-N thay đổi chậm ở giai đoạn đầu và nhanh ở giai đoạn sau. Tuy nhiên khoảng thời gian này ở các mẫu hoàn toàn khác nhau, nguyên nhân có thể do ảnh hưởng của việc xử lý và bảo quản mẫu. Khoảng thời gian của giai đoạn chậm từ ngày 1 đến ngày 4 với mẫu ĐC, đến ngày 6 với mẫu CK, đến ngày 5 với mẫu PP và đến ngày 6 với mẫu PP/CK. Tại các thời điểm này giá trị TMA-N là 1,53 mg/100 g; 1,66 mg/100 g; 1,63 mg/100 g và 1,43 mg/100 g, tương ứng cho các mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK. Theo thông báo của Bonnell [32], cá tuyết (cod) chất lượng tươi có TMA-N thấp hơn 1,5 mg/100 g. Giá trị này cũng tương đồng với đánh giá của Le, et al. (2017) trên tôm sú, chất lượng tôm đạt loại tốt có giá trị TMA-N thấp hơn 1,51 mg/100 g [18]. TMA-N của các mẫu khảo sát cũng có giá trị gần bằng 1,5 mg/100 g ở thời điểm

cuối của giai đoạn 1 (1,86 mg/100 g; 1,66 mg/100 g; 1,63 mg/100 g; 1,43 mg/100 g), trước khi đi vào giai đoạn phân hủy. Tại thời điểm được xem là giới hạn của hạn sử dụng, giá trị TMA-N của các mẫu đạt như sau: 7,36 mg/100 g; 7,24 mg/100 g; 7,19 mg/100 g và 7,02 mg/100 g, tương ứng với các mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK.

Phương trình hồi quy tuyến tính giữa TVB-N, TMA-N và hạn sử dụng đối với các mẫu khảo sát

Các giá trị của các chỉ số nhìn chung tăng theo thời gian bảo quản. Hạn sử dụng của các mẫu khảo sát được đánh giá dựa trên kết quả TVC. Các chỉ số TVB-N và TMA-N tăng theo thời gian bảo quản. Vì vậy, giá trị của chúng có sự tương quan tuyến tính với nhau. Tuy nhiên, phương trình hồi quy tuyến tính được thể hiện ở 2 giai đoạn khác nhau như đã bàn luận ở trên, và có sự khác biệt giữa các khoảng thời gian ở các mẫu. Đánh giá cảm quan theo phương pháp QIM cho kết quả điểm chất lượng tôm sú biến đổi tuyến tính theo ngày bảo quản. Các phương trình hồi quy tuyến tính đã chứng minh điều này. Sử dụng phương trình hồi quy tuyến tính có thể ước tính hạn sử dụng còn lại cho các mẫu khảo sát. Bằng cách tiến hành đánh giá chất lượng tôm bằng QIM để có điểm QI như mô tả ở bảng 1. Tiếp theo, điểm QI được thay thế vào phương trình hồi quy tương ứng để xác định ngày bảo quản. So sánh số ngày bảo quản với hạn sử dụng suy ra hạn bảo quản còn lại. Bảng 4 mô tả những bàn luận đã đề cập trên.

Bảng 4. Phương trình hồi quy tuyến tính giữa TVB-N, TMA-N, hạn sử dụng, và phương trình hồi quy tuyến tính giữa QI và ngày bảo quản của các mẫu khảo sát.

Mẫu ĐC	Mẫu CK	Mẫu PP	Mẫu CK/PP
Giai đoạn biến đổi chậm			
TVB = 5,71TMA + 2,73 R ² = 0,996 Từ ngày 1 đến ngày 4	TVB = 4,50TMA + 2,50 R ² = 0,933 Từ ngày 1 đến ngày 6	TVB = 4,44TMA + 3,84 R ² = 0,924 Từ ngày 1 đến ngày 5	TVB = 4,63TMA + 2,58 R ² = 0,985 Từ ngày 1 đến ngày 6
Giai đoạn biến đổi nhanh			
TVB = 2,55TMA + 9,39 R ² = 0,980 Từ ngày 5 đến ngày 10	TVB = 2,46TMA + 7,32 R ² = 0,980 Từ ngày 7 đến ngày 14	TVB = 2,51TMA + 9,09 R ² = 0,994 Từ ngày 6 đến ngày 12	TVB = 2,41TMA + 8,30 R ² = 0,979 Từ ngày 7 đến ngày 14
Hạn sử dụng và phương trình hồi quy tuyến tính giữa QI và ngày bảo quản			
HSD: 8 ngày y = 1,74x + 0,3778 R ² = 0,9928	HSD: 12 ngày y = 1,03x - 1,2198 R ² = 0,9876	HSD: 10 ngày y = 1,19x - 0,2446 R ² = 0,9973	HSD: 12 ngày y = 0,90x - 0,5181 R ² = 0,996

Kết luận

Sự biến đổi chất lượng tôm sú sau thu hoạch được xử lý bằng các kỹ thuật bảo quản khác nhau đã được tiến hành trong nghiên cứu này. Các yếu tố cảm quan, hóa sinh và vi sinh được sử dụng trong nghiên cứu đã chứng minh được hiệu quả của chúng. Các chỉ số chất lượng sử dụng vào tiến trình đánh giá đã phát huy năng lực, phản ánh sự biến đổi chất lượng trong suốt quá trình bảo quản. Các chỉ số chất lượng hóa học TVB-N, TMA-N có tương quan tuyến tính với thời gian bảo quản theo hai giai đoạn khác nhau, tương ứng với giai đoạn tự phân và phân hủy. Tại thời điểm được đánh giá là hạn sử dụng TVB-N = 26,17; 27,49; 28,05 và 27,19 mg/100g tương ứng với các mẫu ĐC, CK, PP và PP/CK. Tương tự, giá trị TMA-N tại thời điểm này là 7,36; 7,24; 7,19; 7,02 tương ứng cho các mẫu khảo sát. Phương trình hồi quy tuyến tính giữa TVB-N và TMA-N đã được xây dựng cho từng mẫu khảo sát theo hai giai đoạn khác nhau. Đây là điểm mới của nghiên cứu. Đặc biệt, phương pháp QIM thể hiện hiệu quả trong đánh giá cảm quan. Giá trị QI có thể cho chúng ta ước tính hạn sử dụng còn lại của tôm. Giá trị QI tại thời điểm giới hạn có sự khác biệt giữa các mẫu. Cụ thể QI = 14,33; 11,37; 11,58; 10,40 tương ứng với các mẫu ĐC, CK, PP, PP/CK. Tôm được bảo quản trong điều kiện chân không kết hợp với xử lý qua dung dịch polyphenol có khả năng ức chế tiến trình tạo đốm đen, tăng giá trị về mặt cảm quan, và tăng giá trị kinh tế. Kỹ thuật bảo quản chân không có hạn sử dụng 12 ngày so với bảo quản thông thường là 8 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.A. Ashie, J.P. Smith, B.K. Simpson, N.F. Haard (1996), "Spoilage and shelflife extension of fresh fish and shellfish", *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **36**(1-2), pp.87-121.
- [2] V.K. Reddy, P.A. Shinde, F.R. Sofi, P.S. Shelar, & S.B. Patange (2014), "Effect of antimelanotic treatment and vacuum packaging on melanosis and quality condition of ice stored farmed tiger shrimp (penaeus monodon)", *SAARC Journal of Agriculture*, **11**(2), pp.33-47.
- [3] C.O.R. Okpala, W.S. Choo, and G.A. Dykes (2014), "Quality and shelf life assessment of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) freshly harvested and stored on ice", *LWT-Food Science and Technology*, **55**(1), pp.110-116.
- [4] R.K. Kallela, Y.L. Han, J.E. Toler, F. Chen, H.J. Kim, & P.L. Dawson (2013), "Shelf life extension of shrimp (white) using modified atmosphere packaging", *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **63**(2), pp.87-94.
- [5] G.W. Gould (2012), *New methods of food preservation*, Springer Science & Business Media.
- [6] H.H. Huss (1995), *Quality and quality changes in fresh fish*, FAO fisheries technical paper.
- [7] P. Howgate (2010), "A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 2. Formation of the bases, and application in quality assurance", *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, **9**(1), pp.58-83.
- [8] G. Hyldig & D.M. Green-Petersen (2004), "Quality Index Method-An objective tool for determination of sensory quality", *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **13**(4), pp.71-80.
- [9] E. Martinsdóttir, R. Schelvis, G. Hyldig, & K. Sveinsdóttir (2009), "Sensory evaluation of seafood: methods. Fishery Products-Quality, Safety and Authenticity", *Wiley-Blackwell*, pp.425-443.
- [10] R.S. Singhal, P. Kulkarni & D. Reg (1997), *Handbook of indices of food quality and authenticity*, Elsevier.
- [11] D.F. Maffei, N.F. de Arruda Silveira, & M.d.P.L.M. Catanozi (2013) "Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil", *Food Control*, **29**(1), pp.226-230.
- [12] R.P. Naik, B.B. Nayak, M.K. Chouksey, T.K. Anupama, T.L.S.S. Moses, & V. Kumar (2014), "Microbiological and biochemical changes during ice storage of farmed black tiger shrimp (Penaeus monodon)", *Bionano Frontier*, **7**(2), pp.249-253.
- [13] TCVN 3726-89: Tôm nguyên liệu tươi - Fresh shrimps for food processing.
- [14] A.A. Gonçalves and A.R.M. de Oliveira (2016), "Melanosis in crustaceans: A review", *LWT-Food Science and Technology*, **65**, pp.791-799.
- [15] R. Kossah, C. Nsabimana, H. Zhang, & W. Chen (2010), "Optimization of extraction of polyphenols from Syrian Sumac", *Research Journal of Phytochemistry*, **4**(3), pp.146-153.
- [16] K.L. Sallam (2007), "Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids", *Food Chemistry*, **101**(2), pp.592-600.
- [17] M.J. Leboffe, B.E. Pierce (2012), *Microbiology: laboratory theory and application*, Morton Publishing Company.
- [18] N.T. Le, N.K. Doan, B.T. Nguyen, T.V.T. Tran (2017), "Towards improved quality benchmarking and shelf life evaluation of black tiger shrimp (Penaeus monodon)", *Food Chemistry*, **235**, pp.220-226.
- [19] B. Jinadasa (2014), "Determination of quality of marine fishes based on total volatile base nitrogen test (TVB-N)", *Nature and Science*, **5**(12), pp.106-111.
- [20] J. Hungerford (1998), "AOAC Official Method 971.14 Trimethylamine Nitrogen in Seafood Colorimetric Method. Fish and Other Marine Products", *Official Methods of Analysis of AOAC International*, **7**, pp.421-434.
- [21] ISO 14502:2005: Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea.

Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.

[22] G.J.E. Nychas, D.L.Marshall, J.N. Sofos (2007), *Meat, poultry, and seafood*, ASM Press, pp.105-140.

[23] A.C. Rohani, M. Faridah, O.A. Shokri (2008), "The effects of modified atmosphere packaging on chemical, sensory and microbiological changes in black tiger prawn (*Penaeus monodon*)", *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.*, **36**(2), pp.211-219.

[24] N.P. Nirmal, & S. Benjakul (2009), "Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage", *Food Chemistry*, **116**(1), pp.323-331.

[25] V.T. Pardio, K.N. Waliszewski, & P. Zuñiga (2011), "Biochemical, microbiological and sensory changes in shrimp (*Panaeus aztecus*) dipped in different solutions using face centred central composite design", *International Journal of Food Science & Technology*, **46**(2), pp.305-314.

[26] J. Huang, Q. Chen, M. Qiu, & S. Li (2012), "Chitosan based edible coatings for quality preservation of postharvest whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)", *Journal of Food Science*, **77**(4), pp.C491-C496.

[27] H. Mu, H. Chen, X. Fang, J. Mao, H. Gao (2012), "Effect of cinnamaldehyde on melanosis and spoilage of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during storage", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **92**(10), pp.2177-2182.

[28] R. Rosa, L. Nunes (2004), "Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus)", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**(1), pp.89-94.

[29] L. Srikar, H. Seshadari, A. Fazal (1989), "Changes in lipids and proteins of marine catfish (*Tachysurus dussumieri*) during frozen storage", *International Journal of Food Science & Technology*, **24**(6), pp.653-658.

[30] L.M. Nollet, F. Toldrá (2009), *Handbook of seafood and seafood products analysis*, CRC Press.

[31] B.Q. Phillippy (1985), *Characterization of the in situ tmaoase system of red hake muscle*, Ph.D. thesis, University of Massachusetts, Amherst.

[32] A.D. Bonnell (2012), *Quality assurance in seafood processing: a practical guide*, Springer Science & Business Media.

Đánh giá khả năng chịu hạn và một số chỉ tiêu sinh hóa của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* trong điều kiện hạn nhân tạo ở giai đoạn cây con

Đoàn Thị Bích Thảo¹, Nguyễn Xuân Thắng^{1*}, Lê Tuấn Anh¹, Lê Công Tùng¹, Nguyễn Thị Thu Hoài¹,
Lê Công Lực¹, Nông Văn Hải², Bùi Mạnh Cường¹

¹Viện Nghiên cứu ngô, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

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

Ngày nhận bài 12/2/2019; ngày chuyển phản biện 18/2/2019; ngày nhận phản biện 20/3/2019; ngày chấp nhận đăng 8/4/2019

Tóm tắt:

Nhóm yếu tố phiên mã DREB (Dehydration Responsive Element Binding) liên quan chặt chẽ đến cơ chế phản ứng của thực vật đối với điều kiện bất thuận như hạn. Trong nghiên cứu này, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* đã được đánh giá khả năng chịu hạn và một số chỉ tiêu sinh hóa ở giai đoạn cây con. Trong điều kiện gây hạn nhân tạo, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* có tỷ lệ sống cao hơn khoảng 2,5 lần so với dòng nền không chuyển gen. Hình thái của dòng mang gen *ZmDREB2A* có biểu hiện chịu hạn tốt hơn so với dòng nền, trong đó chiều dài rễ của dòng chuyển gen lớn hơn 21-28% so với dòng nền. Khi gặp hạn, dòng chuyển gen *ZmDREB2A* cũng duy trì được hàm lượng chlorophyll (Chl) cao hơn 10% so với các dòng nền, đồng thời tích lũy được lượng chất điều hòa thẩm thấu như proline tăng 2,5-4,5 lần, carbohydrate không cấu trúc (Non Structural Carbohydrate - NSC) nhiều hơn 28-35% so với dòng nền.

Từ khóa: cây ngô, chịu hạn, chuyển gen, proline, *ZmDREB2A*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Thực vật luôn phải đối mặt với nhiều yếu tố bất thuận có trong điều kiện môi trường như hạn, mặn, nóng... Các yếu tố bất thuận đã ảnh hưởng tới khoảng 10% diện tích đất trồng và dẫn tới sự sụt giảm hơn 50% sản lượng trung bình của các cây trồng chính trên thế giới, trong đó có cây ngô [1]. Tình hình hạn hán đã, đang và sẽ tiếp tục diễn ra nghiêm trọng, khiến cho việc nghiên cứu nâng cao khả năng chịu hạn của cây trồng nói chung và cây ngô nói riêng ngày càng cấp thiết.

Cơ chế đáp ứng với yếu tố bất thuận của thực vật liên quan đến nhóm gen mã hóa các yếu tố phiên mã. Trong đó, DREB là một nhóm yếu tố phiên mã quan trọng, đóng vai trò chủ đạo trong đáp ứng với nhiều yếu tố bất thuận khác nhau. Thông qua yếu tố DREB có tác động *cis* và vùng bám ADN AP2/ERF, yếu tố phiên mã DREB giúp tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng đối với điều kiện hạn, mặn, nóng [2].

Gen *ZmDREB2A* mã hóa cho nhân tố phiên mã nhóm DREB ở cây ngô được tăng cường biểu hiện khi cây ngô gặp điều kiện hạn, mặn, nóng và lạnh. Nghiên cứu chuyển gen *ZmDREB2A* vào cây mô hình *Arabidopsis thaliana* cho thấy, gen này đóng vai trò điều hòa biểu hiện của các gen liên quan đến cả điều kiện hạn và nóng, làm tăng cường biểu hiện các gen mã hóa protein LEA, các gen liên quan đến sốc

nhiệt và giải độc tế bào [3]. Chuyển gen thuộc nhóm DREB cũng giúp tăng khả năng chống chịu điều kiện bất thuận ở các cây trồng khác như thuốc lá [4], lúa [5] và lúa mì [6].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng chịu hạn và một số chỉ tiêu sinh hóa của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* ở giai đoạn cây con. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để sàng lọc và lựa chọn nguồn vật liệu phục vụ cho công tác chọn tạo giống ngô lai có khả năng chịu hạn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền tương ứng (bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các dòng ngô tham gia thí nghiệm.

TT	Tên dòng	Ghi chú
1	K3	Dòng nền không chuyển gen
2	K3-CG	Dòng chuyển gen <i>ZmDREB2A</i>
3	K7	Dòng nền không chuyển gen
4	K7-CG	Dòng chuyển gen <i>ZmDREB2A</i>

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

Evaluation of biochemical parameters and drought resistance in *ZmDREB2A* transgenic maize at the seedling stage

Thi Bích Thao Doan¹, Xuan Thang Nguyen^{1*},
Tuan Anh Le¹, Cong Tung Le¹, Thi Thu Hoai Nguyen¹,
Cong Luc Le¹, Van Hai Nong², Manh Cuong Bui¹

¹National Maize Research Institute

²Institute of Genome Research

Received 12 February 2019; accepted 8 April 2019

Abstract:

DREB transcription factor group is related to responses of plants to abiotic stresses including drought. In this study, the *ZmDREB2A* transgenic maize lines at the seedling stage were evaluated for drought resistance and biochemical characteristics. The survival rate of *ZmDREB2A* lines were 2.5 times higher than wildtype plants in artificial drought tests. Morphological characteristics also showed the root length of *ZmDREB2A* lines were 21-28% higher than that of control groups, which indicates *ZmDREB2A* lines could suffer drought better. Moreover, the chlorophyll concentration of *ZmDREB2A* lines was 10% higher than the wildtype in drought condition. Other parameters such as proline and nonstructural carbohydrate accumulation of the transgenic lines were higher as compared to control groups.

Keywords: drought resistance, maize, proline, transgenic, *ZmDREB2A*.

Classification number: 4.6

Phương pháp nghiên cứu

Gây hạn nhân tạo ở giai đoạn cây con: thí nghiệm gây hạn nhân tạo được tiến hành ở giai đoạn cây con trong nhà lưới theo phương pháp của Camacho và Caraballo (1994) [7]. Hạt ngô được gieo trong xô chứa giá thể xỉ than và đất đã tưới nước bão hòa. Tia bỏ các cây không đồng đều, giữ lại 6 cây/xô, 3 cây bên trái là dòng ngô không mang gen *ZmDREB2A* (dòng nền), 3 cây bên phải dòng ngô mang gen *ZmDREB2A*. Tiến hành không tưới nước liên tục 15 ngày khi cây có 5-7 lá nhằm gây hạn, đánh giá biểu hiện cây trong điều kiện hạn. Sau đó tưới nước trở lại trong 7 ngày và đánh

giá tỷ lệ cây sống, khả năng hồi phục sau hạn.

Xác định hàm lượng Chl: hàm lượng Chl được xác định theo phương pháp của Porra (2006) [8]. Mô lá (10 mg) được đưa vào ống eppendorf. Bổ sung 20 µl acetone 80%, nghiền bằng chày nhựa, sau đó thêm acetone 80% để đạt thể tích 1,5 ml. Ly tâm ở 2.000 vòng/phút trong 1 phút, thu 1 ml dịch nổi. Đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 646 và 664 nm. Hàm lượng Chl được tính theo công thức:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/mg}) = [12,7 \times (A_{664}) - 2,69 \times (A_{646})] \times \text{hệ số pha loãng}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/mg}) = [22,9 \times (A_{646}) - 4,68 \times (A_{664})] \times \text{hệ số pha loãng}$$

Xác định hàm lượng proline: hàm lượng proline được xác định bằng phương pháp so màu [9]. Mô lá (50 mg) được nghiền trong nitor lỏng, bỏ vào ống eppendorf 2 ml. Bổ sung 1,5 ml acid sulfosalicylic 3% (w/v), lắc đều, sau đó ly tâm ở 7.000 vòng/phút trong 20 phút. Thu 300 µl dịch nổi, bổ sung 600 µl axit sulfosalicylic 3%.

Thực hiện phản ứng màu bằng cách lấy 200 µl dịch trong cho vào ống eppendorf, bổ sung 200 µl axit axetic và 200 µl dung dịch ninhydrin (0,1 g ninhydrin + 2,4 ml axit axetic + 1,6 ml acid phosphoric 6M), ủ phản ứng ở 100°C trong 1 giờ, sau đó dừng phản ứng. Bổ sung 400 µl toluence vào hỗn hợp phản ứng, lắc đều, thu 200 µl dịch nổi. Tiếp tục bổ sung 800 µl toluence và đo quang phổ ở bước sóng 520 nm. Xây dựng đường chuẩn để tính hàm lượng proline.

Xác định hàm lượng NSC: hàm lượng NSC được xác định theo phương pháp của Ohnishi và Horie (1999) [10]. Mẫu lá (0,5 g) được nghiền nhỏ, cho vào ống falcon 50 ml, thêm 30 ml nước cất rồi đun ở 100°C trong 60 phút. Sau khi ống nguội, bổ sung 20 ml Sodium phosphate-phosphoric acid buffer (pH 7,4). Lắc ở 200 vòng/phút, nhiệt độ 40°C trong 24h. Lọc mẫu bằng giấy lọc rồi làm khô phần cặn thu được ở 135°C trong 4h. Cân lượng mẫu còn lại và tính hàm lượng NSC theo công thức:

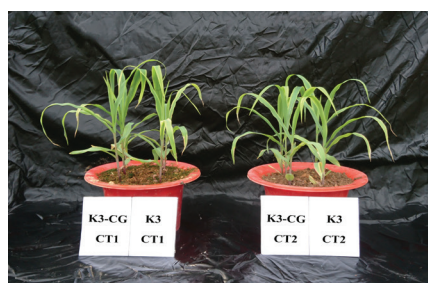
$$\text{NSC } (\%) = (\text{Khối lượng mẫu}/\text{Khối lượng mẫu sau sấy})/\text{Khối lượng mẫu} \times 100$$

Xử lý số liệu: số liệu được xử lý bằng chương trình IRRISTAT 5.0 và Microsoft Excel 2013.

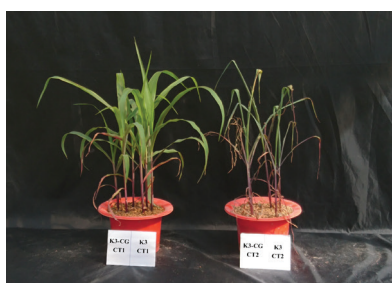
Kết quả và thảo luận

Hình thái và khả năng phục hồi của các dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* trong điều kiện hạn

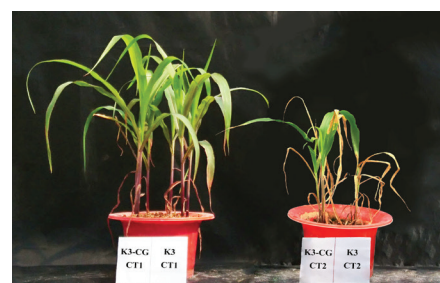
Giai đoạn trước khi xử lý hạn nhân tạo, các dòng ngô đều phát triển bình thường (hình 1A và 2A). Đến giai đoạn gây hạn, các dòng ngô thí nghiệm có biểu hiện cuộn lá ở mức độ khác nhau, sinh trưởng chậm lại so với đối chứng được tưới nước đầy đủ (hình 1B và 2B). Sau 15 ngày gây hạn, cây ngô bị hạn xuất hiện lá chết khô ở tầng lá dưới và đỉnh lá.



A: chưa xử lý hạn



B: đã xử lý hạn



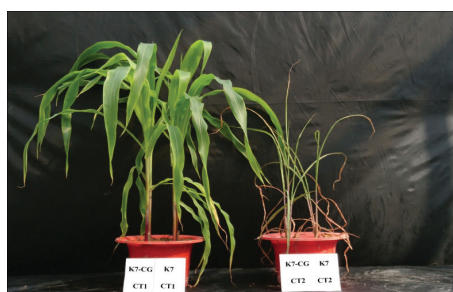
C: sau khi phục hồi

Hình 1. Hình thái các dòng ngô K3 chuyển gen và dòng nền trong giai đoạn gây hạn.

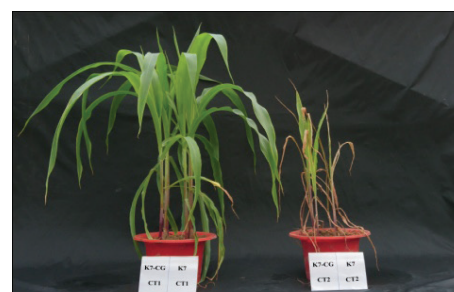
Ghi chú: 3 cây bên trái: dòng chuyển gen; 3 cây bên phải: dòng nền; công thức 1: tưới nước đầy đủ (CT1); công thức 2: gây hạn và phục hồi (CT2); K3: dòng nền; K3-CG: dòng K3 mang gen *ZmDREB2A*.



A: chưa xử lý hạn



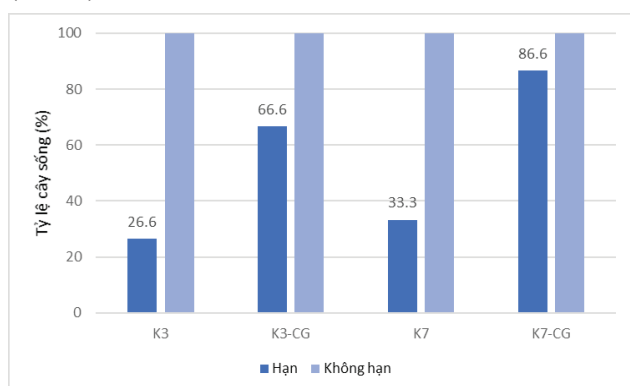
B: đã xử lý hạn



C: sau khi phục hồi

Hình 2. Hình thái các dòng ngô K7 chuyển gen và dòng nền trong giai đoạn gây hạn.

Kết thúc giai đoạn gây hạn và tưới nước trở lại, dòng ngô K3-CG và K7-CG mang gen *ZmDREB2A* có biểu hiện phục hồi sinh trưởng nhanh hơn dòng nền, thể hiện qua hình thái và tỷ lệ cây sống cao hơn (hình 1C và 2C). Tỷ lệ sống của cây K3-CG có gen *ZmDREB2A* (66,6%) cao gấp 2,5 lần so với dòng nền K3 (26,6%). Các cây K7-CG mang gen *ZmDREB2A* có tỷ lệ sống cao hơn 2,6 lần so với dòng nền (hình 3).



Hình 3. Tỷ lệ cây sống của các dòng ngô K3, K7 - mang gen *ZmDREB2A* và các dòng nền tương ứng sau khi kết thúc giai đoạn hạn và được tưới phục hồi.

Đặc điểm thân lá và rễ của các dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* trong điều kiện hạn

Trong điều kiện tưới nước đủ, các cây ngô cùng nguồn sinh trưởng, phát triển đồng đều về thân lá và rễ, không có

khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa dòng K3 và K3-CG hoặc giữa dòng K7 và K7-CG. Ở điều kiện hạn nhân tạo, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* có chiều dài, khối lượng của thân lá và rễ, thể tích rễ cao hơn so với dòng nền (bảng 2). Trong đó, khả năng phát triển bộ rễ trong điều kiện hạn là một đặc điểm quan trọng giúp thực vật chống chịu stress hạn. Do đó, đây là một tiêu chí quan trọng trong chọn giống chịu hạn. Ở điều kiện hạn, chiều dài rễ của dòng K3-CG giảm 11,21% so với không gây hạn, còn dòng nền (K3) giảm đến 30,69%. Tương tự, dòng K7-CG gặp hạn có chiều dài rễ giảm 9,92% so với không gây hạn. Dòng nền tương ứng (K7) có tỷ lệ giảm chiều dài rễ lên tới 25,74%. Qua kết

Bảng 2. Đặc điểm thân lá và rễ tươi của các dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* và dòng nền trong điều kiện hạn nhân tạo.

Dòng	Chiều dài thân lá (cm)		Chiều dài rễ (cm)		Khối lượng thân tươi (g)		Khối lượng rễ tươi (g)		Thể tích rễ (ml)	
	Hạn	Không hạn	Hạn	Không hạn	Hạn	Không hạn	Hạn	Không hạn	Hạn	Không hạn
	Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)		Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)		Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)		Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)		Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)	
K3	51,7	72,8	28,98	16,08	23,20	30,69	3,97	11,87	66,55	0,32
K3-CG	53,5	71,5	25,17	20,60	23,20	11,21	3,84	10,76	64,31	0,84
K7	56,7	77,8	27,12	19,50	26,26	25,74	3,06	11,97	74,44	0,34
K7-CG	60,2	76,8	21,61	23,60	26,20	9,92	4,16	10,96	62,04	0,89
CV%	4,2		5,7		2,8		2,2		0,9	
LSD _{0,05}	1,99		0,92		0,168		0,02		0,013	

qua ở bảng 2 cho thấy, ở tất cả các chỉ tiêu đánh giá (chiều dài thân lá, chiều dài rễ, khối lượng rễ tươi, thể tích rễ tươi) của các dòng nền có tỷ lệ giữa gây hạn và không gây hạn cao hơn ở dòng chuyển gen tương ứng, điều đó chứng tỏ các dòng chuyển gen có khả năng sinh trưởng và phát triển hơn các dòng nền trong điều kiện hạn.

Đánh giá các đặc điểm hình thái giữa hai dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* cho thấy, dòng K7-CG có khả năng sinh trưởng, phát triển và chịu hạn cao hơn dòng K3-CG. Ở điều kiện hạn, dòng K7-CG có chiều dài rễ lớn nhất trong các dòng ngô thí nghiệm (23,6 cm), cao hơn 14,5% so với dòng K3-CG. Bên cạnh đó, chiều dài thân lá của dòng K7-CG (60,2 cm) lớn hơn 12,5% so với chiều dài thân lá của dòng K3-CG (53,5 cm).

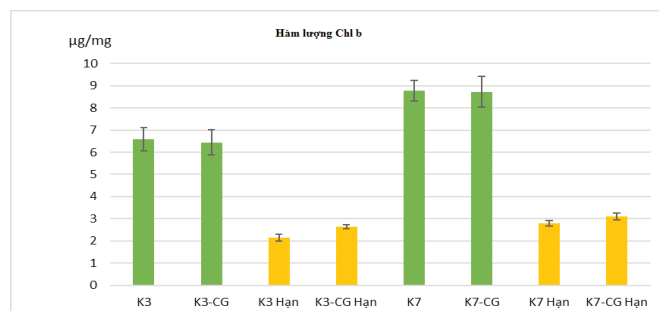
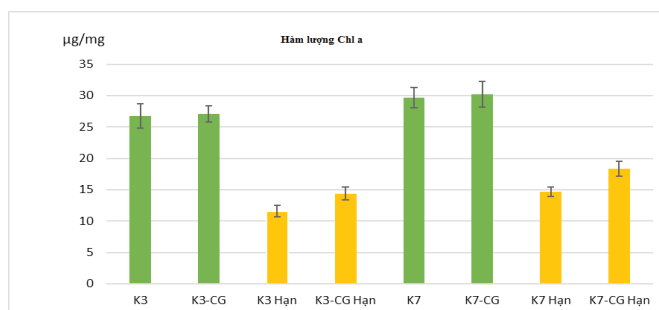
Khả năng tích lũy sinh khối của các cây chuyển gen *ZmDREB2A* cao hơn so với cây không chuyển gen, thể hiện qua khối lượng thân lá và rễ khô (bảng 3). Ở điều kiện hạn nhân tạo, dòng K3-CG và K7-CG có tổng sinh khối khô cao hơn so với dòng nền tương ứng 2,48 và 2,2 lần. Các dòng ngô nền K3, K7 có tỷ lệ giảm mạnh về khối lượng thân khô (87,15-89,5%), rễ khô (83,33-76,27%), trong khi các dòng chuyển gen tương ứng tỷ lệ này thấp hơn rõ rệt.

Bảng 3. Khối lượng thân, rễ khô, tổng sinh khối khô của các dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* và dòng nền trong điều kiện hạn nhân tạo.

Dòng	Khối lượng thân khô (g)			Khối lượng rễ khô (g)			Tổng sinh khối khô (g)		
	Hạn	Không hạn	Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)	Hạn	Không hạn	Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)	Hạn	Không hạn	Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)
K3	0,59	5,62	89,50	0,09	0,54	83,33	0,68	6,16	88,96
K3-CG	1,53	5,63	72,82	0,16	0,55	70,91	1,69	6,18	72,65
K7	0,74	5,76	87,15	0,14	0,59	76,27	0,88	6,35	86,14
K7-CG	1,72	5,77	70,19	0,22	0,6	63,33	1,94	6,37	69,54
CV%	0,8			4,7			1		
LSD _{0,05}	0,019			0,012			0,028		

Đánh giá một số chỉ tiêu sinh hóa của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* trong điều kiện hạn nhân tạo

Hàm lượng Chl của các dòng ngô trong điều kiện hạn giảm mạnh so với điều kiện bình thường (hình 4). Khi tưới đủ nước, hàm lượng Chl a không có khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa cây chuyển gen *ZmDREB2A* và cây không chuyển gen. Hàm lượng Chl a ở các dòng ngô nằm trong khoảng 27-30 µg/mg ở điều kiện bình thường. Trường hợp gặp stress hạn, hàm lượng Chl a ở dòng K3, K3-CG đạt lần lượt 11,6 và 14,4 µg/mg, tương ứng với mức giảm 58 và 48% so với điều kiện không hạn. Dòng K7, K7-CG có hàm lượng Chl a là 14,6 và 18,3 µg/mg, tương ứng giảm 51 và 40% so với điều kiện tưới đầy đủ.



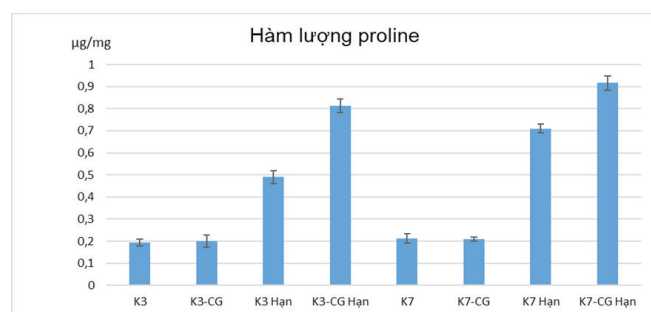
Hình 4. Hàm lượng Chl a và b của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền.

Với vai trò là nhóm sắc tố phụ, hàm lượng Chl b thấp hơn so với Chl a. Hàm lượng Chl b ở các dòng chuyển gen và dòng nền tương đương nhau khi được tưới đầy đủ. Dưới điều kiện hạn, hàm lượng Chl b ở mẫu K3 và K3-CG giảm xuống còn 2,1 và 2,6 µg/mg, trong khi ở K7 và K7-CG là 2,78 và 3,09 µg/mg.

Tác động của hạn làm giảm mạnh hàm lượng Chl không chỉ ở ngô mà còn ở nhiều loài cây khác nhau [11, 12]. Tuy nhiên, các cây chuyển gen *ZmDREB2A* (K3-CG, K7-CG) duy trì được hàm lượng Chl a và b cao hơn so với cây không chuyển gen khoảng 10%.

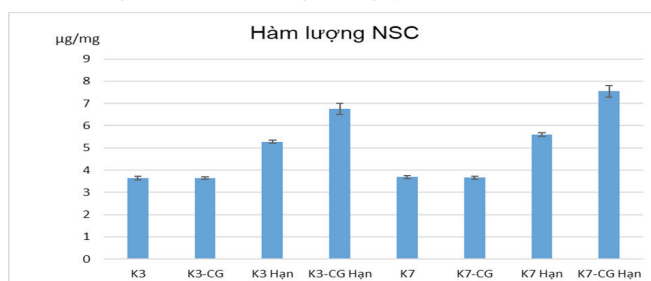
Một trong những cơ chế liên quan đến khả năng chịu hạn của cây trồng là sự tích lũy các chất hòa tan như proline. Proline là axit amin giúp điều hòa áp suất thẩm thấu tế bào, được tăng cường tích lũy khi thực vật gặp điều kiện bất thuận như hạn [13].

Hàm lượng proline tự do ở dòng ngô đạt mức 2 µg/mg trong điều kiện bình thường và tăng mạnh trong điều kiện hạn (hình 5). Dưới tác động của hạn, hàm lượng proline tự do trong dòng ngô K3, K3-CG tăng lần lượt 2,5 lần và 4 lần so với điều kiện bình thường, đạt mức 0,49 và 0,81 µg/mg. Dòng K7 và K7-CG gặp hạn có hàm lượng proline là 0,71 và 0,92 µg/mg, tương ứng gấp 3,55 và 4,5 lần so với điều kiện không hạn. Sự gia tăng hàm lượng proline tự do là một đáp ứng với điều kiện hạn xảy ra ở cả cây chuyển gen và không chuyển gen. So sánh giữa các dòng thí nghiệm, các dòng chuyển gen *ZmDREB2A* tổng hợp lượng proline tự do nhiều hơn so với dòng nền.



Hình 5. Hàm lượng proline của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền.

Kết quả trên tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới về hạn ở cây ngô. Jain và cs (2010) [14] đã sử dụng sorbitol để gây hạn nhân tạo *in vitro*, cho thấy tương quan tuyến tính giữa nồng độ sorbitol trong môi trường và hàm lượng proline ở lá ngô. Nghiên cứu của Efeoğlu và cs (2009) [15] trên 3 giống ngô Doge, Luce, Vero cũng cho thấy, hàm lượng proline tăng lên đáng kể khi gây hạn nhân tạo bằng cách không tưới nước trong 12 ngày.



Hình 6. Hàm lượng NSC của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền.

Bên cạnh proline, hàm lượng các dạng NSC cũng thường gia tăng khi thực vật gặp stress hạn, với vai trò điều hòa áp suất thẩm thấu. Ở điều kiện tưới nước đầy đủ, hàm lượng NSC ở dòng chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền tương đương nhau. Khi gặp hạn, dòng K3-CG có hàm lượng NSC lần lượt đạt 6,76 µg/mg, cao hơn 28% so với dòng K3 (5,27 µg/mg). Hàm lượng NSC trong điều kiện hạn ở dòng K7-CG là 7,55 µg/mg, cao hơn 35% so với dòng K7 (5,6 µg/mg) (hình 6).

Như vậy, khi gặp stress hạn, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* (K3-CG, K7-CG) có hàm lượng Chl, proline và NSC cao hơn dòng nền (K3, K7). Giữa hai dòng chuyển gen, các chỉ số này ở dòng K7-CG cao hơn so với dòng K3-CG. Kết quả phân tích sinh hóa phù hợp với những đánh giá về đặc điểm hình thái của các dòng ngô tham gia thí nghiệm.

Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá được khả năng chịu hạn của dòng ngô K3-CG, K7-CG mang gen *ZmDREB2A* cùng dòng nền tương ứng (K3, K7) ở giai đoạn cây con. Kết quả cho thấy, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* có tỷ lệ sống cao hơn khoảng 2,5 lần so với dòng nền. Các đặc điểm

hình thái và sinh hóa liên quan đến khả năng chịu hạn ở dòng chuyển gen (K3-CG, K7-CG) biểu hiện tốt hơn dòng nền (K3, K7). Do đó, đây là những nguồn vật liệu tiềm năng cho công tác chọn tạo giống ngô chịu hạn.

Đề nghị tiếp tục đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* ở các giai đoạn sinh trưởng khác (trước và sau trổ).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E.A. Bray, J. Bailey-Serres, E. Weretilnyk (2000), *Responses to abiotic stresses*, in *Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of Plant Biologists.
- [2] C. Lata, M. Prasad (2011), "Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants", *Journal of Experimental Botany*, **62**(14), pp.4731-4748.
- [3] F. Qin, et al. (2007), "Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L.", *The Plant Journal*, **50**(1), pp.54-69.
- [4] M. Kasuga, et al. (2004), "A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer", *Plant and Cell Physiology*, **45**(3), pp.346-350.
- [5] S.J. Oh, et al. (2005), "Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth", *Plant Physiology*, **138**(1), pp.341-351.
- [6] Y.G. Shen, et al. (2003), "An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress", *Theoretical and Applied Genetics*, **106**(5), pp.923-930.
- [7] R.G. Camacho, D.F. Caraballo (1994), "Evaluation of morphological characteristics in Venezuelan maize (*Zea mays* L.) genotypes under drought stress", *Scientia Agricola*, **51**(3), pp.453-458.
- [8] R.J. Porra (2006), "Spectrometric assays for plant, algal and bacterial chlorophyll", *Advances in Photosynthesis and Respiration*, **25**, pp.95-107.
- [9] L. Bates, R. Waldren, I. Teare (1973), "Rapid determination of free proline for water-stress studies", *Plant and Soil*, **39**(1), pp.205-207.
- [10] M. Ohnishi, T. Horie (1999), "A proxy analysis on nonstructural carbohydrate in rice [*Oryza sativa*] plant by using the gravimetric method", *Japanese Journal of Crop Science* (Japan).
- [11] A. Mafakheri, et al. (2010), "Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars", *Australian Journal of Crop Science*, **4**(8), pp.580-585.
- [12] P. Manivannan, et al. (2007), "Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **59**(2), pp.141-149.
- [13] M.M.F. Mansour (2000), "Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress", *Biologia Plantarum*, **43**(4), pp.491-500.
- [14] M. Jain, S. Tiwary, R. Gadre (2010), "Sorbitol-induced changes in various growth and biochemical parameters in maize", *Plant Soil Environment*, **56**, pp.263-267.
- [15] B. Efeoğlu, et al. (2009), "Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery", *South African Journal of Botany*, **75**(1), pp.34-42.

Đặc điểm di truyền trình tự loài lan Hải hồng *Paphiopedilum delenatii* đặc hữu Việt Nam

Vũ Thị Huyền Trang^{1,2}, Trần Anh Khoa¹, Vũ Quốc Luận³, Lê Thị Lý², Phạm Công Hoạt⁴, Trần Hoàng Dũng^{1*}

¹Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Trường Đại học quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Viện Sinh học Tây Nguyên

⁴Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 19/12/2018; ngày chuyển phản biện 24/12/2018; ngày nhận phản biện 25/1/2019; ngày chấp nhận đăng 12/2/2019

Tóm tắt:

Lan Hải là những loài lan đẹp và quý nên hiện nay bị khai thác quá mức và mua bán trái phép ở Việt Nam. Trong đó, Lan Hải hồng là loài lan Hải đặc hữu Việt Nam cũng gặp tình trạng tương tự. Việc ứng dụng mã vạch ADN để nhận diện các loài lan Hải thương mại, giúp hạn chế mua bán trái phép do định danh sai là điều cần thiết. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu đặc điểm di truyền trình tự một số vùng ADN chỉ thị của loài lan Hải hồng, cung cấp trình tự ADN giúp nhận diện chính xác và bảo tồn loài lan quý này. Nghiên cứu đã thu được 3 mẫu lan Hải hồng đặc hữu và giải trình tự, phân tích đặc điểm di truyền cho 6 vùng trình tự gồm rpoB, rpoC1, trnH-psbA, ITS, matK và trnL, cho thấy tính thống nhất về mặt di truyền của loài.

Từ khóa: ITS, lan Hải hồng, matK, rpoB, rpoC1, trnH-psbA, trnL.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Lan Hải trên thế giới và ở Việt Nam là loài thực vật cảnh được yêu thích. Với vẻ đẹp tự nhiên cũng như những nét đặc biệt của nó nên lan Hải bị săn lùng và buôn bán rất nhiều, dẫn đến nguy cơ đe dọa tuyệt chủng. Việt Nam là một nước có số lượng loài lan Hải đứng hàng đầu thế giới. Nhưng theo thống kê của IUCN cho thấy, với 24 loài lan Hải Việt Nam thì có đến 23 loài nằm trong danh sách đe dọa tuyệt chủng. Tình trạng thu hái cũng như buôn lậu không thể kiểm soát đã dẫn đến việc ngày càng nhiều loài lan Hải bị tận diệt hơn. Việc nhận diện và kiểm soát kịp thời sẽ giúp hạn chế việc thu hái cũng như buôn bán trái phép, làm giảm nguy cơ tuyệt chủng. Phương pháp nhận diện loài bằng kỹ thuật phân tử có thể nói là hữu hiệu nhất. Bằng việc sử dụng một lượng mẫu rất nhỏ từ các bộ phận của cây như rễ, thân, lá, phương pháp nhận diện phân tử cho ta kết quả với độ chính xác cao, giúp nhanh chóng cũng như chính xác trong việc nhận dạng loài lan Hải để kịp thời ngăn chặn nạn buôn bán trái phép và góp phần bảo tồn loài này.

Năm 2009, Yao và cs đã nghiên cứu trình tự mã vạch để phân định loài lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) nhờ trình tự mã hóa ADN trên vùng gen lục lạp trnH - psbA của 17 loài *Dendrobium*. Kết quả cho thấy, vùng gene trnH-psbA có thể sử dụng như một mã vạch để phân biệt *Dendrobium* với những loài khác [1].

Năm 2012, Parveen và cs nghiên cứu xây dựng hệ thống ADN barcode cho các loài lan Hải Ấn Độ có nguy cơ tuyệt chủng dựa

vào 5 vùng gen rpoB, rpoC1, rbcL, matK và ITS. Kết quả nghiên cứu cho thấy, matK là vùng phân định loài tốt nhất (đạt 100%), vùng trình tự gen matK còn có thể xác định chính xác bố mẹ của các giống lai giữa các loài, còn vùng ITS phân định loài là 50% [2].

Năm 2012, Guo và cs đã nghiên cứu sự tiến hóa và phân bố địa lý sinh vật của lan Hải. Kết quả cho thấy đã giải quyết tốt các nhánh đơn ngành (Monophyletic branch) cho tất cả các loài trong nghiên cứu dựa vào trình tự phân tích 6 hệ gen lục lạp: matK, rbcL, ycf1, ycf2, rpoC1, rpoC2 và 2 hệ gene nhân: ACO, LFY [3].

Năm 2013, Kim và cs đã nghiên cứu về việc xác định phân tử của các loài lan Hải (*Cypripedium*, *Orchidaceae*) của Hàn Quốc có nguy cơ bị tuyệt chủng và liên quan đến đơn vị phân loại (taxa). Trong nghiên cứu này, tác giả đã sử dụng 2 vùng của hệ gen lục lạp rpoC2 và vùng giữa gen atpH-aptF để tạo ra hệ thống nhận dạng phân tử đối với một số loài trong chi *Cypripedium* [4].

Năm 2015, Ying và cs đã xây dựng thành công cây phát sinh loài và nhận diện các loài lan châu Á bằng 6 trình tự gồm vùng nhân (nrITS, low-copy Xdh) và vùng lục lạp (matK, psbA-trnH, trnL-F, trnS-trnG) [5].

Trong nước, năm 2009, Phan Kế Long và cs đã nhận diện một số loài lan Hải đặc hữu của Việt Nam và đã nghiên cứu mối liên hệ với các loài lan trên thế giới dựa trên vùng ITS để bảo tồn bền vững các loài lan có nguy cơ tuyệt chủng. Kết quả phân tích cho thấy, vùng ITS-rDNA của 5 loài lan Hải Việt Nam dao động 659-

*Tác giả liên hệ: Email: tranhoangdung1975@gmail.com

Genetic characteristics of the endemic orchid species *Paphiopedilum delenatii* in Vietnam

Thi Huyen Trang Vu^{1,2}, Anh Khoa Tran¹,
Quoc Luan Vu³, Thi Ly Le², Cong Hoat Pham⁴,
Hoang Dung Tran^{1*}

¹Nguyen Tat Thanh University

²International University, Vietnam National University Ho Chi Minh city

³Tay Nguyen Institute of Biology

⁴Ministry of Science and Technology

Received 19 December 2018; accepted 12 February 2019

Abstract:

Paphiopedilum delenatii is known as an endemic orchid species of Vietnam. The other species of *Paphiopedilum* genus are all valuable but in overexploitation. This study aimed to find out more about this species's genetic characteristics from some of sequence regions of its genome. Three samples of *Paphiopedilum delenatii* from the wild nature were collected for this study. The nucleotide characteristics of six regions *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *ITS*, *matK*, and *trnL* were sequenced and analysed, and the results exhibited the genetic uniformity of the species.

Keywords: *ITS*, *matK*, *Paphiopedilum delenatii*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *trnL*.

Classification number: 4.6

700 bp. Hai mẫu *Paphiopedilum villosum* lấy từ hai cây riêng biệt hoàn toàn không có sự khác nhau. Chiều dài ITS của các mẫu ở Việt Nam khá giống với trình tự đã được công bố trên Genbank [6].

Năm 2010, Nguyễn Thị Mỹ Duyên và cs đã nghiên cứu phá hệ các giống, loài lan (Orchidaceae) dựa trên phân tích các vùng trình tự ITS, kết quả cho thấy 5 loài lan Hải *Paphiopedilum delenatii*, *P. concolor*, *P. paishii*, *P. hirsutissimum*, *P. primulium* có quan hệ họ hàng xa về phân tích kiểu gen, mặc dù về hình thái chúng được xếp cùng một nhóm [7].

Khuất Hữu Trung và cs cũng đã sử dụng trình tự vùng ITS (gồm ITS1, 5.8 S, ITS2) để phân biệt 16 loài và 2 thứ dưới loài của chi *Paphiopedilum* Việt Nam. Nghiên cứu kết luận rằng, các vùng có độ biến thiên cao ở vùng ITS rất hữu ích cho việc phân tích phát sinh loài [8].

Như vậy có nhiều vùng trình tự được sử dụng trên các đối tượng khác nhau của hoa lan. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử

dụng 6 vùng trình tự *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *ITS*, *matK* và *trnL* để phân tích đặc điểm trình tự và nhận diện loài lan Hải hồng đặc hữu Việt Nam cũng như một số các loài lan Hải Việt Nam lân cận khác.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Thu thập, xử lý và bảo quản mẫu

Mẫu lá tươi thu tại cây ở Viện Sinh học Tây Nguyên, được đưa về phòng thí nghiệm, tiến hành rửa sạch bụi bẩn bám trên lá bằng nước sạch. Sau đó tiếp tục rửa lại mẫu bằng nước cất khử ion. Dùng bông gòn thấm cồn 70⁰ lau sạch cả hai bề mặt lá. Loại bỏ các mẫu bị hư hại, dập, nhũn, bệnh, đốm đen, khô héo hay dị dạng. Để khô mẫu, sau đó giữ trong túi zip ghi ký hiệu đánh dấu mẫu và bảo quản ở -20⁰C. Mẫu được định danh hình thái bởi các chuyên gia hình thái dựa vào cây có hoa.

Khuếch đại các vùng trình tự nhận diện lan Hải hồng

Một số vùng trình tự chúng tôi sử dụng các cặp mồi của các nghiên cứu trước để khuếch đại. Một số vùng trình tự chúng tôi tiến hành thiết kế các cặp mồi mới nhằm đạt hiệu quả khuếch đại cao hơn ở những vùng có độ biến thiên di truyền cao, phù hợp với mục đích nhận diện trình tự. Đối với các cặp mồi được thiết kế mới, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm trên một số đối tượng lan Hải rồi mới áp dụng rộng rãi cho nghiên cứu [9] (bảng 1).

Bảng 1. Các mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên vùng trình tự	Tên mồi dự kiến	Trình tự mồi	Trích dẫn
ITS (900 bp)	IT1-LH-F	AGTCGTAACAAGGTTTC	[10]
	IT2-LH-R	GTAAGTTTCTTCTCTCC	
matK (1.200 bp)	F56-mo	CCTATCCATCTGGAAATCTTAG	[9]
	R1326-mo	GTTCTAGCACAAGAAAGTCG	
trnL (700 bp)	trnL-F	GGTAGAGTACGACTTGATT	
	trnL-R	CGGTATTGACATGTAAATGGGACT	
rpoB (600 bp)	2F	ATGCAACGTCAAGCAGTTCC	
	4R	GATCCCAGCATCACAATTCC	
rpoC1 (600 bp)	1.1F	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	[11]
	1.3R	TGAGAAAACATAAGTAAAGGCG	
trnH-psbA (900 bp)	psbA3'f	CGCGCATGGTGGTTCACAATCC	
	trnHf	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	

Giải và hiệu chỉnh trình tự

Sau khi PCR, những sản phẩm cho ra kết quả tốt trên băng soi đặc hiệu sẽ được gửi đi giải trình tự tại Công ty FirstBase Singapore. Kết quả nhận được file trình tự của các vùng được khuếch đại cả hai chiều xuôi và ngược. Sau khi thu được kết quả trình tự thô, phần mềm Finch TV sẽ giúp đọc trình tự theo tín hiệu huỳnh quang để kiểm tra tín hiệu của sản phẩm.

Trình tự ADN thường được giải trình tự 2 chiều mỗi xuôi và mỗi ngược. Việc giải theo hai chiều giúp hạn chế tối đa việc đọc sai base. Do trình tự được giải theo 2 chiều nên một trong hai trình tự cần đối đầu lại trên phần mềm Finch TV trước khi tiến hành việc so sánh. Các trình tự 2 chiều được đưa vào phần mềm Seaview, chọn công cụ Align để sắp giống cột thẳng hàng tự động [12]. Các vị trí sắp giống cột chưa phù hợp sẽ được điều chỉnh thủ công sau đó.

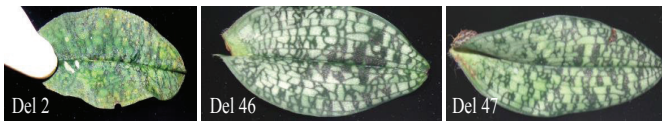
Phân tích tính đặc trưng trình tự

Phương pháp so sánh đa hình trình tự sử dụng chức năng variable sites (các điểm biến dị) của phần mềm Mega 7.0 để xác định các vị trí đột biến. Ghi nhận thủ công các vị trí mất đoạn (deletion), chèn đoạn (insertion), mất hoặc chèn một nucleotide (mononucleotide Indel).

Kết quả và thảo luận

Kết quả thu mẫu

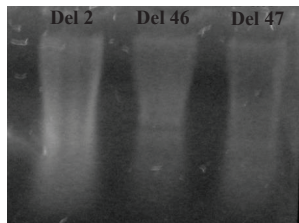
Chúng tôi thu được lá của 3 mẫu lan Hải hồng gồm 3 mẫu Hải hồng nguyên thể được đánh mã số Del 2, Del 46 và Del 47 (hình 1). Các mẫu được thu tại Viện Sinh học Tây Nguyên đã được định danh hình thái.



Hình 1. Lá của các mẫu Hải hồng thu được trong nghiên cứu.

Kết quả khuếch đại và giải trình tự các mẫu lan Hải hồng

ADN tổng số của 3 mẫu lan Hải hồng Del 2, Del 46 và Del 47 (hình 2) được sử dụng để khuếch đại cả 6 vùng trình tự gồm vùng ITS trong nhân, các vùng rpoB, rpoC1, trnH-psbA, matK, trnL trong lục lạp. Các sản phẩm khuếch đại được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

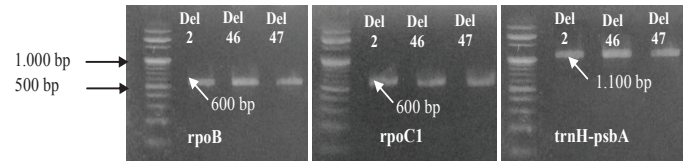


Hình 2. Kết quả tách ADN tổng số trên 3 mẫu lan Hải hồng.

Chú thích: vệt màu sáng đậm dài và rõ thể hiện nồng độ ADN cao, ADN sau khi tách do đứt gãy thành các kích thước khác nhau nên thể hiện thành vệt trải dài từ trên xuống dưới sau khi điện di.

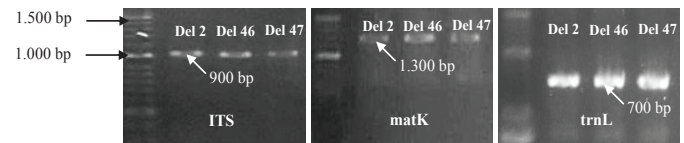
Kết quả điện di cho thấy, các sản phẩm PCR ở 5 vùng trình tự rpoB, rpoC1, ITS, matK, trnL (hình 3, 4) đều được khuếch đại thành công với chiều dài sản phẩm đúng với dự kiến, tương ứng là 600, 600, 900, 1.300 và 700 bp. Kết quả giải trình tự đều cho tín hiệu tốt ở cả chiều xuôi và chiều ngược. Sau khi sắp giống cột

và hiệu chỉnh độ tin cậy dựa vào phần mềm Seaview, các trình tự được cắt bỏ bớt hai đầu nhiễu, ghép chiều xuôi và chiều ngược thành một trình tự thống nhất, chiều dài các vùng trình tự còn 500, 500, 750, 1.500 và 550 bp ở các vùng tương ứng trên. Kết quả trình tự được so sánh với các trình tự lan Hải hồng tham khảo từ GenBank để phân tích đặc điểm đa hình trình tự.



Hình 3. Kết quả khuếch đại vùng rpoB, rpoC1 và trnH-psbA trên 3 mẫu lan Hải hồng.

Chú thích: sản phẩm PCR khuếch đại thành công sẽ thể hiện thành một băng sáng gọn rõ nét sau khi điện di và xem dưới ánh sáng huỳnh quang. Sản phẩm PCR được điện di cùng thang ADN để biết được kích thước của chiều dài đoạn khuếch đại.



Hình 4. Kết quả khuếch đại vùng ITS, matK và trnL trên 3 mẫu lan Hải hồng.

Chú thích: sản phẩm PCR khuếch đại thành công sẽ thể hiện thành một băng sáng gọn rõ nét sau khi điện di và xem dưới ánh sáng huỳnh quang. Sản phẩm PCR được điện di cùng thang ADN để biết được kích thước của chiều dài đoạn khuếch đại.

Riêng vùng trnH-psbA mặc dù cuối cùng khuếch đại thành công cả 3 mẫu nhưng phải lặp lại phản ứng PCR nhiều lần và chỉ giải trình tự được một đoạn dài khoảng 200 bp chiều F, 600 bp chiều R, tín hiệu xấu không thể sử dụng để phân tích được. Kết quả này có thể giải thích là do vùng trnH-psbA là vùng nằm giữa hai gen (intergenic spacer - IGS) nên tính biến thiên của vùng rất cao và không ổn định, dẫn đến trình tự mỗi phổ quát có thể không trùng khớp hoàn toàn với trình tự của mẫu, do đó phản ứng khuếch đại có tỷ lệ thành công thấp. Đồng thời, do phản ứng PCR được thực hiện bằng cặp mồi theo hai chiều xuôi và ngược, trong khi đặc điểm của phản ứng giải trình tự Sanger chỉ thực hiện theo một chiều, dẫn đến kết quả giải trình tự không phải luôn đặc hiệu như kết quả khuếch đại mà các peak tín hiệu có thể bị nhiễu hoặc không đọc được tín hiệu. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với một số công bố trước đây [13, 14]. Như vậy, vùng trnH-psbA không phù hợp để làm trình tự nhận diện cho các loài lan Hải hồng.

So sánh tính đa hình trình tự của lan Hải hồng Việt Nam trong nghiên cứu và trình tự của lan Hải hồng trên Genbank

Chiều dài sắp giống cột của các vùng rpoB, rpoC1, ITS, matK và trnL tương ứng là 485, 306, 700, 750 và 521 bp. Khi phân tích đa hình nucleotide, các mẫu của Việt Nam giống với nhau hoàn toàn theo từng vùng ở cả 5 trình tự là rpoB, rpoC1, ITS, matK và trnL. Từ đó rút ra được trình tự nucleotide chung cho loài Hải hồng Việt Nam ở các vùng nghiên cứu như sau:

rpoB:

ACTGGGTTAGAAAGGCCAAACGGCTCTAGATT
CGGGTATTTTACGCTATAGCCGAACACAAGGG
AAAAATCATTATATACTGATACTCACAAGATCG
TTTTCTCAAGTAATGGGGATACTCTAAGCATT
CCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAGAA
TACTTGTATGCATCAAAAAACTCAGGTTTCGG
CGGGGTAAATATATTA AAAAGGGACAAATTA
TAGCGGGCGGTGCGGCCACAGCTGGTGGAG
AACTCGCTTTAGGAAAAAATGTATTAGTAGC
TTATATGCCATGGGAAGGTTACAATTTGAAGACG
CAGTACTAATTAGTGAACGTCTGGTTTATGAAGATA
TTTATACTTCTTTTACATCCGGAAATATGAAAT
TCAGACTCATGTAACAAGCCAAGGTCCTGAAAGA
ATAACTAAAGAGATTCCGCATTTAGAGGCTCATTTA
TCCCGAAATTTAGACAGAAATGGAATTGT

rpoC1:

CGGGTCGATTATTCGGGACGTTCTGTCTATTG
TCGTGGGTCTTTTGCTTTTATTACATCAATGT
GGATTACCTCGAGAAATAGCAATAGAGCTCT
TCCAAACATTTGTAATTCGTGGTCTAATCAG
ACAACATGTTGCTTCTAACACAGGGATTGCT
AAAAGCAAAATTAGGGAAAAAGATTCCATTGTA
TGGGAAATACTTCAAGAAGTTATGCGGGGACAT
CCTATATTGTTGAATAGAGCACCTACCCTCCATA
GATTAGGCATACAGGCGTTCCAACCCATTTTAGTG
GAAGGGCGCGCTATT

ITS:

CCTCCTTGGGAGCTTTCTTGCCGGCGATCTAA
CCCTTGCCCGGCGCAGTTTTGCGCCAAGTCAC
ATGACACATAAATGGTGAAGGGCACGGCCCTTT
GTGAATTCAAGGAGGTGAAGGGCATGTGGCCT
TGAGCCTACACTCCCTCCCCCTCTCAAATTATTT
TTTGAACAACCTCTCAGCAACGGATATCTCGGCT
CTTGCATCGATGAAGAAGCGCAGCGAAATGCGA
TAAGTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACC
ATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGG
CCATCAGGCCAAGGGCACGCCTGCCTGGGCATT
GCGAGTCATATCTCTCCCTTAACGAGGCTGTCC
AGGCATACTGTTTCAGCCGGTGCAGGTTGTGAGT
TTGGCCCCCTTGTCTTTTGGTGCTGGGGGTCTAA
GAGCTGCAGGGGCTTTTGATGGTCTCTAAATTCTG
GCAAGAGGTGGACGCAACGCGCTACAACAAAC
TGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATG
GGCCAGCATAATCTAAACACCCTTGTGAACCCCA
TTGGAGGCCCATCAACCCATGATCAGTTGATGGC
CATTTGGTT

matK:

GAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCA
ATTAATATCTTCTTCTGAATCTTCTGAAGAAA
AAAAATACTAAATATCATAATTTACGATCTA
TTCATTCAATATTTCCCTTTTTAGAGGACAAA

TTTTTACATTTGAATTATGTGTCAGATCTACTA
ATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTTGGT
TCAAGTACTTCAATGCTGGATCAAGGATGTTT
CTTCTTTGCATTTATTGCGATTTCTTTTCCACG
AATATCATAATTTGAATAGTCTCATTACTTCA
AAAGAATTCAATTTACGCCTTTTCAAAAAGA
AAGAAAAGATTCCCTTTGGTTTCTATATAATTC
TTATGTATATGAATGCGAATATTTATTCTGT
TTATTCGTAAACAGTCTTCTTATTACGATCAA
CATCCTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACAT
TTCTATGTAAAAATAGAGCATCTTATAGTAGTGT
GTTGTAATTCCTTTTCAGAAAGATCCTATGCTTTC
TCAAGGATACTTTCATGCATTATGTTTCGATATC
AAGGAAAGGCAATTCTGGCTTCAAAGGGGAAAC
TCTTATTCTGATGAATAAATGGAAATTTTCATCTT
GTGCATTTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGGC
TCAACCGTATAGGATTCATATAAAGCAATTATCCA
ACTATTCCTTCTCTTTTCTGGGGTATTTTTCAAGTG
TACTAGAAAATCGTTGGTAGTAAGAAAT

trnL:

GATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTT
GCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACC
CTGGAATAAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC
TTTATAAAAAATGAAAAATGAGAATAAAAAAGGGAT
AGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGA
ATGAAATTGACTACGTTACGTTAGTAGCAAAAAT
CCTTCTATCAAATGATAGAAATGACAGTAAAGGA
TAAGCTTATATACCTAATACATACTGACATAGGA
AAGATTAATTACAACCCTCTATTTTCGATATTTAGAT
TCTTTCTATATTAATTAGAATGATAGAGATCAAAT
AATCATTCTAAAGATCAGAAAAATCTATGAAAAAA
GGAAGAATTATTCTTAATCCATTCCCATTTTTCCA
ATTGAAGTTTAAATTGGAATCGAATTCTAATATTCA
TTGATCAAATGATTTCATTCCAGAGTTTCATAGATCC
TTTGA A A A T T A A T C G G A C G A G A T A A G
AGAGAGTCCCATTTT

Khi so sánh với các trình tự ở GenBank thì các trình tự ở 4 vùng *rpoB*, *rpoC1*, *ITS* và *trnL* mẫu của Việt Nam cũng tương đồng với các trình tự của thế giới với độ tương đồng 100% (hình 5-8).

MF033379.1 Paphiopedilum delenatii isolate GBVNM17.13 RNA polymerase B (*rpoB*) gene, partial cds; chloroplast
Sequence ID: Query_234553 Length: 369 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 369		Graphics		Next Match		Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Plus/Plus		
676 bits(366)	0.0	366/366(100%)	0/366(0%)				
Query 1	ACTGGTTAGAGGCCAAACGGCTCTAGATTCGGGATTTTCAAGTATAGCCGAACACAG						60
Subjt 4	ACTGGTTAGAGGCCAAACGGCTCTAGATTCGGGATTTTCAAGTATAGCCGAACACAG						63
Query 61	GGAAAAATCATTATAGTACTACACAGATCGTTTCTCAAGTAATGGGGATCTCTA						120
Subjt 64	GGAAAAATCATTATAGTACTACACAGATCGTTTCTCAAGTAATGGGGATCTCTA						123

Hình 5. So sánh trình tự vùng *rpoB* của mẫu Hải hồng nghiên cứu với trình tự GenBank cho kết quả tương đồng identity 100%.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Paphiopedilum delenatii isolate GBVNM7.13 RNA polymerase beta' subunit (rpoC1) gene	566	566	100%	2e-157	100.00%	MF033380.1
Paphiopedilum delenatii RNA polymerase beta' subunit (rpoC1) gene, partial cds: chloroplast	566	566	100%	2e-157	100.00%	KX265004.1

Hình 6. So sánh trình tự vùng rpoC1 của mẫu Hải hồng nghiên cứu với trình tự GenBank cho kết quả tương đồng identity 100%.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Paphiopedilum delenatii voucher KFBG2047B internal transcribed spacer 1, partial sequence	1110	1110	100%	0.0	100.00%	KY966634.1
Paphiopedilum delenatii voucher KFBG2047A internal transcribed spacer 1, partial sequence	1110	1110	100%	0.0	100.00%	KY966633.1
Paphiopedilum delenatii internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1110	1110	100%	0.0	100.00%	JQ929314.1
Paphiopedilum delenatii internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1110	1110	100%	0.0	100.00%	JX088548.1
Paphiopedilum delenatii internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1110	1110	100%	0.0	100.00%	GU461600.1
Paphiopedilum delenatii voucher KDAIS Pap-73 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1110	1110	100%	0.0	100.00%	EF156096.1

Hình 7. So sánh trình tự vùng ITS của mẫu Hải hồng nghiên cứu với trình tự GenBank cho kết quả tương đồng identity 100%.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Paphiopedilum delenatii voucher KDAIS Pap-73 rRNA-L (trnL) gene, intron: chloroplast	963	963	100%	0.0	100.00%	EF156011.1

Hình 8. So sánh trình tự vùng trnL của mẫu Hải hồng nghiên cứu với trình tự GenBank cho kết quả tương đồng identity 100%.

Riêng đối với vùng matK, trong số các trình tự GenBank của *P. delenatii* có 3 trình tự có nucleotide biến dị so với của Việt Nam, trong đó hai trình tự *P. delenatii* AY368379 và *P. delenatii* JQ182193.1 khác biệt ở một số vị trí nucleotide (hình 9), độ tương đồng đạt 99,60-99,87%. Đây là hai trình tự thu thập từ GenBank nên mang tính chất tham khảo, sự khác biệt có thể do đa hình di truyền địa lý hoặc do sự lai giống trong tự nhiên, hoặc do các vấn đề về định danh cá thể.

	36	79	83	242	328	332	404	413	551	588	674	741
Del 2	A	A	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
Del 46	A	A	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
Del 47	A	A	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
P.delenatii EU490699.1	A	A	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
P.delenatii JQ660905.1	A	A	T	G	G	C	T	A	A	A	G	G
P.delenatii JQ929368.1	-	-	-	G	G	C	T	A	A	C	G	G
P.delenatii AY368379.1	G	C	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
P.delenatii JQ182193.1	A	A	G	T	A	A	C	G	G	C	A	A

Hình 9. Các vị trí đa hình trình tự trong vùng matK giữa các mẫu lan Hải hồng.

Chú thích: các vị trí mang dấu gạch ngang (-) là các nucleotide ở đầu trình tự chưa xác định. Các mẫu mang mã số accession number là mẫu tham khảo từ GenBank. Hình so sánh thể hiện các vị trí nucleotide khác biệt.

Kết luận

Các trình tự của 3 mẫu lan Hải hồng Việt Nam trong nghiên cứu đều giống nhau về đa hình nucleotide ở những vùng trình tự rpoB, rpoC1, ITS, matK và trnL. Điều này cho thấy tính thống nhất về mặt di truyền của loài. Đồng thời, trình tự của loài ở Việt Nam cũng tương đồng cao với trình tự cùng loài trên thế giới. Vùng trnH-psbA là vùng khó khuếch đại và giải trình tự nên cần xem xét việc sử dụng vùng này trong nhận diện các loài lan Hải.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ NTTU thông qua đề tài mã số 2017.01.53. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Yao, et al. (2009), "Identification of Dendrobium species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region", *Planta Med.*, **75**, pp.667-669.
- [2] I. Parveen, et al. (2012), "DNA barcoding of endangered Indian Paphiopedilum species", *Mol. Ecol. Resour.*, **12**, pp.82-90.
- [3] Y.Y. Guo, et al. (2012), "Evolution and biogeography of the slipper orchids: Eocene vicariance of the congeneric genera in the Old and New World Tropics", *PLoS One*, **7**, e38788.
- [4] H.M. Kim, et al. (2013), "DNA barcoding of Orchidaceae in Korea", *Mol. Ecol. Resour.*, **14**, pp.499-507.
- [5] T.Y. Ying, et al. (2015), "Phylogeny and classification of the East Asian Amitostigma alliance (Orchidaceae: Orchideae) based on six DNA markers", *BMC Evolutionary Biology*, **15**, p.96.
- [6] Phan Kế Long, Nguyễn Giang Sơn, Đặng Tất Thế (2009), "Mối quan hệ di truyền của một số loài lan Hải thuộc chi *Paphiopedilum* ở Việt Nam", *Tuyển tập báo cáo Hội nghị sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 3*.
- [7] Nguyễn Thị Mỹ Duyên, Trương Trọng Ngôn, Trần Nhân Dũng (2010), "Quan hệ giữa các giống, loài hoa lan (Orchidaceae) dựa trên đặc điểm hình thái", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **5**, pp.165-175.
- [8] K.H. Trung, T.D. Khanh, L.H. Ham, T.D. Duong, N.K. Truong (2013), "Molecular phylogeny of the endangered Vietnamese paphiopedilum species based on the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA", *Advanced Studies in Biology*, **5(7)**, pp.337-346.
- [9] Đặng Văn Khải, Nguyễn Thị Nhã, Vũ Thị Huyền Trang (2017), "Lựa chọn, thiết kế, thử nghiệm và ứng dụng một số môi trường khuếch đại các vùng trình tự tiềm năng để nhận diện các loài lan Hải (*Paphiopedilum*) Việt Nam", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, tr.113-118.
- [10] C.C. Tsai (2003), *Molecular Phylogeny, Biogeography, and Evolutionary Trends of the genus Phalaenopsis (Orchidaceae)*.
- [11] CBOL (2009), "A DNA barcode for land plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, pp.12794-12797.
- [12] M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel (2010), "SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building", *Mol. Biol. Evol.*, **27**, pp.221-224.
- [13] W. Dong, et al. (2015), "Ycf1, the most promising plastid DNA barcode of land plants", *Scientific Reports*, **5**, p.8348.
- [14] G. Gigot, et al. (2007), "Finding a suitable DNA barcode for Mesoamerican orchids", *Lankesteriana*, **7**, pp.200-203.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài viết gửi về Tòa soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, không gạch chân hay viết nghiêng.

- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.

- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số (^{1,2...}) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh. Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khoá bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet. Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

Dẫn nhập/đặt vấn đề

Định nghĩa vấn đề, tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

Bàn luận

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài.

Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài.

Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện (^{1,2,3...}) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập (số)**, pp<trang đầu-trang cuối>

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách...

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được in nghiêng).

Tập (số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này in đậm).

Trang đầu-trang cuối là số thứ tự các trang phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Chú ý: nếu có ≥ 2 tài liệu tham khảo do cùng 1 tác giả/nhóm tác giả, cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a).

Nếu có một số tài liệu tham khảo trong cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: Kitchen (1982, p 39).

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Tòa soạn không trả lại bản thảo.

- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.

- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng: kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của Y - dược học

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 61 - Number 5 - May 2019

Tình trạng vi khuẩn mang gen ESBL trên người khỏe mạnh tại xã Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam.

Phạm Thị Thanh Hương, Vũ Thanh Phương, Vũ Anh Thư, Nguyễn Quang Huy, Phạm Duy Thái, Trần Huy Hoàng

Nghiên cứu quá trình giải phóng thuốc quinin sulfat từ vật liệu tổ hợp polylactic axit/chitosan/quinin sulfat.

Hoàng Thanh Đức, Nguyễn Thị Thu Trang

Bào chế gel vi nhũ tương từ cao khô Rau đắng đất [*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., Molluginaceae].

Nguyễn Thị Kim Liên, Lê Xuân Trường, Trần Văn Thành

Định loài ấu trùng *Gnathostoma* spp. từ ký chủ trung gian thứ 2 bằng phương pháp sinh học phân tử.

Nguyễn Thị Thanh Thảo, Lê Đức Vinh, Nguyễn Kim Thạch, Trần Thị Huệ Vân, Huỳnh Hồng Quang

Khảo sát hiệu ứng của hỗn hợp selen nano/oligochitosan và *Spirulina platensis* đến số lượng bạch cầu ở chuột.

Nguyễn Thị Mỹ Lan, Võ Thị Loan Thảo, Quách Phương Đông, Đặng Văn Phú, Nguyễn Quốc Hiến

Nuôi cấy *in vitro* đốt thân cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi).

Lê Thị Tâm Hồng, Lê Thị Thủy Tiên, Trần Văn Minh

Ảnh hưởng của môi trường khoáng và chất kháng vi sinh vật trong nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb.).

Phan Xuân Bình Minh, Đỗ Thị Kim Trang, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Phương Lan, Trần Bảo Trâm

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật đến khả năng nhân giống hữu tính cây Xạ can (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.).

Trần Thị Lan, Nguyễn Văn Tâm, Phan Thúy Hiền, Phạm Thị Ngọc Bích

Xác định khoảng cách cắt thích hợp cho cây thức ăn xanh *Moringa oleifera* ở năm thứ nhất.

Từ Quang Hiến, Hoàng Thị Hồng Nhung, Từ Quang Trung

Đánh giá sự biến đổi chất lượng của tôm sú nhằm xác định hạn sử dụng bằng các phương pháp bảo quản khác nhau.

Lê Nhất Tâm, Đoàn Như Khuê, Huỳnh Nguyễn Quế Anh, Trương Huỳnh Anh Vũ, Chu Văn Hải

Đánh giá khả năng chịu hạn và một số chỉ tiêu sinh hóa của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* trong điều kiện hạn nhân tạo ở giai đoạn cây con.

Đoàn Thị Bích Thảo, Nguyễn Xuân Thắng, Lê Tuấn Anh, Lê Công Tùng, Nguyễn Thị Thu Hoài, Lê Công Lực, Nông Văn Hải, Bùi Mạnh Cường

Đặc điểm di truyền trình tự loài lan Hải hồng *Paphiopedilum delenatii* đặc hữu Việt Nam.

Vũ Thị Huyền Trang, Trần Anh Khoa, Vũ Quốc Luận, Lê Thị Lý, Phạm Công Hoat, Trần Hoàng Dũng

1

Prevalence of ESBL-producing bacteria on healthy people in Trảng An commune, Binh Luc district, Ha Nam province.

Thi Thanh Huong Pham, Thanh Phuong Vu, Anh Thu Vu, Quang Huy Nguyen, Duy Thai Pham, Huy Hoang Tran

5

Study on the release of quinine sulphate from polylactic acid/chitosan/quinine sulfate composite materials.

Thanh Duc Hoang, Thi Thu Trang Nguyen

11

Preparation of microemulsion-based gels from carpet weed [*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., Molluginaceae] dry extract.

Thi Kim Lien Nguyen, Xuan Truong Le, Van Thanh Tran

16

Molecular biology identification of the *Gnathostoma* spp. larvae from 2nd intermediate host.

Thi Thanh Thao Nguyen, Duc Vinh Le, Kim Thach Nguyen, Thi Hue Van Tran, Hong Quang Huynh

21

Effect of the selenium nanoparticle/oligochitosan and *Spirulina platensis* mixture to the quantity of white blood cells in mice.

Thi My Lan Nguyen, Thi Loan Thao Vo, Phuong Dong Quach, Van Phu Dang, Quoc Hien Nguyen

26

***In vitro* nodal culture technique of *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi.**

Thi Tam Hong Le, Thi Thuy Tien Le, Van Minh Tran

31

Effect of mineral medium and antimicrobial mixture on the *in vitro* propagation of *Huperzia serrata* Thunb.

Xuan Binh Minh Phan, Thi Kim Trang Do, Thi Hien Nguyen, Phuong Lan Nguyen, Bao Tram Tran

37

The influence of some techniques on the sexual propagation capacity of *Belamcanda chinensis* (L.) DC.

Thi Lan Tran, Van Tam Nguyen, Thuy Hien Phan, Thi Ngoc Bich Pham

41

Determination of optimal harvesting interval for *Moringa oleifera* in the first year production.

Quang Hien Tu, Thi Hong Nhung Hoang, Quang Trung Tu

47

Evaluation on the changes in black tiger shrimp quality to determine its shelf-life using different preservation methods.

Nhat Tam Le, Nhu Khue Doan, Nguyen Que Anh Huynh, Huynh Anh Vu Truong, Van Hai Chu

55

Evaluation of biochemical parameters and drought resistance in *ZmDREB2A* transgenic maize at the seedling stage.

Thi Bich Thao Doan, Xuan Thang Nguyen, Tuan Anh Le, Cong Tung Le, Thi Thu Hoai Nguyen, Cong Luc Le, Van Hai Nong, Manh Cuong Bui

60

Genetic characteristics of the endemic orchid species *Paphiopedilum delenatii* in Vietnam.

Thi Huyen Trang Vu, Anh Khoa Tran, Quoc Luan Vu, Thi Ly Le, Cong Hoat Pham, Hoang Dung Tran