



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 62 - Số 2 - Tháng 2 năm 2020

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

Nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào gamma delta T trên bệnh nhân ung thư phổi

Nguyễn Quý Linh^{*}, Tạ Thành Đạt¹, Lê Văn Toàn²,
Trần Văn Khánh¹, Hoàng Thị Mỹ Nhung³, Trần Huy Thịnh²

¹Trung tâm Nghiên cứu gen - protein, Trường Đại học Y Hà Nội

²Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội

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

Ngày nhận bài 5/9/2019; ngày chuyển phản biện 9/9/2019; ngày nhận phản biện 11/10/2019; ngày chấp nhận đăng 4/11/2019

Tóm tắt:

Liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào lympho tự thân là một trong những liệu pháp điều trị kết hợp an toàn và khá hiệu quả cho nhiều loại ung thư hiện nay, trong đó có ung thư phổi. Mục đích của nghiên cứu là hoàn thiện quy trình tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa tế bào gamma delta T ($\gamma\delta$ T) trên bệnh nhân ung thư phổi. 10 bệnh nhân ung thư phổi được lựa chọn vào nghiên cứu, mỗi bệnh nhân được thu thập 10 ml máu, tiến hành tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh, đánh giá hoạt tính miễn dịch. Kết quả cho thấy, số lượng tế bào $\gamma\delta$ T tách từ 10 ml máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư phổi là $1,96 \times 10^4$ tế bào. Sau 14 ngày nuôi cấy, số lượng tế bào lympho thu được trung bình là $2,93 \times 10^8$, tỷ lệ sống trung bình đạt 90%, trong đó, tế bào $\gamma\delta$ T chiếm 83,2% quần thể tế bào thu được. Tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy thể hiện các hoạt tính miễn dịch như khả năng gây độc cho tế bào ung thư và tăng tiết các cytokine như IFN γ .

Từ khóa: liệu pháp miễn dịch tự thân, tế bào gamma delta T ($\gamma\delta$ T), ung thư phổi.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Ung thư phổi là bệnh có tỷ lệ mắc và tử vong hàng đầu trong số các loại ung thư trên thế giới. Theo ghi nhận của Globocan năm 2018 [1], số ca mới mắc ung thư phổi trên toàn thế giới là 2,1 triệu ca, chiếm 11,6% tổng số ca mắc ung thư; số ca tử vong do ung thư phổi là 1,76 triệu ca, chiếm 18,4% số ca tử vong do ung thư. Tại Việt Nam, theo Globocan năm 2018 [2], tỷ lệ mới mắc ung thư phổi xếp thứ hai đối với nam giới (chiếm 18,4%, sau ung thư gan) và xếp thứ ba đối với nữ giới (chiếm 9,4%, sau ung thư vú, ung thư đại trực tràng), có 164.671 ca mắc mới ung thư phổi và 114.871 người tử vong vì căn bệnh này. Trong bối cảnh đó, việc phát triển các phương pháp điều trị mới cũng như phối hợp các phương pháp điều trị nhằm nâng cao hiệu quả, cải thiện chất lượng sống, thời gian sống thêm không bệnh và sống thêm toàn thể với bệnh nhân ung thư phổi là điều hết sức có ý nghĩa.

Trên thế giới, liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân sử dụng tế bào lympho $\gamma\delta$ T được phát triển để điều trị nhiều loại ung thư, bao gồm cả ung thư phổi đã cho những kết quả ban đầu hứa hẹn [3, 4]. Tế bào $\gamma\delta$ T có thể nhận biết trực tiếp các phối tử không phải bản chất peptide mà không cần sự có mặt của phức hệ phù hợp mô chính (MHC). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tế bào $\gamma\delta$ T của người có thể nhận biết các phối tử được biểu hiện bởi các tế bào khối u và thể hiện độc tính mạnh với nhiều dòng tế bào ung thư [5]. Liệu

pháp miễn dịch sử dụng tế bào $\gamma\delta$ T tự thân đã được thử nghiệm và mang lại một số kết quả khả quan. Trong liệu pháp này, tế bào miễn dịch được tách từ máu ngoại vi của người bệnh, nuôi cấy tăng sinh, hoạt hóa trong môi trường đặc biệt rồi truyền trở lại vào cơ thể của chính bệnh nhân. Trong những nghiên cứu trước đây, một số kháng nguyên phospho đã được sử dụng để hoạt hóa tế bào $\gamma\delta$ T. Kháng nguyên tổng hợp bromohydrin pyrophosphate (BrHPP) và 2-methyl-3-butenyl-1-pyrophosphate (2M3B1PP) đã được ứng dụng thành công trong việc tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T, được thử nghiệm lâm sàng trên bệnh nhân ung thư biểu mô thận. Những thử nghiệm lâm sàng pha I cho thấy, liệu pháp miễn dịch tự thân sử dụng tế bào $\gamma\delta$ T cho những kết quả khả quan, hứa hẹn sẽ phát triển thành một liệu pháp điều trị ung thư có hiệu quả [6].

Hiện tại, Việt Nam vẫn đang trong giai đoạn tiếp cận với liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân trong điều trị ung thư và chưa có nhiều công trình nghiên cứu được công bố trong lĩnh vực này. Do đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu hoàn thiện quy trình phân lập, nuôi cấy hoạt hóa tế bào $\gamma\delta$ T trên bệnh nhân ung thư phổi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn sử dụng zoledronate và IL-2 để hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T *in vitro* bởi vì hai hóa chất này đã được biết đến là có khả năng hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T cũng như đã được cấp phép sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng.

*Tác giả liên hệ: Email: quylinh@hmu.edu.vn

Activation culture and proliferation of $\gamma\delta$ T cells from lung cancer patients

Quy Linh Nguyen^{1*}, Thanh Dat Ta¹, Van Toan Le²,
Van Khanh Tran¹, Thi My Nhung Hoang³, Huy Thinh Tran²

¹Center for Gene and Protein Research, Hanoi Medical University

²Department of Biochemistry, Hanoi Medical University

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

Received 5 September 2019; accepted 4 November 2019

Abstract:

Autologous $\gamma\delta$ T lymphocyte-based immunotherapy is currently an efficacious and safe treatment method for various types of cancer, including lung cancer. The study was conducted on 10 lung cancer patients, and the $\gamma\delta$ T cells were isolated, activated, proliferated, and evaluated from 10 ml of blood of each patient. The number of $\gamma\delta$ T cells isolated from 10 ml peripheral blood was 1.96×10^4 cells. The number of cells after 14-day culture was 2.93×10^8 , and the cell survival rate was 90%. 83.2% of the cultured lymphocytes was $\gamma\delta$ T cells. The cultured $\gamma\delta$ T cells exhibited immune activities, such as cytotoxic activity and increased cytokine secretion.

Keywords: autologous immunotherapy, gamma delta T ($\gamma\delta$ T) cells, lung cancer.

Classification number: 3.1

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng

10 bệnh nhân ung thư phổi được lựa chọn vào nghiên cứu. Bệnh nhân trên 18 tuổi, chỉ số toàn trạng ECOG (thang điểm của Nhóm hợp tác ung thư Đông Âu - Eastern Cooperative Oncology Group) ≤ 3 . Bệnh nhân được khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

Các bệnh nhân có bệnh lý tự miễn, dùng thuốc ức chế miễn dịch, bệnh lý mạn tính kết hợp, bệnh lý ác tính dòng tế bào lympho T sẽ bị loại trừ khỏi nghiên cứu này.

Phương pháp

Phương pháp thu thập mẫu: 10 ml máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư phổi được lấy vào ống chống đông heparin, bảo quản ở nhiệt độ phòng và được xử lý trong vòng 6 giờ.

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

Kỹ thuật phân tách tế bào lympho từ máu ngoại vi: các tế bào

miễn dịch được tách bằng phương pháp ly tâm thay đổi tỷ trọng sử dụng Ficoll 1.077.

Kỹ thuật nuôi cấy hoạt hóa tế bào $\gamma\delta$ T: sau khi phân lập, các tế bào được nuôi cấy trong môi trường AIM-V chứa 10% huyết thanh của bệnh nhân có bổ sung thêm cytokine IL-2 (600 IU/ml) và zoledronate (5 mM). Khi các tế bào ổn định, đạt mật độ nuôi cấy cần thiết (70-80%) sẽ được chuyển sang các điều kiện nuôi cấy tăng sinh số lượng lớn. Tổng thời gian nuôi cấy và hoạt hóa tế bào lympho $\gamma\delta$ T là 14 ngày.

Phương pháp xác định tỷ lệ tế bào sống sử dụng Trypan blue: tế bào sau khi phân lập từ máu ngoại vi và sau nuôi cấy được nhuộm với Trypan blue để đếm số lượng và xác định tỷ lệ tế bào sống.

Kỹ thuật phân loại tế bào nuôi cấy bằng Flow cytometry: dựa trên biểu hiện của các marker đặc hiệu trên bề mặt tế bào tương ứng với mỗi giai đoạn hoạt hóa và biệt hóa của mỗi loại tế bào lympho. Các marker được sử dụng là CD3, CD4, CD8, CD19, CD56. Các tế bào lympho được nhuộm với kháng thể kháng marker đặc hiệu cho từng loại tế bào và được đếm trên máy đếm dòng chảy tế bào BD FACS Canto II.

Kỹ thuật Realtime PCR xác định mức độ biểu hiện của gen IFN γ , V γ 9: RNA tổng số được tách chiết từ tế bào $\gamma\delta$ T bằng kit RNeasy mini kit (Qiagen), sau đó được tổng hợp cDNA bằng Revert first strand cDNA synthesis kit (Thermo fisher scientific, USA) để sử dụng làm khuôn cho phản ứng Realtime PCR sử dụng cặp mồi và probe đặc hiệu của gen IFN γ và gen V γ 9 (Thermo fisher scientific, USA) trên hệ thống máy QuantStudio3 (Thermo fisher scientific, USA).

Kỹ thuật ELISA đánh giá khả năng tiết IFN γ ra môi trường nuôi cấy: kỹ thuật này dựa trên nguyên lý của phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể, đồng thời sử dụng kháng thể gắn enzyme và chất phát màu mà qua đó có thể xác định được nồng độ của protein cần biết trong mẫu phân tích (ở đây chính là môi trường nuôi cấy). Nồng độ IFN γ trong môi trường nuôi cấy được định lượng bằng kỹ thuật ELISA sử dụng IFN γ human ELISA kit (Thermo fisher scientific, USA).

Kỹ thuật xác định khả năng gây độc của tế bào: tế bào ung thư phổi H640 được nhuộm với chất huỳnh quang Calcein-AM, sau đó rửa sạch. Tế bào ung thư được nuôi cấy với số lượng 1×10^4 sẽ được đồng nuôi cấy với tế bào miễn dịch $\gamma\delta$ T với các tỷ lệ lần lượt là 1:1, 1:10, 1:30 trong 2 giờ. Hoạt tính gây độc sẽ được xác định bằng tín hiệu huỳnh quang giải phóng ra môi trường, được đo bằng hệ thống Terascan VPC (Minerva Tech, Nhật Bản).

Xử lý số liệu: các số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS 20.0. Thống kê phân tích sử dụng t-test độc lập so sánh giữa hai nhóm.

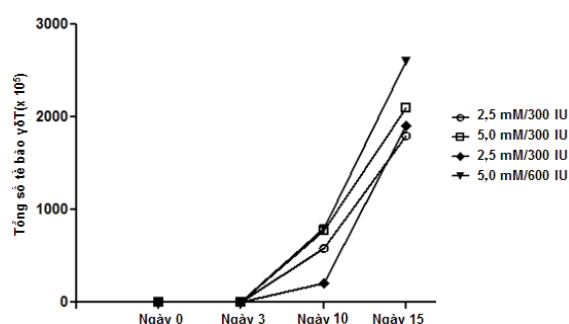
Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này thuộc đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu sử dụng tế bào miễn dịch tự thân gamma delta T ($\gamma\delta$ T) và diệt tự nhiên (NK) trong điều trị ung thư phổi” đã được Hội đồng đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội đồng ý thông qua giai đoạn thử nghiệm trên người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân ung thư.

Kết quả

Chuẩn hóa quy trình nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T trên bệnh nhân ung thư phổi

Sử dụng các nồng độ zoledronate và IL-2 khác nhau, lần lượt là 2,5 mM - 300 IU, 2,5 mM - 600 IU, 5 mM - 300 IU và 5 mM - 600 IU, tiến hành nuôi cấy và xác định tốc độ tăng trưởng của tế bào $\gamma\delta$ T tại một số thời điểm nuôi cấy. Kết quả được thể hiện ở hình 1. Số lượng tổng số tế bào thu được sau 14 ngày nuôi cấy tăng sinh đạt cao nhất tại nồng độ zoledronate - IL-2 là 5 mM - 600 IU. Số lượng tế bào đạt trên $2,6 \times 10^8$ tế bào là thỏa mãn yêu cầu cần đạt được. Tế bào lympho T đạt tỷ lệ cao nhất với 96,6% ở nồng độ zoledronate và IL-2 là 5 mM và 600 IU, trong đó tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T ở cả 3 điều kiện nuôi cấy tăng sinh, hoạt hóa đều đạt trên 95% tổng số tế bào T thu được. Như vậy, nồng độ zoledronate và IL-2 tối ưu cho nuôi cấy tăng sinh, hoạt hóa tế bào $\gamma\delta$ T lần lượt là 5 mM và 600 IU.



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của tế bào $\gamma\delta$ T ở các nồng độ zoledronate/IL-2 khác nhau.

Số lượng tế bào lympho thu được sau tách chiết từ máu ngoại vi bệnh nhân ung thư phổi

Bảng 1. Đặc điểm tế bào thu được sau phân lập từ máu ngoại vi.

	Số lượng tế bào	Tỷ lệ sống	Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T
BN01	$1,5 \times 10^4$	95%	5,1%
BN02	$1,8 \times 10^4$	94%	6,2%
BN03	$1,9 \times 10^4$	96%	5%
BN04	$1,2 \times 10^4$	95%	6,3%
BN05	$1,4 \times 10^4$	90%	6,4%
BN06	$2,4 \times 10^4$	98%	6,2%
BN07	$2,6 \times 10^4$	95%	6,1%
BN08	$1,9 \times 10^4$	92%	5,8%
BN09	$2,2 \times 10^4$	96%	6,5%
BN10	$2,7 \times 10^4$	97%	5,8%
TB	$1,96 \times 10^4$	94,8%	5,94%

TB: trung bình.

Bảng 1 cho thấy, số lượng tế bào lympho tách được từ 10 ml máu ngoại vi ở bệnh nhân ung thư phổi trung bình là $1,96 \times 10^4$. Trong đó, tế bào $\gamma\delta$ T chiếm tỷ lệ trung bình 5,94%. Tỷ lệ tế bào sống đạt 94,8%.

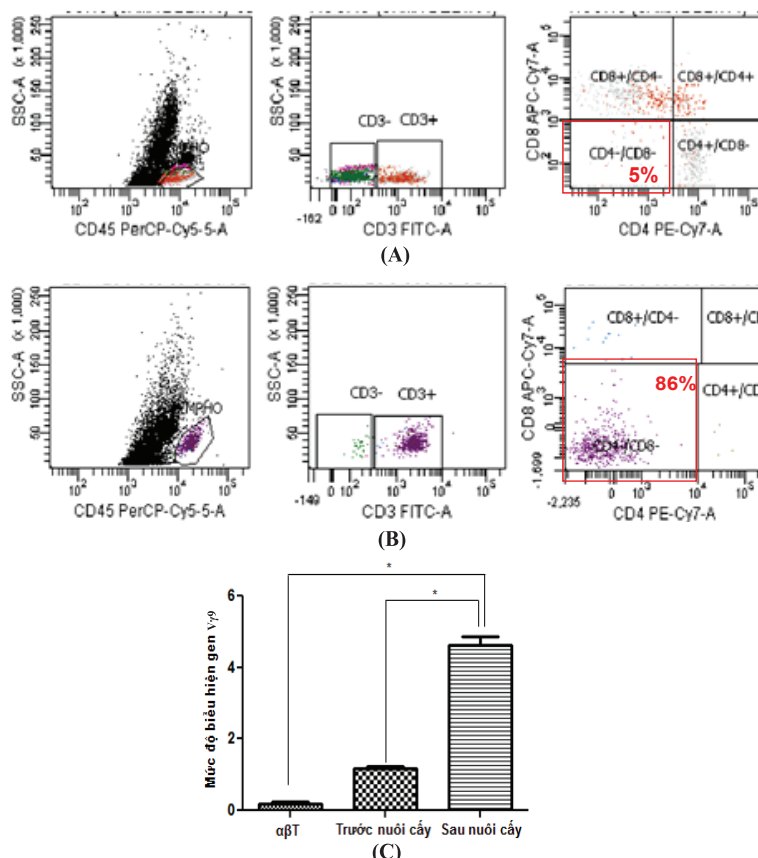
Số lượng tế bào lympho $\gamma\delta$ T tách từ bệnh nhân ung thư phổi thu được sau nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh

Bảng 2. Đặc điểm tế bào thu được sau nuôi cấy hoạt hóa.

	Số lượng tế bào	Tỷ lệ sống	Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T
BN01	$1,5 \times 10^8$	91%	81%
BN02	$4,5 \times 10^8$	89%	83%
BN03	$1,1 \times 10^8$	92%	86%
BN04	$1,6 \times 10^8$	93%	87%
BN05	$4,8 \times 10^8$	97%	84%
BN06	$2,5 \times 10^8$	96%	82%
BN07	$2,8 \times 10^8$	90%	83%
BN08	$3,7 \times 10^8$	78%	80%
BN09	$3,2 \times 10^8$	90%	85%
BN10	$3,6 \times 10^8$	90%	81%
TB	$2,93 \times 10^8$	90,6%	83,2%

TB: trung bình.

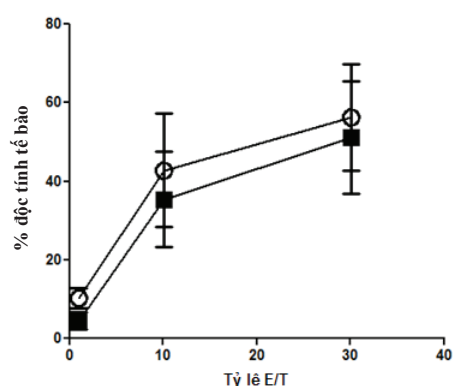
Bảng 2 cho thấy, số lượng tế bào trung bình thu được sau 14 ngày nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh là $2,93 \times 10^8$, tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T trung bình đạt 83,2% (hình 2). Quần thể tế bào thu được sau 14 ngày nuôi cấy biểu hiện ở mức độ cao gen $V\gamma 9$ mã hóa cho thụ thể bề mặt $V\gamma 9$ đặc trưng cho tế bào $\gamma\delta$ T (hình 2C). Kết quả này chứng minh quần thể tế bào thu được sau nuôi cấy chiếm tỷ lệ lớn là tế bào $\gamma\delta$ T. Tỷ lệ sống đạt 90,6%. So sánh với trước khi nuôi cấy, tế bào nhân lên trung bình 14.949 lần.



Hình 2. Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T thu được trước và sau nuôi cấy. (A) Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T thu được trước nuôi cấy; (B) Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy; (C) Biểu hiện của gen mã hóa cho thụ thể $V\gamma 9$ ở tế bào $\alpha\beta$ T, tế bào $\gamma\delta$ T trước và sau nuôi cấy. *: $p < 0,05$.

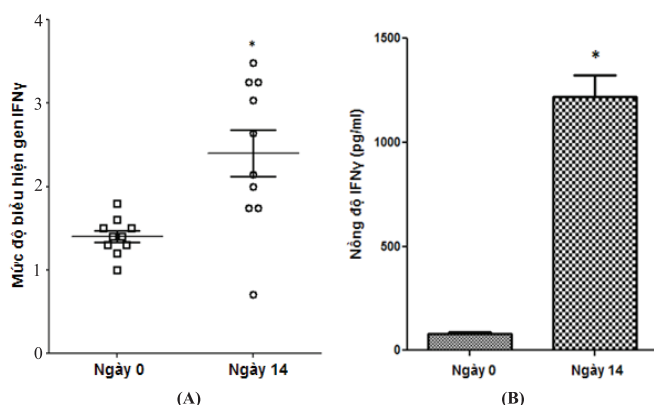
Đánh giá hoạt tính miễn dịch của tế bào $\gamma\delta T$ tách từ bệnh nhân ung thư phổi sau nuôi cấy

Hoạt tính gây độc cho tế bào ung thư H460 của tế bào $\gamma\delta T$ sau 14 ngày nuôi cấy được thực hiện trên hệ thống Terascan VPC. Tế bào $\gamma\delta T$ thu được từ người tình nguyện khỏe mạnh thể hiện độc tính khá cao với dòng tế bào ung thư phổi H460, đạt 42,6% ở tỷ lệ E/T 10:1 và 51,7% ở tỷ lệ E/T 30:1. Hình 3 cho thấy, tế bào $\gamma\delta T$ từ bệnh nhân ung thư phổi cũng thể hiện độc tính tương tự với dòng tế bào H460, đạt 38,8% ở tỷ lệ E/T 10:1 và 43,7% ở tỷ lệ E/T 30:1. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa độc tính đối với dòng tế bào ung thư H460 của tế bào $\gamma\delta T$ sau nuôi cấy hoạt hóa tăng sinh thu từ người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân ung thư phổi.



Hình 3. Hoạt tính gây độc của tế bào $\gamma\delta T$ sau 14 ngày nuôi cấy.

Thêm vào đó, chúng tôi cũng tiến hành kiểm tra khả năng tiết cytokine của tế bào $\gamma\delta T$ sau nuôi cấy bằng kỹ thuật Realtime PCR. Mức độ biểu hiện của gen IFN γ trong tế bào $\gamma\delta T$ sau khi nuôi cấy của bệnh nhân ung thư phổi cao hơn 2,40 lần so với trước khi nuôi cấy (hình 4A).



Hình 4. Mức độ biểu hiện của mRNA IFN γ trên tế bào $\gamma\delta T$ trước và sau nuôi cấy. (A) Biểu hiện ở mức độ mRNA IFN γ , (B) Khả năng tiết protein IFN γ . *: $p < 0,05$.

Không chỉ ở mức độ mRNA, nồng độ IFN γ do tế bào miễn dịch tiết vào môi trường nuôi cấy sau 14 ngày nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tăng cao hơn rõ rệt so với ngày đầu, đạt trung bình 1.217,29 pg/ml, so với trung bình 79,27 pg/ml trong môi trường nuôi cấy của tế bào trước nuôi cấy (hình 4B).

Bàn luận

Trước đây, phương pháp điều trị ung thư phổ biến được sử dụng bao gồm phẫu thuật, hóa trị và xạ trị. Đối với một số loại ung thư (như ung thư phổi), điều trị bằng thuốc trúng đích đang được đánh giá là có hiệu quả tốt. Trong những năm gần đây, liệu pháp miễn dịch nổi lên như một phương pháp điều trị ung thư có triển vọng. Liệu pháp sử dụng tế bào miễn dịch tự thân nhận biết ung thư không phải dựa trên đặc điểm giải phẫu hay khả năng phân chia của tế bào ung thư mà dựa vào cơ chế của tế bào miễn dịch dùng để phân biệt mô lành và mô bệnh. Liệu pháp miễn dịch tự thân sử dụng tế bào lympho T là phương pháp hiệu quả để điều trị ung thư dựa vào sự truyền lại cơ thể bệnh nhân tế bào lympho đặc hiệu khối u.

Liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư sử dụng tế bào lympho T có những ưu điểm sau: 1) Đáp ứng miễn dịch của tế bào lympho T rất đặc hiệu, do đó có khả năng phân biệt mô lành và mô ung thư; 2) Tế bào lympho T có thể nhân lên với số lượng lớn, gấp hàng nghìn lần sau khi được hoạt hóa; 3) Đáp ứng miễn dịch của tế bào lympho T có thể di chuyển đến vị trí của kháng nguyên, có thể ứng dụng để điều trị những khối u đã di căn; 4) Tế bào lympho T có khả năng ghi nhớ, duy trì hiệu quả điều trị trong nhiều năm sau lần điều trị đầu tiên [7]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò của tế bào $\gamma\delta T$ trong giám sát miễn dịch khối u. Những kết quả nghiên cứu trên chuột cho thấy, chuột thiếu hụt tế bào $\gamma\delta T$ nhạy cảm cao đối với các tác nhân gây ung thư da [8]. Trong các nghiên cứu lâm sàng, tế bào $\gamma\delta T$ cho thấy có khả năng thâm nhiễm vào nhiều loại khối u, bao gồm ung thư phổi, ung thư thận, ung thư tinh hoàn và ung thư vú. Trên quy mô phòng thí nghiệm (*in vitro*), nhiều nghiên cứu đã chỉ ra tế bào $\gamma\delta T$ thể hiện tính độc đối với các dòng tế bào ung thư, có khả năng tiết cytokine và tiêu diệt các tế bào ung thư vú, ung thư gan, ung thư buồng trứng hay ung thư đại trực tràng [9-12].

Số lượng tế bào bạch cầu tách được từ 10 ml máu ngoại vi ở bệnh nhân ung thư phổi trung bình là $1,96 \times 10^4$. Điều này được giải thích là do tất cả bệnh nhân trong nghiên cứu đều đang trong giai đoạn bệnh ổn định và chưa hoặc đã dừng điều trị bằng phóng xạ hay hóa chất. Tất cả các mẫu đều đạt tỷ lệ sống của tế bào trên 90%, trung bình 94,8%. Kết quả này tương đồng với những nghiên cứu tăng sinh hoạt hóa tế bào $\gamma\delta T$ sử dụng biposphonate kết hợp với cytokine đã được công bố trước đây. Burjanadzé và cộng sự (2007) [13] sử dụng phosphotism hoặc zoldronate kết hợp với IL-2 để nuôi cấy hoạt hóa và tăng sinh $\gamma\delta T$ trên bệnh nhân u tủy, sau 14 ngày nuôi cấy, thu được 88% tế bào là $\gamma\delta T$, số lượng tế bào $\gamma\delta T$ đạt $2,5 \times 10^6$, mức độ tăng sinh

gấp 300 lần so với ngày đầu nuôi cấy. Tương tự nghiên cứu này, Kondo và cộng sự (2011) [14] cũng sử dụng 5 mM zoledronate và 1.000 IU/ml IL-2, thu được 93,8% tế bào $\gamma\delta$ T, sau 14 ngày nuôi cấy thu được $2,2 \times 10^8$ tế bào, tăng 13.750 lần so với ngày đầu nuôi cấy. Tanaka và cộng sự (2018) [15] đã sử dụng PTA thay cho zoledronate để hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T trên tế bào ung thư vú và ung thư tuyến tiền liệt. Kết quả cho thấy, sử dụng PTA thu được $5,6 \times 10^8$ tế bào, trong đó 95,6% là tế bào $\gamma\delta$ T, tăng gấp 7.085 lần so với ngày đầu nuôi cấy. So sánh với các nghiên cứu tương tự trên thế giới cho thấy, quy trình tách chiết, hoạt hóa tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T áp dụng trong nghiên cứu này có hiệu quả tương đương và chất lượng đảm bảo để thực hiện những nghiên cứu tiếp theo.

Để kiểm tra khả năng gây độc của tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh, chúng tôi đã sử dụng phương pháp đo độc tính tế bào [16]. Đồng thời nuôi cấy tế bào $\gamma\delta$ T thu được với dòng tế bào ung thư phổi H460 theo tỷ lệ số lượng tế bào miễn dịch và tế bào ung thư lần lượt là 1:1, 1:10 và 1:30. Kết quả cho thấy, tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy có khả năng ly giải tế bào ung thư khi số lượng tế bào miễn dịch $\gamma\delta$ T nhiều hơn số lượng tế bào ung thư từ 10 lần trở lên. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Kondo và cộng sự (2008) [5] khi nghiên cứu hoạt hóa, tăng sinh số lượng lớn tế bào $\gamma\delta$ T. Thêm vào đó, kết quả phân tích cho thấy, sau 14 ngày nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh, biểu hiện gen IFN γ ở mức độ mRNA cũng như khả năng tiết cytokine IFN γ ra môi trường nuôi cấy tăng đáng kể so với ngày đầu nuôi cấy. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Kondo và cộng sự (2011) [14] nhận thấy biểu hiện gen IFN γ tăng mạnh trong tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy. Điều này chứng tỏ tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh có khả năng thể hiện hoạt tính miễn dịch, kháng tế bào ung thư tương tự với tế bào $\gamma\delta$ T trong cơ thể.

Kết luận

Nghiên cứu đã hoàn thiện quy trình tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T tách từ bệnh nhân ung thư phổi. Tế bào thu được sau nuôi cấy đảm bảo đủ số lượng, chất lượng cũng như thể hiện được hoạt tính miễn dịch tương tự như tế bào miễn dịch trong cơ thể.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả của nghiên cứu này thuộc đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu sử dụng tế bào miễn dịch tự thân gamma delta T ($\gamma\delta$ T) và diệt tự nhiên (NK) trong điều trị ung thư phổi” (7/2018-12/2020) do Trường Đại học Y Hà Nội chủ trì, PGS.TS Trần Huy Thịnh làm chủ nhiệm đề tài. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, et al. (2018), “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”, *CA Cancer J.*

Clin., **68**(6), pp.394-424.

[2] Global Cancer Observatory, <https://gco.iarc.fr/>.

[3] E.G. Iliopoulou, P. Kountourakis, M.V. Karamouzis, et al. (2010), “A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer”, *Cancer Immunol. Immunother. CII*, **59**(12), pp.1781-1789.

[4] Y.J. Yang, J.C. Park, H.K. Kim, et al. (2013), “A trial of autologous ex vivo-expanded NK cell-enriched lymphocytes with docetaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer as second- or third-line treatment: phase IIa study”, *Anticancer Res.*, **33**(5), pp.2115-2122.

[5] M. Kondo, K. Sakuta, A. Noguchi, et al. (2008), “Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy”, *Cytotherapy*, **10**(8), pp.842-856.

[6] L. Xiao, C. Chen, Z. Li, et al. (2018), “Large-scale expansion of V γ 9V δ 2 T cells with engineered K562 feeder cells in G-Rex vessels and their use as chimeric antigen receptor-modified effector cells”, *Cytotherapy*, **20**(3), pp.420-435.

[7] K. Perica, J.C. Varela, M. Oelke, et al. (2015), “Adoptive T cell immunotherapy for cancer”, *Rambam Maimonides Med. J.*, **6**(1), Doi: 10.5041/RMMJ.10179.

[8] M.S. Cruz, A. Diamond, A. Russell, et al. (2018), “Human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in skin immunity and disease”, *Front. Immunol.*, **9**, Doi: 10.3389/fimmu.2018.01304.

[9] E.S. Morrow, A. Roseweir, J. Edwards (2019), “The role of gamma delta T lymphocytes in breast cancer: a review”, *Transl. Res.*, **203**, pp.88-96.

[10] W. Tian, J. Ma, R. Shi, et al. (2018), “ $\gamma\delta$ T cell-mediated individualized immunotherapy for hepatocellular carcinoma considering clinicopathological characteristics and immunosuppressive factors”, *Oncol. Lett.*, **15**(4), pp.5433-5442.

[11] X. Chen, W. Shang, R. Xu, et al. (2019), “Distribution and functions of $\gamma\delta$ T cells infiltrated in the ovarian cancer microenvironment”, *J. Transl. Med.*, **17**, article number 144 (2019).

[12] T. Ramutun, S. Buccheri, F. Dieli, et al. (2014), “ $\gamma\delta$ T cells as a potential tool in colon cancer immunotherapy”, *Immunotherapy*, **6**(9), pp.989-999.

[13] M. Burjanadzé, M. Condomines, T. Reme, et al. (2007), “In vitro expansion of gamma delta T cells with anti-myeloma cell activity by Phosphostim and IL-2 in patients with multiple myeloma”, *Br. J. Haematol.*, **139**(2), pp.206-216.

[14] M. Kondo, T. Izumi, N. Fujieda, et al. (2011), “Expansion of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells using zoledronate”, *J. Vis. Exp.*, (55), Doi: 10.3791/3182.

[15] Y. Tanaka, K. Murata-Hirai, M. Iwasaki, et al. (2018), “Expansion of human $\gamma\delta$ T cells for adoptive immunotherapy using a bisphosphonate prodrug”, *Cancer Sci.*, **109**(3), pp.587-599.

[16] A. Adan, Y. Kiraz, Y. Baran (2016), “Cell proliferation and cytotoxicity assays”, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **17**(14), pp.1213-1221.

Kết quả bước đầu ứng dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy tại Học viện Quân y

Nguyễn Đình Tảo^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Nga¹, Trần Văn Khoa¹, Nguyễn Thị Hồng Vân²,
Triệu Tiên Sang¹, Nguyễn Thanh Tùng¹, Nguyễn Ngọc Khánh³

¹Học viện Quân y

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

³Viện Nhi Trung ương

Ngày nhận bài 6/9/2019; ngày chuyển phản biện 9/9/2019; ngày nhận phản biện 7/10/2019; ngày chấp nhận đăng 30/10/2019

Tóm tắt:

Từ tháng 2/2015 tới 11/2019, Học viện Quân y đã nghiên cứu xây dựng và áp dụng thành công quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy (spinal muscular atrophy - SMA). Nghiên cứu bước đầu ứng dụng quy trình này được thực hiện trên 6 cặp gia đình mang đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA. Máu ngoại vi bố, mẹ được tách ADN, sinh thiết 1-2 tế bào từ các phôi thụ tinh trong ống nghiệm phát triển đến ngày 3 hoặc ngày 5 của các cặp gia đình này, nhân toàn bộ gen các mẫu phôi sinh thiết, phát hiện đột biến gây bệnh trên máu bố mẹ và phôi bằng phương pháp PCR-RFLP, chọn phôi lành chuyển vào người mẹ để sinh ra trẻ khỏe mạnh.

Từ khóa: bệnh teo cơ tủy, chẩn đoán trước chuyển phôi, mất đồng hợp exon 7 gen SMNt, tế bào phôi.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

SMA là bệnh thần kinh cơ di truyền lặn do đột biến gen SMNt nằm trên nhiễm sắc thể số 5. Trong đó, 95% bệnh nhân bị bệnh SMA do mất đồng hợp exon 7 gen SMNt, 5% do đột biến điểm trên gen SMNt. Tỷ lệ mắc bệnh SMA là 1/10.000 trẻ đẻ sống và tần suất người mang gen trong cộng đồng là 1/50 [1, 2]. Trẻ bị bệnh SMA thường mất sớm ở lứa tuổi đi học do những biến chứng suy hô hấp. Hiện nay, phương pháp điều trị bệnh SMA rất hạn chế và giá thành quá cao đối với các gia đình có con bị bệnh trên thế giới, còn ở Việt Nam hiện chưa có thuốc điều trị mà chỉ điều trị triệu chứng là chủ yếu nên mỗi trẻ em mắc bệnh SMA ra đời là gánh nặng cho gia đình cả về tâm lý và tài chính [3]. Do vậy, vấn đề dự phòng bệnh này là rất cần thiết. Trong đó, phương pháp chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi là phương pháp dự phòng bệnh hiệu quả nhất, bởi có thể chọn được phôi lành ngay từ trước khi cấy phôi vào tử cung của người mẹ [4-9].

Sau khi xây dựng được quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh SMA, chúng tôi bước đầu ứng dụng vào chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi cho các gia đình có bố mẹ mang gen đột biến gây bệnh SMA đã sinh con bị bệnh và có nguyện vọng sinh con khỏe mạnh tại Học viện Quân y. Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu đánh giá kết quả ban đầu ứng dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh SMA.

*Tác giả liên hệ: Email: dinhtao1955@gmail.com

Đối tượng, hóa chất và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

19 mẫu máu của 6 gia đình gồm bố, mẹ là người mang gen và con bị bệnh SMA (con bị bệnh SMA đã được Viện Nhi trung ương chẩn đoán do mất đồng hợp exon 7 gen SMNt được sử dụng làm đối chứng), 33 mẫu phôi sinh thiết từ các phôi thụ tinh trong ống nghiệm phát triển đến ngày 3 và ngày 5 của các gia đình này (trong đó có gia đình SMA18 làm chẩn đoán di truyền 2 lần: lần 1 đã sinh được 1 bé khỏe mạnh, lần 2 đã chuyển phôi, đang mang thai chờ sinh). Bố, mẹ lấy 5 ml máu cho vào ống chống đông bằng EDTA, phôi ngày 3 sinh thiết 1-2 tế bào và phôi ngày 5 sinh thiết 3-5 tế bào rửa nhiều lần bằng PBS1X đặt trong ống 0,2 ml.

Hóa chất

- Hóa chất nhân toàn bộ gen: bộ kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification của Hãng Sigma.
- Hóa chất cho PCR-RFLP: PCR Reaction mix, DNA Polymerase, primers; enzym *HinfI*.
- Thiết bị: máy ly tâm văng, kính hiển vi soi nổi 32X, buồng thao tác PCR(Mỹ), máy PCR ABI 9700 (Applied biosystem), hốt ủ hóa chất (Hàn Quốc).

Initial result of using preimplantation genetic diagnosis protocol for spinal muscular atrophy disease in the Military Medical University

Dinh Tao Nguyen^{1*}, Thi Thanh Nga Nguyen¹,
Van Khoa Tran¹, Thi Hong Van Nguyen²,
Tien Sang Trieu¹, Thanh Tung Nguyen¹, Ngoc Khanh Nguyen³

¹Military Medical University

²University of Science, Vietnam National University, Hanoi

³National Hospital of Pediatrics

Received 6 September 2019; accepted 30 October 2019

Abstract:

The preimplantation genetic diagnosis protocol for spinal muscular atrophy disease in the Military Medical University was successfully built and applied from 2/2015 to 11/2019. The study was carried out on 6 couples who are carriers of the disease. DNA of carriers were isolated from the whole blood. One or two blastomere(s) was/were biopsied from 3-day or 5-day embryos of these couples, and then the whole genome of biopsied blastomeres was duplicated. PCR-RFLP and minisequencing methods were performed to detect mutations and select unaffected embryos for transfer.

Keywords: blastomere, homozygous deletions in exon 7 of the survival motor neurone (SMN) gene, preimplantation genetic diagnosis, spinal muscular atrophy.

Classification number: 3.2

Phương pháp nghiên cứu

Các bước phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA từ mẫu máu toàn phần của bố mẹ: thu mẫu máu toàn phần từ 19 người tham gia nghiên cứu, tách ADN, tiến hành kỹ thuật PCR-RFLP được xây dựng do nhóm nghiên cứu của đề tài thực hiện để phát hiện đột biến gen SMNt gây bệnh SMA.

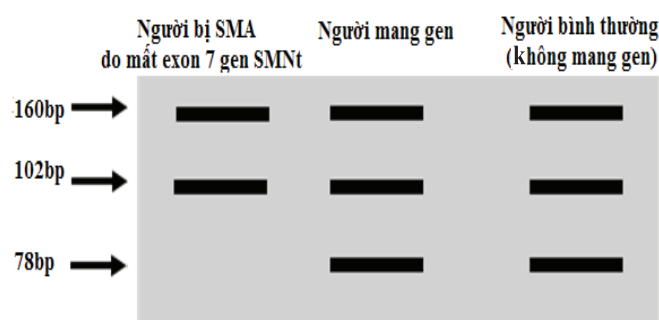
Kỹ thuật PCR-RFLP:

+ Trình tự mỗi nhân exon 7 gen SMNt:

F-5'-cttccttttattttccttacaggatt-3'

R-5'-gtaggatgtagattaacctttatct-3'

+ Chu trình nhiệt: 96°C trong 5 phút; [94°C trong 1 phút, 54°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút] x 35 chu kỳ; 72°C trong 10 phút. Ủ sản phẩm PCR với enzym *HinfI* để phân biệt exon 7 SMNt với exon 7 SMNc. Điện di gel agarose 3% kiểm tra kết quả (hình 1).



Hình 1. Hình ảnh minh họa kết quả điện di trên gel agarose 3% của exon 7 SMNt sau khi ủ với enzym *HinfI*.

Tuy nhiên, với việc chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh SMA thì điều đó vẫn chưa đủ vì SMA là bệnh di truyền lặn, nên nếu trong quá trình sinh thiết phôi hoặc thao tác kỹ thuật không tốt có thể bị nhiễm ADN từ ngoài vào (bố, mẹ hoặc kỹ thuật viên thao tác) thì sẽ chẩn đoán phôi bệnh thành phôi thường, dẫn đến hậu quả cấy chuyển phôi bệnh. Để tránh nhược điểm đó, chúng tôi lựa chọn 3 polymorphic marker D5S1977, D5S629, D5S641 để đánh giá nhiễm ADN ngoại lai bởi chúng có tính đa hình và đặc trưng cho cá thể cao nên có thể dễ dàng phân tích phôi sinh thiết được có tính di truyền từ bố và mẹ hay không. Chọn ra loại polymorphic marker dị hợp với bố, mẹ.

Các bước phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA từ tế bào phôi sinh thiết của các gia đình: nuôi phôi ngày 3 hoặc ngày 5 thì tiến hành sinh thiết; sau đó nhân toàn bộ bộ gen từ các mẫu tế bào phôi sinh thiết theo các bước hướng dẫn của bộ kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (Hãng Sigma); lấy sản phẩm sau khi tiến hành nhân toàn bộ bộ gen làm mẫu để thực hiện hai bước sau:

+ Thực hiện kỹ thuật PCR-RFLP phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA.

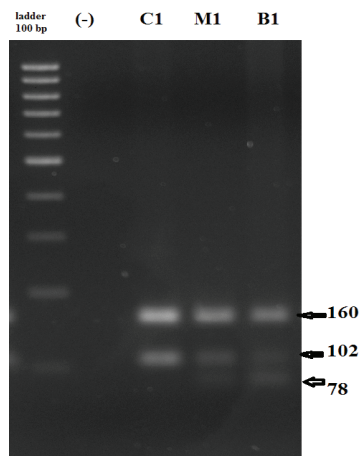
+ Nhân polymorphic marker đã chọn (đã biết dị hợp với bố mẹ) để đánh giá khả năng nhiễm ADN ngoại lai của các mẫu tế bào phôi sinh thiết.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện bằng kỹ thuật RFLP-PCR và STR cho tất cả các gia đình nghiên cứu để chẩn đoán đột biến trên phôi. Dưới đây xin minh họa kết quả cụ thể của gia đình SMA1. Các gia đình khác có kết quả tương tự được thống kê ở bảng 1.

Kết quả phát hiện đột biến gen SMNt từ máu toàn phần của bố mẹ

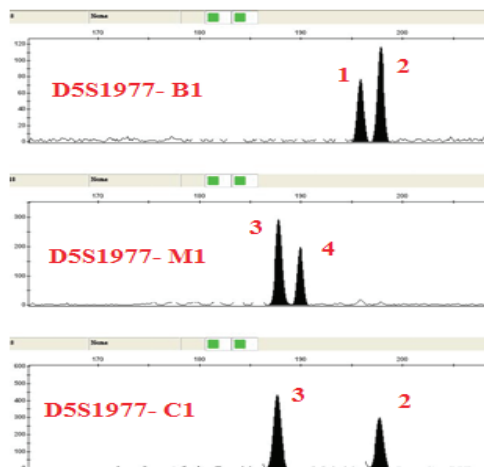
Kết quả phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA: kết quả phát hiện đột biến mất exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA bằng kỹ thuật PCR-RFLP của gia đình SMA1 thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose 3% sản phẩm nhân exon 7 gen SMNt từ máu toàn phần gia đình SMA1. B1: bố bệnh nhân 1; M1: mẹ bệnh nhân 1; C1: bệnh nhân 1.

Kết quả trên hình 2 cho thấy, con C1 chỉ có hai băng của exon 7 gen SMNc nên là người mắc bệnh SMA. Bố B1 và mẹ M1 đều có ba băng, nghĩa là họ có cả exon 7 gen SMNt và exon 7 gen SMNc, điều đó có nghĩa họ là người mang gen.

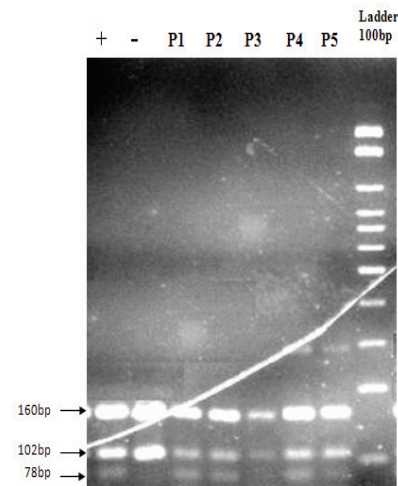
Kết quả chọn polymorphic marker dị hợp với bố, mẹ gia đình SMA1: nhân 3 polymorphic marker D5S629, D5S641, D5S1977 từ máu toàn phần gia đình SMA1. Kết quả B1 và M1 có sản phẩm nhân D5S1977 dị hợp, thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Kết quả nhân D5S1977 từ máu ngoại vi của gia đình SMA1. B1: bố 1 dị hợp với hai alen 1 và 2; M1: mẹ 1 dị hợp với hai alen 3 và 4; C1 di truyền nhận alen 3 của mẹ và alen 2 của bố.

Kết quả tiến hành trên tế bào phôi sinh thiết

Kết quả nhân gen phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA: gia đình SMA1 đã sinh thiết được 5 mẫu tế bào phôi ngày 3. Tiến hành nhân toàn bộ bộ gen theo bộ kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification của Hãng Sigma. Sau đó, tiến hành nhân gen phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt bằng kỹ thuật PCR-RFLP, kết quả thể hiện ở hình 4.



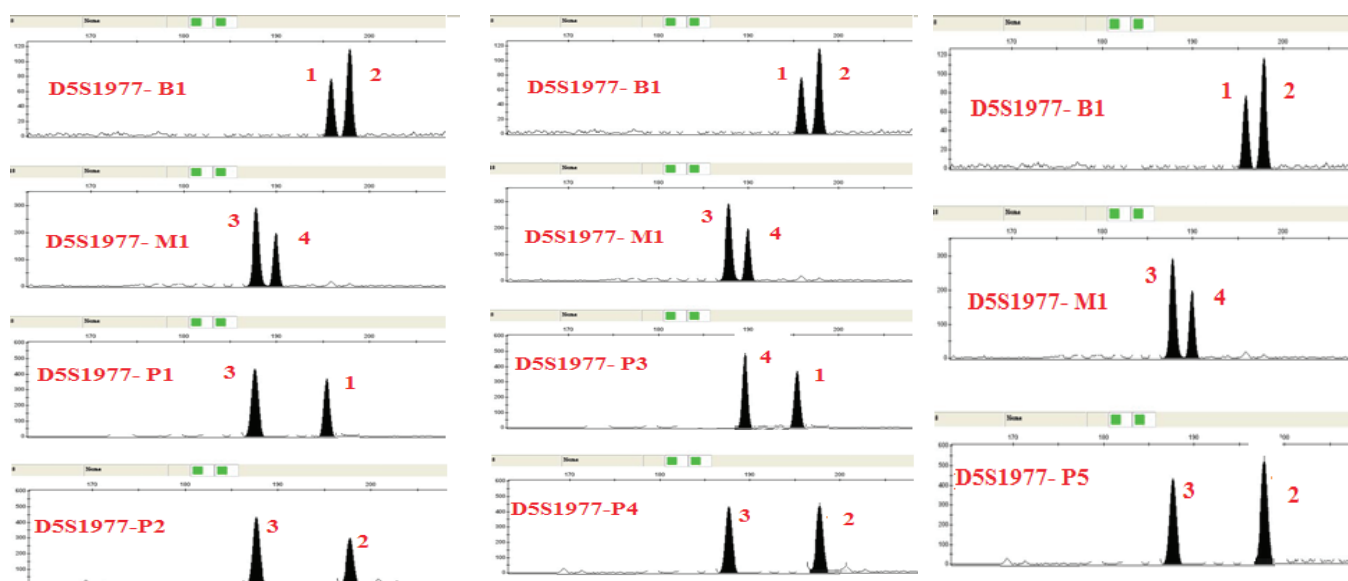
Hình 4. Kết quả điện di trên gel 3% sản phẩm nhân exon 7 gen SMNt từ tế bào phôi sinh thiết của gia đình SMA1. (+): mẫu đối chứng dương là người không bị bệnh; (-): mẫu chứng âm là người bị bệnh; P1, P2, P4, P5: phôi 1, 2, 4, 5 có cả exon 7 gen SMNt và SMNc-phôi lành; P3: phôi 3 chỉ có exon 7 gen SMNc-phôi bệnh.

Hình 4 cho thấy, trong 5 phôi của gia đình SMA1 có phôi 3 chỉ có hai băng tương ứng kích thước 160 bp và 102 bp của exon 7 gen SMNc, nghĩa là phôi 3 bị mất đồng hợp exon 7 gen SMNt nên sẽ bị bệnh SMA, còn bốn phôi còn lại (phôi 1, 2, 4, 5) có xuất hiện 3 băng nên có mặt exon 7 gen SMNt, do đó phôi sẽ phát triển bình thường, không bị bệnh SMA. Vì vậy, có phôi 1, 2, 4, 5 đủ tiêu chuẩn để chuyển vào tử cung mẹ.

Đánh giá nhiễm ADN ngoại lai của các mẫu tế bào phôi sinh thiết: nhân D5S1977 (đã chọn) từ mẫu các tế bào phôi sinh thiết của gia đình SMA1, kết quả thể hiện ở hình 5.

Hình 5 cho thấy, phôi 1 được di truyền alen 3 của mẹ và 1 của bố, phôi 2 được di truyền alen 3 của mẹ và 2 của bố, phôi 3 được di truyền alen 4 của mẹ và alen 1 của bố, phôi 4 được di truyền alen 3 của mẹ và alen 2 của bố, phôi 5 được di truyền alen 3 của mẹ và 2 của bố. Như vậy, cả 5 phôi sinh thiết được đều không bị nhiễm ADN ngoại lai. Do vậy, chọn cấy chuyển 2 phôi không bị bệnh SMA vào tử cung mẹ, kết quả M1 đã sinh được 1 em bé khỏe mạnh. Em bé sau khi ra đời được dùng mẫu dây rốn để kiểm tra lại gen SMN cho thấy bé sinh ra hoàn toàn không bị bệnh.

Thực hiện các bước tương tự với các gia đình còn lại, thu được kết quả thống kê trong bảng 1. Các gia đình SMA1, SMA2, SMA18, SMA19 được chuyển phôi sau ngày 3 (các em bé được



Hình 5. Kết quả nhân D5S1977 từ 5 mẫu tế bào phôi của gia đình SMA1. B1: bố 1 dị hợp với hai alen 1 và 2; M1: mẹ 1 dị hợp với hai alen 3 và 4; P1: phôi 1; P2: phôi 2; P3: phôi 3; P4: phôi 4; P5: phôi 5.

sinh ra khỏe mạnh, trừ gia đình SMA2 phôi không phát triển); các gia đình SMA395, SMA18_2, SMA007 được chuyển phôi sau ngày 5 (hiện đang chờ sinh).

Các gia đình đã sinh được lấy mẫu tế bào dây rốn và thực hiện lại kỹ thuật chẩn đoán trên mẫu sau sinh và cho kết quả các bé sinh ra đều không bị bệnh. Kết quả trùng khớp với mẫu phôi được chẩn đoán trước đó. Trong đó, gia đình SMA18 làm lần thứ nhất sinh được 1 bé gái khỏe mạnh; lần 2 có 6 phôi ngày 5 và chẩn đoán có 3 phôi bình thường, chuyển 1 phôi khỏe mạnh, đang chờ sinh.

Bảng 1. Kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi của các gia đình tham gia nghiên cứu.

STT	Số noãn	Phôi ngày 3	Phôi ngày 5	Phôi bình thường	Số tế bào phôi chuyển	Kết quả
SMA1	10	5		4	2	Sinh 1 em bé khỏe mạnh
SMA2	5			Phôi không phát triển		
SMA18 (lần đầu tiên)	9	4		1	1	Sinh 1 em bé khỏe mạnh
SMA19	8	3		2	2	Sinh 1 em bé khỏe mạnh
SMA395	15	13	10	5	2	Đang chờ sinh
SMA18_2 (gia đình SMA18 làm lần thứ 2)	12	9	6	3	1	Đang chờ sinh
SMA007	8	8	5	1	1	Đang chờ sinh

Kết luận

Đã xây dựng thành công quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh SMA trên các phôi thụ tinh trong ống nghiệm tại Học viện Quân y và xây dựng được quy

trình chẩn đoán bệnh SMA trên mẫu máu sau sinh.

Từ kết quả của nghiên cứu này cũng mở ra hướng áp dụng chẩn đoán trước chuyển phôi của nhiều bệnh di truyền khác trên các gia đình có tiền sử sinh con bị bệnh di truyền.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L.M. Brzustowicz, T. Lehner, L.H. Castilla, et al. (1990), "Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3", *Nature*, **344**, pp.540-541.
- [2] L. Burglen, S. Lefebvre, O. Clermont, et al. (1996), "Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene", *Genomics*, **32**, pp.479-482.
- [3] Novartis (2019), *AveXis receives FDA approval for Zolgensma®, the first and only gene therapy for pediatric patients with spinal muscular atrophy (SMA)*, <https://www.novartis.com/news/media-releases/avexis-receives-fda-approval-zolgensma-first-and-only-gene-therapy-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-sma>.
- [4] G. Daniels, et al. (2001), "Six unaffected livebirths following preimplantation diagnosis for spinal muscular atrophy", *Mol. Hum. Reprod.*, **7**(10), pp.995-1000.
- [5] J.C. Dreesen, et al. (1998), "Preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy", *Mol. Hum. Reprod.*, **4**(9), pp.881-885.
- [6] F. Fiorentino, et al. (2003), "The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders", *Mol. Hum. Reprod.*, **9**(7), pp.399-410.
- [7] A. Girardet, et al. (2008), "Efficient strategies for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy", *Fertility and Sterility*, **90**(2), pp.443.e7-443.e12.
- [8] C. Moutou, et al. (2001), "Allele - specific amplification for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of spinal muscular atrophy", *Prenatal Diagnosis*, **21**, pp.498-503.
- [9] C. Moutou, et al. (2003), "Duplex PCR for Preimplantation genetic diagnosis (PGD) of spinal muscular atrophy", *Prenatal Diagnosis*, **23**, pp.685-689.

Phân loại thể bệnh lâm sàng bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase ở bệnh nhi điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương

Trần Huy Thịnh¹, Trần Văn Khánh¹, Ngô Thị Thu Hương¹, Tạ Thành Văn¹, Vũ Chí Dũng^{1,2*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Nhi Trung ương

Ngày nhận bài 26/7/2019; ngày chuyển phản biện 30/7/2019; ngày nhận phản biện 27/8/2019; ngày chấp nhận đăng 4/9/2019

Tóm tắt:

Tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase là bệnh gây nên do đột biến gen CYP21A2, dẫn đến sự mất hoặc thiếu hụt enzym 21-hydroxylase, một enzym then chốt tham gia vào quá trình tổng hợp cortisol, hậu quả là không tổng hợp hoặc giảm tổng hợp cortisol, tăng tổng hợp testosterone, đưa đến hình ảnh lâm sàng suy thượng thận cấp, nam hóa đơn thuần ở trẻ gái và dậy thì sớm ở trẻ trai. Bệnh có biểu hiện lâm sàng đa dạng và được phân loại thành 3 thể bệnh chính: mất muối, nam hóa đơn thuần, không cổ điển. Việc phân loại thể bệnh và theo dõi đặc điểm lâm sàng ở bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán và điều trị bệnh. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xác định tỷ lệ các thể bệnh và đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu hụt enzym 21-hydroxylase. 209 bệnh nhân đã được phân tích và đánh giá đặc điểm lâm sàng tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Kết quả cho thấy, 77% bệnh nhân thể mất muối, 21% thể nam hóa đơn thuần và 2% thể không cổ điển. Bệnh nhân thể mất muối và thể không cổ điển được chẩn đoán sớm hơn (32 ngày và 18,5 ngày) so với bệnh nhân thể nam hóa đơn thuần (1.590 ngày) ($p < 0,001$). Thể bệnh mất muối có tỷ lệ nam/nữ gần tương đương nhau (nam 53,4% và nữ 46,6%). Thể nam hóa đơn thuần có tỷ lệ bệnh nhân nữ cao hơn (81,8% nữ và 18,2% nam). Mơ hồ giới tính ở bệnh nhân nữ với cả 3 thể mất muối, nam hóa đơn thuần và không cổ điển là tương đương nhau (lần lượt là 96, 97 và 100%). Con suy thượng thận cấp chỉ xuất hiện ở bệnh nhân thể mất muối với tỷ lệ ở nam là 91,8, ở nữ là 78,6%.

Từ khóa: đặc điểm lâm sàng, tăng sản thượng thận bẩm sinh, thể bệnh, 21-hydroxylase.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase là bệnh gây nên do đột biến gen CYP21A2, dẫn đến sự mất hoặc thiếu hụt enzym 21-hydroxylase, một enzym then chốt tham gia vào quá trình tổng hợp cortisol, dẫn đến hậu quả là không tổng hợp hoặc giảm tổng hợp cortisol, tăng tổng hợp testosterone, với hình ảnh lâm sàng suy thượng thận cấp, nam hóa đơn thuần ở trẻ gái và dậy thì sớm ở trẻ trai [1]. Các nghiên cứu trên thế giới đã ước tính tần suất mắc bệnh từ khoảng 1/10.000 đến 1/20.000 trẻ sinh ra [2]. Mức độ nặng của bệnh phụ thuộc vào hoạt độ enzyme 21-hydroxylase còn lại của bệnh nhân. Tùy thuộc vào biểu hiện lâm sàng và mức độ thiếu hụt enzyme mà chia ra thành 3 thể chính của tăng sản thượng thận bẩm sinh, gồm: thể mất muối, thể nam hóa đơn thuần và thể không cổ điển. Các nghiên cứu trên quần thể người châu Á đã chỉ ra thể mất muối chiếm tỷ lệ

cao nhất trong số các ca mắc tăng sản thượng thận bẩm sinh với 75%, thể nam hóa đơn thuần chiếm tỷ lệ thấp hơn (20-25%) và thể không cổ điển hiếm gặp hơn (<5%) [3].

Đối với bệnh nhân thể mất muối, thiếu hụt hoàn toàn hoạt độ enzym gây nguy hiểm đến tính mạng và tử vong do mất nước, hạ natri máu (con suy thượng thận cấp), và các trẻ gái mắc thể nặng thiếu 21-hydroxylase có biểu hiện nam hoá bộ phận sinh dục ngoài từ thời kỳ bào thai và được phát hiện ngay sau sinh. Thể nam hóa đơn thuần có các biểu hiện lâm sàng kín đáo hơn, do vậy khó phát hiện tại thời kỳ sơ sinh. Bệnh nhân nữ thể nam hóa đơn thuần có các bất thường về bộ phận sinh dục ngoài ở các mức độ khác nhau; bệnh ở trẻ nam thường có biểu hiện dậy thì sớm ngoại biên từ thời điểm 2-4 tuổi. Bệnh nhân thể cổ điển thường không có biểu hiện lâm sàng rõ rệt mà chỉ biểu hiện bất thường về các đặc điểm giới tính [4].

*Tác giả liên hệ: Email: dungvu@nch.org.vn

Classification of clinical phenotype of 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia in patients at National Hospital of Pediatrics

Huy Thinh Tran¹, Van Khanh Tran¹, Thi Thu Huong Ngo¹,
Thanh Van Ta¹, Chi Dung Vu^{1,2*}

¹Hanoi Medical University

²Vietnam National Hospital of Pediatrics

Received 26 July 2019; accepted 4 September 2019

Abstract:

21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia is a disease caused by the mutation in CYP21A2 gene, which results in the loss or deficiency of the 21-hydroxylase enzyme, a key enzyme involved in the synthesis of cortisol, and then resulting in reducing cortisol synthesis and increasing testosterone synthesis, and thereby leading to the clinical manifestations of acute adrenal failure, virilisation in girls, and early puberty in boys. The clinical manifestations of the disease is various and classified into three major disease categories: salt wasting, simple virilisation, and non-classical. Classification of disease phenotypes and clinical characteristics in patients with congenital adrenal hyperplasia is important in the diagnosis and treatment of the disease. The study aims to determine the incidence and clinical characteristics of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. 209 patients admitted to the National Children Hospital were analysed and evaluated clinically. Results showed that 77%, 21%, and 2% of patients were classified as salt wasting, simple virilisation, and non-classical, respectively. Patients in the salt wasting and non-classical groups were diagnosed earlier (32 days and 18.5 days) than those in the simple virilisation group (1,590 days) ($p < 0.001$). The proportion of males/females were nearly equal in the salt wasting group (53.4% males and 46.6% females). The simple virilisation group had a higher proportion of female patients (81.8% females and 18.2% males). The incidences of gender ambiguity in female patients in all three categories of salt wasting, simple virilisation, and non-classical were similar (96%, 97%, and 100%, respectively). Acute adrenal failure was found only in patients with salt wasting with 91.8% in males and 78.6% in females.

Keywords: classification, clinical characteristic, congenital adrenal hyperplasia, 21-hydroxylase.

Classification number: 3.2

Tiêu chuẩn để phân loại kiểu hình dựa trên các triệu chứng lâm sàng: nam hóa bộ phận sinh dục ngoài ở trẻ gái được đánh giá theo các mức độ của Prader để chẩn đoán thể cổ điển (bao gồm cả ở thể mất muối hoặc nam hóa đơn thuần). Ở thể mất muối, các bệnh nhân có các biểu hiện sụt cân hoặc chậm tăng cân sau đẻ, nôn, dấu hiệu mất nước hoặc sốc giảm thể tích, Natri huyết tương hạ < 130 mmol/l hoặc $130-135$ mmol/l, kết hợp với $K > 5,5$ mmol/l [5]. Thể nam hóa đơn thuần có biểu hiện ở nữ là mơ hồ giới tính khi sinh và ở nam là dậy thì sớm giả và tăng phát triển chiều cao, tuổi xương. Việc phân loại thể bệnh và theo dõi đặc điểm lâm sàng ở bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán và điều trị bệnh. Do vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu: nghiên cứu tỷ lệ các thể bệnh và đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu hụt enzym 21-hydroxylase.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng

209 bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh thiếu enzym 21-hydroxylase được chẩn đoán và điều trị tại Khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2014 đến 2018.

Tiêu chuẩn chẩn đoán:

- + Trẻ gái: có nam hóa được phát hiện khi sinh hoặc nam hóa sau sinh, tăng trưởng sớm chiều cao và tuổi xương.
- + Trẻ trai: dậy thì sớm giả, tăng sớm chiều cao và tuổi xương.
- + Cả hai giới: có biểu hiện mất muối những tuần đầu sau sinh: mất nước, hạ natri và clo, tăng kali huyết thanh.
- + Tăng 17-OHP huyết thanh vào lúc sáng sớm: trẻ sơ sinh ≥ 1 ng/ml (bình thường < 1 ng/ml) (P.W. Speiser và P.C. White, 2003); sau tuổi sơ sinh: ≥ 2 ng/ml.

Phương pháp

Phương pháp nghiên cứu là mô tả loạt ca bệnh.

Kiểu hình lâm sàng: được thu thập tại Khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương, mỗi bệnh nhân có hồ sơ nghiên cứu riêng: vẽ phả hệ gia đình, hỏi tiền sử, bệnh sử, khám lâm sàng toàn diện: phát hiện các triệu chứng sạm da, mất nước; khám bộ phận sinh dục ngoài, gồm: phân loại mức độ nam hóa theo Prader, đánh giá các giai đoạn dậy thì (các giai đoạn phát triển lông mu ở cả hai giới; các giai đoạn phát triển tuyến vú ở bệnh nhân

nữ; đo chiều dài và chu vi dương vật; đo thể tích tinh hoàn; phát hiện các biểu hiện khác như: giọng ồm, ria mép ở bệnh nhân nữ; cơ bắp phát triển, trứng cá ở cả hai giới).

Các xét nghiệm sinh hóa: được thực hiện tại Khoa Sinh hóa - Bệnh viện Nhi Trung ương, bệnh phẩm 2 ml máu ngoại vi chống đông bằng heparin được thu thập trước khi điều trị hormon thay thế, bao gồm: điện giải đồ huyết thanh (nồng độ Na^+ , K^+ và Cl^-) theo phương pháp điện cực chọn lọc ion gián tiếp, sử dụng máy tự động Beckman Coulter AU2700/AU 680. Định lượng các hormon ACTH, cortisol, testosterone, androstenedione được tiến hành với các kit thương mại. Định lượng 17-OHP bằng phương pháp ELISA, kit của Hãng DRG và máy đọc Elx808.

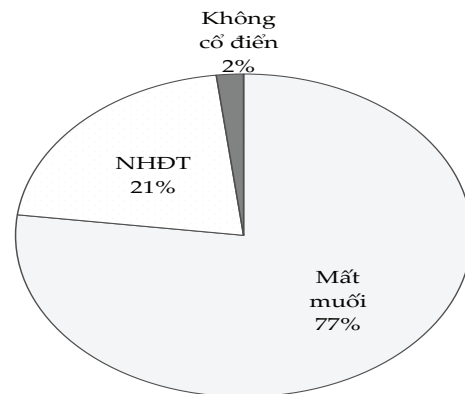
Đạo đức nghiên cứu trong y học: nghiên cứu tuân thủ tuyệt đối các quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh. Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân hoàn toàn có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tiếp tục tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân sẽ được thông báo về kết quả xét nghiệm gen để giúp cho các bác sỹ tư vấn di truyền hoặc lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

Kết quả

Trong số 209 bệnh nhân được nghiên cứu có 97 trẻ nam (46,4%) và 112 trẻ nữ (53,6%). Bệnh nhân thể mất muối và thể không cổ điển được chẩn đoán sớm hơn (32 ngày và 18,5 ngày) so với bệnh nhân thể nam hóa đơn thuần (1.590 ngày) ($p < 0,001$). Mơ hồ giới tính ở bệnh nhân nữ ở cả 3 thể mất muối, nam hóa đơn thuần và không cổ điển là tương đương nhau (lần lượt là 96, 97 và 100%). Con suy thượng thận cấp chỉ xuất hiện ở bệnh nhân thể mất muối với tỷ lệ ở nam là 91,8, ở nữ là 78,6% (bảng 1).

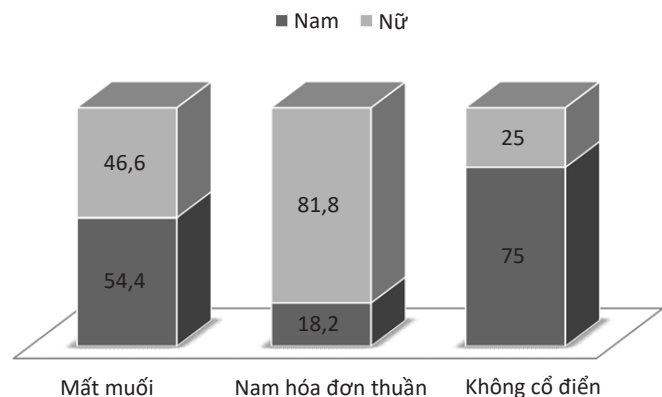
Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu (n=209).

Đặc điểm n (%)	Phân loại thể bệnh					
	Mất muối n=161		Nam hóa đơn thuần n=44		Không cổ điển n=4	
Giới tính n (%)	Nam 86 (53,4%)	Nữ 75 (46,6%)	Nam 8 (18,2%)	Nữ 36 (81,8%)	Nam 3 (75%)	Nữ 1 (25%)
P (test nhị phân)	0,4		<0,001		0,6	
Tuổi chẩn đoán (ngày) trung vị (min-max)	32 (1-4.740)		1.590 (4-11.220)		18,5 (1-570)	
P (test Kruskal-Wallis)	<0,001					
Mơ hồ giới tính	-	72 (96%)	-	35 (97%)	-	1 (100%)
Suy thượng thận cấp	79 (91,8%)	59 (78,6%)	0	0	0	0



Hình 1. Tỷ lệ các thể bệnh. NHĐT: nam hóa đơn thuần.

Hình 1 mô tả tỷ lệ các thể bệnh trong nghiên cứu. Trong đó, thể mất muối chiếm tỷ lệ cao nhất (77%), thể nam hóa đơn thuần chiếm 21% và thể không cổ điển chỉ chiếm 2%.



Hình 2. Tỷ lệ phân bố giới tính theo thể bệnh lâm sàng.

Tỷ lệ phân bố giới tính của các thể bệnh được biểu diễn ở hình 2. Thể bệnh mất muối có tỷ lệ nam/nữ gần tương đương nhau (nam 46,6% và nữ 54,4%). Thể nam hóa đơn thuần có tỷ lệ bệnh nhân nữ cao (81,8%). Thể không cổ điển có tỷ lệ bệnh nhân nữ thấp hơn (25%).

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá các đặc điểm lâm sàng và phân loại thể bệnh của các bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu enzym 21-hydroxylase. Kết quả cho thấy, thể bệnh có tỷ lệ cao nhất là thể mất muối (77%), chiếm tỷ lệ thấp hơn là thể nam hóa đơn thuần (21%) và không cổ điển (2%). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu [6-8] đánh giá trên 155 bệnh nhân tăng sản thượng thận phát hiện thể cổ điển mất muối chiếm 59,4% (92/155); thể nam hóa đơn thuần chiếm 33,5% (52/155) và không cổ điển 7,1% (11/155). Các nghiên cứu ở các chủng tộc khác [3] thì thể không cổ điển chiếm tỷ lệ cao hơn nhiều, như: Tây Ban Nha - 63,2%; Hy Lạp - 54,7% và Ý - 24,6%. Sự khác nhau này có thể do cỡ mẫu và tiêu chuẩn lựa chọn mẫu trong

ngiên cứu khác nhau và có thể liên quan tới yếu tố chủng tộc.

Tuổi chẩn đoán của bệnh nhân thể nam hóa đơn thuần (1.590 ngày), cao hơn nhiều so với bệnh nhân thể mất muối (32 ngày). Kết quả này có thể được giải thích bởi các triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân thể nam hóa đơn thuần thường kín đáo hơn và không xảy ra các cơn suy thượng thận cấp như bệnh nhân thể mất muối. Bệnh nhân thể nam hóa đơn thuần chỉ được phát hiện khi trẻ nam có các biểu hiện dậy thì sớm hoặc trẻ nữ có các bất thường bộ phận sinh dục rõ rệt hơn. Mơ hồ giới tính ở trẻ nữ được ghi nhận ở phần lớn bệnh nhân trong nghiên cứu (thể mất muối 96%, nam hóa đơn thuần 97%, không cổ điển 100%), kết quả cho thấy rằng bất kỳ mức độ ảnh hưởng nào đến hoạt độ enzyme 21-hydroxylase đều gây ảnh hưởng đến phát triển giới tính ở trẻ nữ.

Cơn suy thượng thận cấp chỉ được ghi nhận ở các bệnh nhân thể mất muối, trong đó tần suất xuất hiện ở nam cao hơn ở nữ (91,8% so với 78,6%). Điều này được lý giải do trẻ nữ thể mất muối khi sinh ra có biểu hiện sinh lý ngoài bất thường bộ phận sinh dục, do vậy sẽ được chẩn đoán sớm hơn và nhiều khả năng dự phòng được cơn suy thượng thận cấp hơn so với trẻ nam.

Tỷ lệ giới tính có sự khác biệt nhau giữa các thể bệnh, trong đó mất muối có tỷ lệ nam/nữ gần tương đương nhau (nam 53,4% và nữ 46,6%); thể nam hóa đơn thuần có tỷ lệ bệnh nhân nữ cao (81,8%) hơn so với nam (18,2%). Bệnh tăng sản thượng thận là bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường, do đó về lý thuyết tỷ lệ mắc bệnh ở nam và nữ là tương đương nhau. Giải thích cho sự chênh lệch này ở thể nam hóa đơn thuần là do trẻ nam thể nam hóa đơn thuần không có các biểu hiện lâm sàng rõ rệt ngoài dậy thì sớm, do vậy thường không được coi là bất thường và ít được tiếp cận chẩn đoán hơn so với trẻ nữ.

Kết luận

Qua nghiên cứu đặc điểm lâm sàng của 209 bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh thiếu enzym 21-hydroxylase cho thấy: phát hiện được 77% bệnh nhân mắc thể mất muối, 21% thể nam hóa đơn thuần và 2% mắc thể không cổ điển. Bệnh nhân thể mất muối và thể không cổ điển được chẩn đoán sớm hơn (32 ngày và 18,5 ngày) so với bệnh nhân thể nam hóa đơn thuần (1.590 ngày) ($p < 0,001$). Thể bệnh mất

muối có tỷ lệ nam/nữ gần tương đương nhau (nam 53,4% và nữ 46,6%). Thể nam hóa đơn thuần có tỷ lệ bệnh nhân nữ cao hơn (81,8% nữ và 18,2% nam).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Bộ Y tế: “Nghiên cứu quy trình phát hiện người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh bằng kỹ thuật sinh học phân tử” (2014-2018) và sự giúp đỡ của các cán bộ Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Bộ môn Nhi, Trường Đại học Y Hà Nội; Khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Gonçalves, A. Friães, L. Moura (2007), “Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency”, *Expert Rev. Mol. Med.*, **9**(11), pp.1-23.
- [2] P.C. White (2000), “Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency”, *Endocr. Rev.*, **21**(3), pp.245-291.
- [3] N. Krone and W. Arlt (2009), “Genetics of congenital adrenal hyperplasia”, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **23**(2), pp.181-192.
- [4] D.P. Merke and S.R. Bornstein (2005), “Congenital adrenal hyperplasia”, *The Lancet*, **365**(9477), pp.2125-2136.
- [5] J.-H. Choi, H.-Y. Jin, B.H. Lee, et al. (2012), “Clinical phenotype and mutation spectrum of the CYP21A2 gene in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency”, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **120**(1), pp.23-27.
- [6] N. Krone, A. Braun, A.A. Roscher, et al. (2000), “Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**(3), pp.1059-1065.
- [7] R. Wang, Y. Yu, J. Ye, et al. (2016), “21-hydroxylase deficiency-induced congenital adrenal hyperplasia in 230 Chinese patients: genotype-phenotype correlation and identification of nine novel mutations”, *Steroids*, **108**, pp.47-55.
- [8] K.K. Domic, Z. Grubic, T. Yuen, et al. (2017), “Molecular genetic analysis in 93 patients and 193 family members with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia”, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **165** Part A, pp.51-56.

Đánh giá kết quả cải thiện các triệu chứng thận âm hư và phục hồi vận động trên bệnh nhân đột quỵ sau 3 tháng của phác đồ phối hợp châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu, Bổ dương hoàn ngũ thang và Lục vị

Nguyễn Văn Tùng*

Khoa Y học cổ truyền, Trường Cao đẳng Y tế Khánh Hòa

Ngày nhận bài 16/9/2019; ngày chuyển phản biện 19/9/2019; ngày nhận phản biện 21/10/2019; ngày chấp nhận đăng 30/10/2019

Tóm tắt:

Đột quỵ (ĐQ) là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến mất chức năng kéo dài ở người trưởng thành. Nhiều phương pháp của y học cổ truyền (YHCT) đã được chứng minh có hiệu quả trong điều trị phục hồi sau ĐQ như châm cứu cải tiến, dùng Bổ dương hoàn ngũ thang... Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây hầu hết chỉ tập trung điều trị sau ĐQ giai đoạn sớm và chưa chú trọng điều trị hội chứng bệnh theo YHCT. Thận âm hư (TAH) là một trong các hội chứng YHCT thường gặp nhất sau ĐQ và Lục vị là một bài thuốc cổ điển thường được dùng trong điều trị hội chứng này. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu trả lời câu hỏi: nếu sử dụng bài thuốc Lục vị phối hợp với châm cứu cải tiến + vật lý trị liệu + Bổ dương hoàn ngũ thang thì mức độ cải thiện các triệu chứng TAH như thế nào, qua đó có làm tăng hiệu quả phục hồi vận động trên bệnh nhân ĐQ đến trễ sau 3 tháng thuộc hội chứng này hay không? Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2013 đến tháng 9/2019 trên 152 bệnh nhân liệt 1/2 người sau ĐQ trên 3 tháng có hội chứng TAH, được phân thành hai nhóm: nhóm 1 được điều trị phối hợp châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu và Bổ dương hoàn ngũ thang; nhóm 2 được điều trị phối hợp châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu, Bổ dương hoàn ngũ thang và Lục vị. Thời gian điều trị là 40 ngày (10 ngày/liệu trình). Kết quả cho thấy, sau điều trị, nhóm điều trị Lục vị phối hợp với châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu và Bổ dương hoàn ngũ thang có sự cải thiện các triệu chứng của TAH trong YHCT, ngoài ra còn giúp tăng chỉ số Barthel, tăng số vòng trung bình bỏ được trong 1 phút và giảm thời gian trung bình đi 10 m nhiều hơn so với nhóm không sử dụng Lục vị ($p < 0,05$). Như vậy có thể kết luận: phối hợp Lục vị với châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu và Bổ dương hoàn ngũ thang giúp cải thiện đáng kể các triệu chứng TAH và qua đó làm tăng phục hồi vận động trên bệnh nhân ĐQ đến trễ sau 3 tháng có hội chứng TAH.

Từ khóa: Bổ dương hoàn ngũ thang, châm cứu cải tiến, Lục vị, test khéo tay, thang điểm Barthel, thời gian đi bộ 10 m, vật lý trị liệu.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

ĐQ là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến mất chức năng kéo dài ở người trưởng thành trên thế giới. Kể cả khi được điều trị phục hồi chức năng (PHCN) với vật lý trị liệu và hoạt động trị liệu thì gần một nửa số bệnh nhân sống sót vẫn bị ảnh hưởng nhiều đến chức năng sống [1].

YHCT nói chung và châm cứu nói riêng đã có những đóng góp tích cực trong PHCN vận động sau ĐQ. Nhiều công bố đã cho thấy, châm cứu kết hợp vật lý trị liệu có kết quả đáng khích lệ trong phục hồi di chứng vận động của bệnh nhân sau ĐQ [2, 3], trong đó phương pháp châm cứu cải tiến đã được nghiên cứu, áp dụng nhằm nâng cao hiệu quả và rút ngắn thời gian điều trị cho bệnh nhân [2, 4, 5].

*Email: bacsytung@yahoo.com

Việc ứng dụng phương pháp châm cứu cải tiến kết hợp với vật lý trị liệu và những loại thuốc có tác dụng hành khí hoạt huyết, tăng tuần hoàn não (như Bổ dương hoàn ngũ thang đã được chứng minh có khả năng bảo vệ tế bào neuron qua nhiều cơ chế cũng như tác động lên nhiều loại tế bào khác của hệ thần kinh trung ương [6, 7]) để điều trị phục hồi các di chứng vận động của bệnh nhân sau ĐQ là điều cần thiết và rất đáng quan tâm. Theo tác giả B.B. Johansson [8], phục hồi sau ĐQ cần thiết phải có sự tham gia của nhiều chuyên khoa khác nhau để có thể hỗ trợ bệnh nhân tham gia tích cực.

Có một đặc điểm mà nhiều công trình nghiên cứu trong và ngoài nước đã ghi nhận: bệnh nhân có thời gian từ khi ĐQ đến lúc điều trị càng lâu thì khả năng phục hồi di chứng

Evaluation on the motor rehabilitation and symptom improvement of kidney yin deficiency syndrome on patients after stroke more than 3 months by combining Liu wei di huang with Bu yang huang wu tang, modified acupuncture and physiotherapy

Van Tung Nguyen*

Faculty of Traditional Medicine, Khanh Hoa Medical College

Received 16 September 2019; accepted 30 October 2019

Abstract:

Stroke is the leading cause of long-term disability in adults worldwide. Traditional medicine has been shown to make a positive contribution to motor rehabilitation after stroke such as modified acupuncture and Bu yang huang wu tang. However, the majority of studies have been carried out in patients after stroke at the early stage and have not really paid attention to treat syndromes by traditional medicine syndrome. After stroke, kidney yin deficiency syndrome is really common and often treated by a classic decoction - Liu wei di huang. This study was conducted to investigate the effectiveness of symptom improvement and motor recovery in patients after stroke more than 3 months with kidney yin deficiency by combining Liu wei di huang with Bu yang huang wu tang, modified acupuncture and physiotherapy. A multi-center, randomised controlled clinical trial was conducted from January 2013 to September 2019 on 152 patients after 3 months of stroke, who had been classified as kidney yin deficiency, divided into 2 groups: using (group 2) and not using Liu wei di huang (group 1). And both the groups received the treatment of Bu yang huang wu tang, modified acupuncture and physiotherapy for 40 days. The results exhibited that after treatment, most of the observed indexes had positive changes with statistical significance in the group 2 ($p < 0.05$). When comparing the effects between the two groups, indexes in the group 2 were improved better than that of the group 1 ($p < 0.05$). In conclusion, combining Liu wei di huang with Bu yang huang wu tang, modified acupuncture and physiotherapy could improve symptoms significantly as well as increase motor recovery in patients after stroke more than 3 months with kidney yin deficiency.

Keywords: Bu yang huang wu tang, Liu wei di huang wan, modified acupuncture, physiotherapy, the Barthel score, 10 hole test, 10 m walk test.

Classification number: 3.2

vận động càng kém, quá trình phục hồi chủ yếu chỉ xảy ra trong vòng 3 tháng đầu, sau thời gian này khả năng phục hồi không đáng kể [2-5, 9]. Tỷ lệ bệnh nhân phục hồi vận động tốt, khá (xếp loại theo điểm Barthel) bằng phương pháp châm cứu cải tiến kết hợp vật lý trị liệu ở nhóm bị ĐQ trước 3 tháng là 68,63%, gấp 3,7 lần so với nhóm sau 3 tháng, chỉ chiếm 18,63% [5]. Do vậy, việc làm thế nào để có thể tăng khả năng phục hồi di chứng vận động ở bệnh nhân bị ĐQ sau 3 tháng là mong muốn của nhiều bệnh nhân và gia đình, đồng thời cũng là thách thức đối với người thầy thuốc trong việc kết hợp giữa YHCT và y học hiện đại, vì số bệnh nhân có di chứng vận động do ĐQ sau 3 tháng đến điều trị tại các cơ sở YHCT hiện nay chiếm tỷ lệ khá cao.

Bên cạnh đó, trong điều trị YHCT, chẩn đoán hội chứng bệnh là một bước quan trọng nhằm đưa ra một liệu trình điều trị đúng và đem lại kết quả tốt trên bệnh nhân [10]. Trong đó, TAH là một trong các hội chứng lâm sàng YHCT thường gặp nhất ở bệnh nhân sau ĐQ [11-13]. Việc sử dụng Bổ dương hoàn ngũ thang trong điều trị bệnh nhân sau ĐQ, ngoài tác dụng bổ khí, hành khí, hoạt huyết, vốn đã góp phần làm giảm các triệu chứng TAH như ra mồ hôi trộm (Huỳnh kỳ), đau lưng (Xuyên khung), táo bón (Đương quy, Đào nhân), nóng về đêm, mặt má đỏ, môi khô (Địa long), mất ngủ (Địa long, Đương quy)... Tuy nhiên, nếu phối hợp thêm bài thuốc Lục vị - một trong các bài thuốc cổ điển thường dùng nhất trong điều trị hội chứng này [14-17] liệu có làm tăng thêm hiệu quả cải thiện các triệu chứng TAH hay không, vì các yếu tố này có liên quan đến cải thiện chức năng vận động sau ĐQ [18]. Câu hỏi nghiên cứu của chúng tôi là: nếu sử dụng bài thuốc Lục vị phối hợp với châm cứu cải tiến + vật lý trị liệu + Bổ dương hoàn ngũ thang thì mức độ cải thiện các triệu chứng TAH như thế nào và qua đó có làm tăng hiệu quả phục hồi vận động trên bệnh nhân ĐQ đến trễ sau 3 tháng có hội chứng TAH hay không?

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Ước tính cỡ mẫu theo công thức:

$$n = \frac{(Z_{\alpha} \sqrt{2\bar{p}(1-\bar{p})} + Z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)})^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

trong đó: Z_{α} là trị số Z của phân phối chuẩn cho xác suất $\frac{\alpha}{2}$; $\alpha = 0,05 \Rightarrow Z_{\frac{\alpha}{2}} = 1,96$; Z_{β} là trị số Z của phân phối chuẩn cho xác suất β ; $\beta = 0,1 \Rightarrow Z_{\beta} = 1,28$; $\bar{p} = \frac{p_1 + p_2}{2}$; p_1 : tỷ lệ đáp ứng điều trị trong nghiên cứu trước, $p_1 = 18,63\% \approx 0,19$ [5]; p_2 : tỷ

lệ đáp ứng điều trị mong muốn đạt được trong nghiên cứu này, $p_2=45\%=0,45$. Tính được cỡ mẫu ≥ 74 (người).

Thiết kế nghiên cứu: thử nghiệm lâm sàng, sắp xếp ngẫu nhiên, có nhóm chứng, đa trung tâm, thực hiện từ tháng 1/2013 đến tháng 9/2019 tại Cơ sở chẩn trị YHCT Thiên Nam - Khánh Hòa, Cơ sở YHCT Ngô Hành - Khánh Hòa và Phòng khám đa khoa Nhân đạo Kinh 7 - Kiên Giang.

Tiêu chuẩn chọn: tất cả bệnh nhân liệt nửa người do ĐQ sau 3 tháng có hội chứng TAH, và có các tiêu chuẩn sau: tỉnh táo, hợp tác với thầy thuốc điều trị, chỉ số Barthel ≤ 60 (nhóm trung bình, yếu và kém), không thể đi được 10 mét mà không cần dụng cụ hoặc người hỗ trợ.

Tiêu chuẩn loại trừ: liệt nửa người do chấn thương; liệt nửa người nhưng quá suy kiệt hoặc bị lở loét, viêm nhiễm nhiều, đang dùng các thuốc trong phác đồ điều trị (thuốc y học hiện đại trong phác đồ điều trị được xem là các thuốc có tác dụng tăng tuần hoàn não, thuốc YHCT trong phác đồ điều trị là Bổ dương hoàn ngũ thang, Lục vị hoặc các bài thuốc có tác dụng tương tự), hoặc bệnh nhân đã dùng nhưng thời gian ngưng thuốc chưa tới 15 ngày.

Tiêu chuẩn ngưng nghiên cứu: phát hiện tiêu chuẩn loại trừ, bệnh nhân từ chối không tiếp tục điều trị, diễn tiến nặng hơn.

Phương pháp nghiên cứu

Phân nhóm nghiên cứu: chọn 152 bệnh nhân liệt nửa người do ĐQ sau 3 tháng có đủ tiêu chuẩn chọn bệnh và tiêu chuẩn loại trừ, được bốc thăm ngẫu nhiên vào hai nhóm: nhóm 1 gồm 76 bệnh nhân liệt nửa người do ĐQ sau 3 tháng có đủ tiêu chuẩn chẩn đoán TAH [19] được điều trị bằng châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu, kết hợp với Bổ dương hoàn ngũ thang; nhóm 2 gồm 76 bệnh nhân liệt nửa người do ĐQ sau 3 tháng có đủ tiêu chuẩn chẩn đoán TAH được điều trị bằng châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu, kết hợp với Bổ dương hoàn ngũ thang và Lục vị. Các bệnh nhân được khám và theo dõi theo 1 mẫu bệnh án thống nhất. Các đánh giá và theo dõi được thực hiện sau mỗi liệu trình 10 ngày, thời gian theo dõi và điều trị liên tục trong 40 ngày (4 liệu trình).

Phương pháp phân ngẫu nhiên: những bệnh nhân có đủ tiêu chuẩn chẩn đoán TAH được phân ngẫu nhiên vào 2 nhóm. Phương pháp phân ngẫu nhiên đơn được sử dụng, 152 số được ghi sẵn từ 1 đến 152 và bỏ vào bì thư kín. Các bệnh nhân bốc thăm ngẫu nhiên, bệnh nhân bốc thăm số lẻ được xếp vào nhóm 1, bệnh nhân bốc thăm số chẵn được xếp vào nhóm 2.

Châm cứu cải tiến: chọn huyệt dựa trên loại cơ hiện đang yếu liệt, trong đó các huyệt được chọn nằm trên các đường kinh ở vùng bị bệnh nhưng ở hai đầu nguyên ủy và bám tận của cơ. Sử dụng máy điện châm Thera-Pulse PB3, tần số từ 4-50 Hz, cường độ từ 2-10 mA; độ nông sâu từ 0,5-1,5 thốn, ngoại trừ Kiên Ngung (2-3 thốn) và Trật biên (3-5 thốn) tùy theo vị trí của huyệt; châm thay đổi các huyệt ở trên (không quá 20 cây/lần châm); thời gian lưu kim là 20 phút, trong đó 10 phút đầu với tần số thấp, cường độ cao (kích thích cơ), 10 phút sau với tần số cao, cường độ nhẹ (xoa bóp cơ). Mỗi ngày châm một lần, mỗi liệu trình điều trị là 10 ngày, thời gian theo dõi và điều trị liên tục 40 ngày (4 liệu trình).

Vật lý trị liệu: tùy vào tình trạng bệnh nhân mà tập thụ động hoặc chủ động, các phương pháp thực hiện bao gồm: tập vận động chân tay yếu liệt ở tư thế nằm, tư thế ngồi, vận động ở tư thế đứng để tập dồn trọng lượng lần lượt lên hai chân, tập đi với dụng cụ hỗ trợ... Mỗi lần tập 45 phút, mỗi động tác khoảng 3-5 lần, mỗi ngày tập 1 lần.

Lục vị: sử dụng thuốc chế phẩm có thành phần: Thục địa 240 mg, Hoài sơn 120 mg, Sơn thù 90 mg, Mẫu đơn bì 90 mg, Trạch tả 90 mg, Phục linh 90 mg cho mỗi viên nang; liều dùng: ngày uống 3 lần, mỗi lần 2 viên.

Bổ dương hoàn ngũ thang: sử dụng thuốc chế phẩm có thành phần: Huỳnh kỳ 12 g, Đương quy 11 g, Xuyên khung 9 g, Xích thược 9 g, Hồng hoa 7 g, Đào nhân 7 g, Địa long 3,5 g; liều dùng: ngày uống 3 lần, mỗi lần uống 15 viên.

Các chỉ số theo dõi:

- Đánh giá hiệu quả cải thiện các triệu chứng của TAH dựa vào sự thay đổi tỷ lệ các triệu chứng có trong 3 hội chứng: Thần kinh kích thích (gồm 7 triệu chứng: nhức đầu, đầu choáng, mất hoa, mất ngủ, bứt rứt, kinh hải, hồi hộp), Tăng quá trình dị hóa (gồm 11 triệu chứng: nóng về đêm, mạch tế sác, lòng bàn tay chân nóng, mồ hôi trộm, mặt má đỏ, môi khô, lưỡi ráo, lưỡi đỏ, khô miệng, táo bón, tiểu sền), Suy kém nuôi dưỡng (gồm 3 triệu chứng: gầy yếu, đau lưng, răng lung lay) [19]. Bệnh nhân có đủ tiêu chuẩn chẩn đoán TAH khi có đủ 3 hội chứng trên và mỗi hội chứng phải có ít nhất 2 triệu chứng.

- Đánh giá sự PHCN vận động dựa theo thang điểm 10 chức năng Barthel, đánh giá PHCN vận động của tay liệt dựa theo bảng theo dõi Test khéo tay, đánh giá PHCN vận động của chân liệt dựa theo bảng theo dõi thời gian bệnh nhân đi được 10 m có hoặc không có dụng cụ hỗ trợ.

- Việc theo dõi và đánh giá được tiến hành sau mỗi liệu

trình điều trị 10 ngày và liên tục 4 liệu trình (40 ngày).

Định nghĩa các biến số:

- Test khéo tay: khả năng bệnh nhân sử dụng tay bị yếu liệt bỏ vòng vào cột, không có bất kỳ sự trợ giúp nào. Đánh giá bằng cách đếm số vòng bệnh nhân bỏ được vào các cột trong 1 phút. Bệnh nhân làm được Test khéo tay là bỏ được ít nhất từ 1 vòng trở lên.

- Thời gian bệnh nhân đi 10 m (có hoặc không có dụng cụ hỗ trợ): là thời gian bệnh nhân tự mình đi được 10 m, không có bất kỳ sự hỗ trợ nào hoặc có sử dụng dụng cụ hỗ trợ như gậy, khung tập đi.

Xử lý số liệu: dùng phần mềm STATA để phân tích kết quả. Trong phần nghiên cứu kết quả trước và sau điều trị, phương pháp thống kê áp dụng là phép kiểm định t bất cặp so sánh trung bình và độ lệch chuẩn, kiểm định z so sánh sự khác biệt tỷ lệ trước và sau điều trị. Các kiểm định chi bình phương, kiểm định Fisher, kiểm định t với phương sai bằng nhau hoặc phương sai không bằng nhau so sánh sự khác biệt giữa 2 nhóm.

Nghiên cứu đã được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh, theo Quyết định số 412/ĐHYD-HĐĐĐ.

Kết quả nghiên cứu

Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Tuổi trung bình của nhóm 1 là 61,1±8,5, nhỏ nhất là 45 và lớn nhất là 83 tuổi. Tuổi trung bình của nhóm 2 là 60,3±9,7, nhỏ nhất là 39 và lớn nhất là 82 tuổi. Tuổi trung bình giữa hai nhóm khác biệt không ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Số lượng nam nhiều hơn nữ ở cả hai nhóm. Nhóm 1, nam nhiều hơn nữ là 20 người (hơn 26,4%) và nhóm 2 là 16 người (hơn 21%). Số lượng nam nữ giữa hai nhóm khác nhau không ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Hầu hết bệnh nhân có bệnh kèm theo, trong đó bệnh lý gặp nhiều nhất là tăng huyết áp, tiếp theo là các bệnh lý xơ vữa động mạch, đái tháo đường và ít nhất là thiếu máu cơ tim. So sánh bệnh kèm theo giữa hai nhóm khác biệt không ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Về đặc điểm ĐQ, đa số bệnh nhân không có hôn mê, thời gian hôn mê thường <24 giờ, thời gian ĐQ 3-6 tháng chiếm chủ yếu và đa số là ĐQ lần 1. So sánh sự chênh lệch số lượng bệnh nhân trong các biến giữa hai nhóm ghi nhận kết quả khác biệt không ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Hiệu quả cải thiện bệnh cảnh TAH

Bảng 1. Hiệu quả cải thiện bệnh cảnh TAH qua các liệu trình điều trị của nhóm 1 (không sử dụng Lục vị).

Số BN có biểu hiện triệu chứng/bệnh cảnh TAH	Trước điều trị		Sau điều trị 10 ngày		Sau điều trị 20 ngày		Sau điều trị 30 ngày		Sau điều trị 40 ngày	
	N	p	N	p	N	p	N	p	N	p
<i>Hội chứng thần kinh kích thích</i>	76		76		76		75	0,316	71	0,023
Nhức đầu	58		56	0,708	46	0,036	32	<0,001	28	<0,001
Đau chói	43		42	0,870	34	0,144	31	0,052	32	0,074
Mất hoa	42		41	0,871	31	0,074	24	0,003	23	0,002
Mất ngủ	62		61	0,837	59	0,546	56	0,243	53	0,089
Bứt rứt	57		58	0,850	51	0,283	44	0,026	42	0,011
Kinh hải	9		7	0,597	5	0,262	0	0,002	0	0,002
Hồi hộp	15		13	0,676	10	0,274	6	0,034	4	0,007
<i>Hội chứng tăng quá trình dị hóa</i>	76		76		76		75	0,316	74	0,155
Nóng về đêm	50		48	0,735	44	0,316	41	0,136	37	0,033
Mạch tẻ sắc	34		34	1,000	34	1,000	33	0,870	31	0,623
Lòng bàn tay chân nóng	26		26	1,000	26	1,000	26	1,000	23	0,603
Mồ hôi trộm	16		14	0,684	11	0,289	7	0,042	7	0,042
Mặt má đỏ	28		21	0,224	11	0,002	8	<0,001	8	<0,001
Môi khô	46		42	0,511	27	0,002	22	<0,001	22	<0,001
Lưỡi ráo	30		28	0,738	28	0,738	25	0,399	20	0,084
Lưỡi đỏ	51		51	1,000	49	0,732	48	0,610	47	0,498
Khô miệng	38		34	0,516	27	0,071	17	<0,001	16	<0,001
Táo bón	53		52	0,861	46	0,234	43	0,093	34	0,002
Tiểu sền	20		20	1,000	20	1,000	18	0,708	16	0,445
<i>Hội chứng suy kém nuôi dưỡng</i>	76		75	0,316	70	0,012	67	0,002	59	<0,001
Gầy yếu	48		48	1,000	46	0,738	44	0,507	41	0,249
Đau lưng	70		69	0,772	66	0,290	61	0,034	55	0,002
Răng lung lay	38		38	1,000	38	1,000	41	0,626	40	0,746
<i>Bệnh cảnh TAH</i>	76		75	0,316	70	0,012	66	0,001	56	<0,001

Kiểm định z so sánh sự khác biệt tỷ lệ trước và sau can thiệp.

Bảng 1 cho thấy, sau 40 ngày điều trị, có 12/21 triệu chứng thuyên giảm có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Trong đó, ở hội chứng Thần kinh kích thích giảm 5/7 triệu chứng (nhức đầu, mất hoa, bứt rứt, kinh hải và hồi hộp); hội chứng Tăng quá trình dị hóa giảm 6/11 triệu chứng (nóng về đêm, mồ hôi trộm, mặt má đỏ, môi khô, khô miệng và táo bón); hội chứng Suy kém nuôi dưỡng giảm 1/3 triệu chứng (đau lưng). Hội chứng Thần kinh kích thích giảm từ 76 xuống còn 71 trường hợp, hội chứng Suy kém nuôi dưỡng giảm từ 76 xuống còn 59 trường hợp, sự thuyên giảm của 2 hội chứng này trước và sau 40 ngày điều trị có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Bệnh cảnh TAH giảm 20 trường hợp (từ 76 xuống còn 56), sự khác biệt trước và sau điều trị của bệnh cảnh TAH có ý nghĩa thống kê ($p<0,001$).

Bảng 2. Hiệu quả cải thiện bệnh cảnh TAH qua các liệu trình điều trị của nhóm 2 (có sử dụng Lục vi).

Số BN có biểu hiện triệu chứng/bệnh cảnh TAH	Trước điều trị	Sau điều trị 10 ngày		Sau điều trị 20 ngày		Sau điều trị 30 ngày		Sau điều trị 40 ngày	
	N	N	p	N	p	N	p	N	p
Hội chứng thần kinh kích thích	76	76		72	0,043	56	<0,001	35	<0,001
Nhức đầu	59	55	0,454	42	0,004	23	<0,001	15	<0,001
Đau choáng	45	38	0,254	24	<0,001	16	<0,001	13	<0,001
Mất hoa	41	31	0,104	19	<0,001	13	<0,001	13	<0,001
Mất ngủ	68	67	0,797	58	0,031	49	<0,001	37	<0,001
Bứt rứt	62	59	0,546	51	0,041	39	<0,001	27	<0,001
Kính hải	11	11	1,000	8	0,462	1	0,003	0	<0,001
Hồi hộp	16	12	0,403	6	0,021	2	<0,001	2	<0,001
Hội chứng tăng quá trình dị hóa	76	76		70	0,012	56	<0,001	48	<0,001
Nóng về đêm	52	45	0,237	33	0,002	19	<0,001	13	<0,001
Mạch tế sắc	37	34	0,626	31	0,328	25	0,048	24	0,034
Lòng bàn tay chân nóng	21	21	1,000	15	0,252	10	0,027	9	0,015
Mồ hôi trộm	19	20	0,853	13	0,233	9	0,036	7	0,010
Mặt má đỏ	22	14	0,127	8	0,004	4	<0,001	4	<0,001
Môi khô	42	40	0,745	29	0,035	17	<0,001	16	<0,001
Lưỡi ráo	38	34	0,516	25	0,032	17	<0,001	8	<0,001
Lưỡi đỏ	58	56	0,708	46	0,036	37	<0,001	37	<0,001
Khô miệng	39	36	0,627	19	<0,001	7	<0,001	5	<0,001
Táo bón	52	51	0,862	42	0,095	17	<0,001	9	<0,001
Tiểu sền	21	19	0,713	15	0,252	12	0,077	11	0,047
Hội chứng suy kém nuôi dưỡng	76	71	0,023	60	<0,001	39	<0,001	29	<0,001
Gầy yếu	41	41	1,000	38	0,626	29	0,051	27	0,022
Đau lưng	72	67	0,147	57	<0,001	42	<0,001	33	<0,001
Răng lung lay	44	44	1,000	44	1,000	44	0,870	43	0,870
Bệnh cảnh TAH	76	71	0,023	56	<0,001	32	<0,001	20	<0,001

Kiểm định z so sánh sự khác biệt tỷ lệ trước và sau can thiệp.

Bảng 2 cho thấy, sau 40 ngày điều trị, có 20/21 triệu chứng thuyên giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ngoại trừ triệu chứng răng lung lay (thuộc hội chứng Suy kém nuôi dưỡng). Cả 3 hội chứng Thần kinh kích thích, Tăng quá trình dị hóa và Suy kém nuôi dưỡng đều thuyên giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Bệnh cảnh TAH giảm 56 trường hợp (từ 76 xuống còn 20), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Bảng 3. So sánh hiệu quả cải thiện bệnh cảnh TAH qua các liệu trình điều trị của nhóm 1 (N1) và nhóm 2 (N2).

Số BN có biểu hiện triệu chứng/bệnh cảnh TAH	Trước điều trị		Sau điều trị 10 ngày			Sau điều trị 20 ngày			Sau điều trị 30 ngày			Sau điều trị 40 ngày		
	N1	N2	N1	N2	p	N1	N2	p	N1	N2	p	N1	N2	p
Hội chứng thần kinh kích thích	76	76	76	76		76	72	0,12*	75	56	<0,001	71	35	<0,001
Nhức đầu	58	59	56	55	0,855	46	42	0,511	32	23	0,129	28	15	0,019
Đau choáng	43	45	42	38	0,516	34	24	0,095	31	16	0,008	32	13	0,001
Mất hoa	42	41	41	31	0,104	31	19	0,038	24	13	0,038	23	13	0,056
Mất ngủ	62	68	61	67	0,182	59	58	0,847	56	49	0,219	53	37	0,008
Bứt rứt	57	62	58	59	0,847	51	51	1,000	44	39	0,415	42	27	0,015
Kính hải	9	11	7	11	0,315	5	8	0,384	0	1	1,000*	0	0	
Hồi hộp	15	16	13	12	0,827	10	6	0,290	6	2	0,276*	4	2	0,681*
Hội chứng tăng quá trình dị hóa	76	76	76	76		76	70	0,028*	75	56	<0,001	74	48	<0,001
Nóng về đêm	50	52	48	45	0,618	44	33	0,074	41	19	<0,001	37	13	<0,001
Mạch tế sắc	34	37	34	34	1,000	34	31	0,623	33	25	0,182	31	24	0,237
Lòng bàn tay chân nóng	26	21	26	21	0,380	26	15	0,044	26	10	0,002	23	9	0,005
Mồ hôi trộm	16	19	14	20	0,243	11	13	0,656	7	9	0,597	7	7	1,000
Mặt má đỏ	28	22	21	14	0,177	11	8	0,462	8	4	0,229	8	4	0,229
Môi khô	46	42	42	40	0,745	27	29	0,737	22	17	0,353	22	16	0,261
Lưỡi ráo	30	38	28	34	0,322	28	25	0,610	25	17	0,147	20	8	0,012
Lưỡi đỏ	51	58	51	56	0,374	49	46	0,615	48	37	0,072	47	37	0,103
Khô miệng	38	39	34	36	0,745	27	19	0,158	17	7	0,026	16	5	0,010
Táo bón	53	52	52	51	0,862	46	42	0,511	43	17	<0,001	34	9	<0,001
Tiểu sền	20	21	20	19	0,853	20	15	0,335	18	12	0,221	16	11	0,289
Hội chứng suy kém nuôi dưỡng	76	76	75	71	0,209*	70	60	0,021	67	39	<0,001	59	29	<0,001
Gầy yếu	48	41	48	41	0,249	46	38	0,192	44	29	0,015	41	27	0,022
Đau lưng	70	72	69	67	0,597	66	57	0,063	61	42	0,001	55	33	<0,001
Răng lung lay	38	44	38	44	0,329	38	44	0,329	41	44	0,624	40	43	0,625
Bệnh cảnh TAH	76	76	75	71	0,209*	70	56	0,003	66	32	<0,001	56	20	<0,001

*Kiểm định Fisher.

Bảng 3 cho thấy, sau 10 ngày điều trị, không có sự khác biệt về tỷ lệ các triệu chứng của bệnh cảnh TAH giữa nhóm 1 và nhóm 2 ($p > 0,05$). Sự cải thiện của 3 hội chứng Thần kinh kích thích, Tăng quá trình dị hóa, Suy kém nuôi dưỡng và tỷ lệ bệnh cảnh TAH giữa nhóm 1 và nhóm 2 cũng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Sau 20 ngày điều trị, chỉ có 2/21 triệu chứng có sự khác biệt giữa nhóm 1 và nhóm 2 là mắt hoa và lòng bàn tay chân nóng ($p < 0,05$). Sự cải thiện hội chứng Tăng quá trình dị hóa, Suy kém nuôi dưỡng và tỷ lệ bệnh cảnh TAH giữa nhóm 1 và nhóm 2 khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Sau 30 ngày điều trị, có 8/21 triệu chứng có sự khác biệt giữa nhóm 1 và nhóm 2 ($p < 0,05$). Trong đó, ở hội chứng Thần kinh kích thích khác biệt 2/7 triệu chứng (đầu choáng và mất ngủ); hội chứng Tăng quá trình dị hóa khác biệt 4/11 triệu chứng (nóng về đêm, lòng bàn tay chân nóng, khô miệng và táo bón); hội chứng Suy kém nuôi dưỡng khác biệt 2/3 triệu chứng (gầy yếu và đau lưng). Sự cải thiện của 3 hội chứng Thần kinh kích thích, Tăng quá trình dị hóa, Suy kém nuôi dưỡng và tỷ lệ bệnh cảnh TAH giữa nhóm 1 và nhóm 2 khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

- Sau 40 ngày điều trị, có đến 12/21 triệu chứng có sự khác biệt giữa nhóm 1 và nhóm 2 ($p < 0,05$), ngoại trừ các triệu chứng mắt hoa và hồi hộp (thuộc hội chứng Thần kinh kích thích), các triệu chứng mạch tể sắc, mờ hồi trộm, mặt má đỏ, môi khô, lưỡi đỏ, tiểu sền (thuộc hội chứng Tăng quá trình dị hóa) và triệu chứng răng lung lay (thuộc hội chứng Suy kém nuôi dưỡng). Sự cải thiện của 3 hội chứng này và tỷ lệ bệnh cảnh TAH giữa nhóm 1 và nhóm 2 đều khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Hiệu quả cải thiện vận động dựa vào tỷ lệ tốt + khá theo xếp loại Barthel

Bảng 4. Hiệu quả điều trị dựa vào tỷ lệ tốt + khá theo xếp loại Barthel.

Xếp loại Barthel	Chung (n=152)		Nhóm 1 (n=76)		Nhóm 2 (n=76)		Giá trị p
	N	%	N	%	N	%	
Tốt + khá	73	48,1	31	40,8	42	55,3	0,074
Không đạt	79	51,9	45	59,2	34	44,7	

Kiểm định Chi bình phương.

Bảng 4 cho thấy, trước điều trị tất cả bệnh nhân đều có chỉ số Barthel ≤ 60 (xếp loại trung bình, yếu và kém). Sau 40 ngày điều trị, tỷ lệ bệnh nhân đạt tốt + khá theo xếp loại Barthel ở cả 2 nhóm đều tăng lên, trong đó nhóm 2 tăng lên 42 người (tăng 55,3%), nhóm 1 chỉ tăng 31 người (tăng 40,8%). Tuy nhiên, sự khác biệt về tỷ lệ đạt tốt + khá theo xếp loại Barthel giữa nhóm 1 và nhóm 2 không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Hiệu quả cải thiện vận động dựa vào chỉ số Barthel, Test khéo tay, thời gian đi 10 m

Bảng 5. Hiệu quả điều trị dựa vào chỉ số Barthel, Test khéo tay, thời gian đi 10 m.

	Chung (n=152)		Nhóm 1 (n=76)		Nhóm 2 (n=76)		Giá trị p
	TB	ĐLC	TB	ĐLC	TB	ĐLC	
<i>Chỉ số Barthel</i>							
Trước điều trị	40,5	13,3	40,3	13,1	40,7	13,7	0,832*
Liệu trình 1	46,8	15,6	44,9	14,6	48,7	16,4	0,138*
Liệu trình 2	53,8	16,9	51,2	15,9	56,3	17,6	0,061*
Liệu trình 3	59,1	18,0	55,7	17,1	62,5	18,4	0,02*
Liệu trình 4	62,4	18,4	58,4	17,8	66,4	18,2	0,007*
Giá trị p	<0,001***		<0,001***		<0,001***		
<i>Test khéo tay</i>							
Trước điều trị	0,76	1,48	0,64	1,33	0,88	1,61	0,325*
Liệu trình 1	1,76	2,85	1,32	2,54	2,20	3,08	0,056*
Liệu trình 2	3,22	4,66	2,37	3,89	4,08	5,20	0,023**
Liệu trình 3	4,80	6,44	3,5	5,19	6,11	7,29	0,012**
Liệu trình 4	6,16	7,62	4,55	6,12	7,78	8,62	0,009**
Giá trị p	<0,001***		<0,001***		<0,001***		
<i>Thời gian đi 10 m (giây)</i>							
Trước điều trị	78,61	19,61	78,95	19,56	78,26	19,95	0,883*
Liệu trình 1	68,48	24,34	69,51	25,35	67,53	23,63	0,709*
Liệu trình 2	56,53	21,09	58,64	22,60	54,62	19,67	0,356*
Liệu trình 3	46,94	23,76	49,23	21,10	44,91	25,98	0,366*
Liệu trình 4	37,70	17,59	42,92	21,15	33,05	12,07	0,005**
Giá trị p	<0,001***		<0,001***		<0,001***		

TB: trung bình, ĐLC: độ lệch chuẩn; *: kiểm định t với phương sai bằng nhau; **: kiểm định t với phương sai không bằng nhau; ***: kiểm định t bất cặp so sánh trước và sau điều trị.

Bảng 5 cho thấy, sau 4 liệu trình điều trị, chỉ số Barthel ở cả 2 nhóm đều tăng có ý nghĩa thống kê, cụ thể từ $40,3 \pm 13,1$ tăng lên $58,4 \pm 17,8$ ở nhóm 1 và từ $40,7 \pm 13,7$ lên $66,4 \pm 18,2$ ở nhóm 2 ($p < 0,001$). Trước điều trị, chỉ số Barthel giữa hai nhóm khác nhau không ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), nhưng sau liệu trình 4, chỉ số Barthel ở nhóm 2 tăng 25,7 điểm trong khi nhóm 1 chỉ tăng 18,1 điểm, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Đối với Test khéo tay, sau 4 liệu trình điều trị, số vòng bỏ được trong 1 phút tăng từ $0,64 \pm 1,33$ lên $4,55 \pm 6,12$ vòng ở nhóm 1, và từ $0,88 \pm 1,61$ lên $7,78 \pm 8,62$ vòng ở nhóm 2 ($p < 0,001$). So sánh số vòng bỏ được trong 1 phút giữa hai nhóm, trước điều trị số vòng bỏ được trong 1 phút ở hai nhóm tương đương, và khi kết thúc điều trị, số vòng trung bình bỏ được trong 1 phút ở nhóm 2 tăng 6,9 vòng trong khi nhóm 1 chỉ tăng 3,91 vòng ($p < 0,05$).

Sau 4 liệu trình điều trị, thời gian trung bình đi 10 m đều giảm ở cả 2 nhóm, cụ thể giảm từ $78,95 \pm 19,56$ còn $42,92 \pm 21,15$ giây ở nhóm 1, và từ $78,26 \pm 19,95$ còn $33,05 \pm 12,07$ giây ở nhóm 2 ($p < 0,001$). So sánh giữa hai nhóm, có thể thấy trước can thiệp thời gian trung bình đi được 10 m ở hai nhóm tương đương, và sau điều trị thời gian trung bình ở nhóm 2 giảm 45,21 giây trong khi nhóm 1 chỉ giảm 36,03 giây ($p < 0,05$).

Bàn luận

Về đặc điểm của mẫu nghiên cứu

So sánh những đặc điểm về mẫu nghiên cứu của chúng tôi với những nghiên cứu trước đây có sử dụng phương thức trị liệu tương đối giống (gồm châm cứu cải tiến kết hợp vật lý trị liệu và thuốc hỗ trợ YHCT), chúng tôi thấy những đặc điểm này là tương tự nhau, chỉ có một điểm khác biệt là thời gian đến điều trị sau khi ĐQ trễ hơn đáng kể.

Về hiệu quả điều trị hội chứng TAH

Chẩn đoán hội chứng bệnh đóng vai trò quan trọng trong YHCT, giúp người thực hành lâm sàng đưa ra phương pháp can thiệp đúng và tăng cá thể hóa điều trị [10, 20]. Nhiều bằng chứng cho thấy TAH là một trong các hội chứng thường gặp và có mối liên quan đến một số bệnh lý như trầm cảm, sa sút trí tuệ... sau ĐQ [6, 11-13]. Theo khảo sát của nhóm tác giả Chang và cộng sự [6], Lục vị địa hoàng là một trong 10 bài thuốc sử dụng nhiều nhất trong điều trị phục hồi sau ĐQ tại Đài Loan, đặc biệt trên bệnh nhân có đái tháo đường. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu chỉ tập trung vào các chỉ số cải thiện theo y học hiện đại như Barthel, các test vận động tay, test đi bộ... mà chưa tập trung vào nghiên cứu sự cải thiện các triệu chứng theo YHCT - một trong những yếu tố có liên quan trong cải thiện chất lượng sống của bệnh nhân.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các triệu chứng của TAH được phân ra thành 3 hội chứng, gồm Thần kinh kích thích, Tăng quá trình dị hóa và Suy kém nuôi dưỡng. Trong đó, hầu hết các triệu chứng sau can thiệp ở nhóm sử dụng Lục vị giảm có ý nghĩa thống kê (trừ triệu chứng răng lung lay) ($p < 0,05$), trong khi nhóm không sử dụng Lục vị chỉ giảm 12/21 triệu chứng ($p < 0,05$).

So sánh hiệu quả cải thiện các triệu chứng ở hai nhóm, chúng tôi thấy số triệu chứng ở nhóm có sử dụng Lục vị giảm nhiều hơn so với nhóm không sử dụng Lục vị, cụ thể là các triệu chứng nhức đầu, mất ngủ, bứt rứt, hồi hộp ở hội chứng Thần kinh kích thích; triệu chứng nóng về đêm, lòng bàn tay bàn chân nóng, lưỡi ráo, khô miệng, táo bón ở hội chứng Tăng quá trình dị hóa; và triệu chứng gầy yếu, đau lưng ở hội chứng Suy kém nuôi dưỡng ($p < 0,05$).

Do vậy, có thể thấy sử dụng phối hợp các phương pháp châm cứu cải tiến, Bổ dương hoàn ngũ thang và vật lý trị liệu vẫn có thể giúp cải thiện các triệu chứng của TAH, việc cải thiện này có lẽ nhờ vào tác dụng của một số vị thuốc trong Bổ dương hoàn ngũ thang (như đã trình bày trên đây) cũng như tác dụng kép của một số huyệt trong kỹ thuật châm cứu cải tiến. Tuy nhiên, việc bổ sung thêm bài thuốc Lục vị trong điều trị sẽ làm tăng đáng kể hiệu quả này.

Về hiệu quả phục hồi vận động ở bệnh nhân ĐQ đến trễ sau 3 tháng

Phục hồi sau đột quỵ cần thiết phải có sự tham gia của nhiều chuyên khoa khác nhau để có thể hỗ trợ bệnh nhân một cách tích cực [8]. Một trong nhiều thách thức của việc phục hồi vận động sau ĐQ là thời gian từ lúc xảy ra ĐQ đến khi người bệnh được điều trị phục hồi sớm hay trễ. Các nghiên cứu trước đây thường tập trung khảo sát việc điều trị trong giai đoạn sớm (thường là 3 tháng đầu) vì khả năng hồi phục nhiều nhất [4, 9].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy, trên các trường hợp liệt do ĐQ đến trễ sau 3 tháng điều trị với phác đồ phối hợp châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu, Bổ dương hoàn ngũ thang kèm hoặc không kèm Lục vị đều cho kết quả cải thiện tích cực. So sánh với kết quả nghiên cứu của tác giả Phan Quan Chí Hiếu và cộng sự [4] ở thời điểm sau 30 ngày điều trị, hiệu quả phục hồi vận động của những bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi kém hơn (điểm Barthel chỉ tăng thêm 15,4 ở nhóm 1 và 21,8 ở nhóm 2, trong khi nhóm so sánh là 46,08; số vòng bỏ được trong 1 phút chỉ tăng 2,86 vòng ở nhóm 1 và 5,23 ở nhóm 2, trong khi ở nhóm so sánh là 10,56; thời gian trung bình đi bộ chỉ giảm 29,72 ở nhóm 1 và 33,35 ở nhóm 2, trong khi nhóm so sánh là 38,13 giây). Điều này cũng phù hợp với đặc điểm của bệnh lý yếu liệt sau vận động. Đó là càng phục hồi sớm thì hiệu quả sẽ càng tốt hơn. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy việc phục hồi vận động vẫn có kết quả đáng khích lệ dù người bệnh đã đến trễ sau 3 tháng. Hơn nữa, có thể thấy phối hợp thêm bài thuốc Lục vị có thể tăng hiệu quả phục hồi. Điều này cũng là động lực giúp chúng tôi tiếp tục tìm hiểu trong các nghiên cứu tiếp theo như trên đối tượng bệnh nhân ĐQ đến trễ sau 6 tháng, trên 1 năm, cũng như quan sát thêm sự cải thiện các bệnh lý đi kèm như thể Đàm thấp, Thể Thận dương hư..., và một số yếu tố có liên quan đến phục hồi vận động khác.

Kết luận

Sau 40 ngày điều trị trên bệnh nhân ĐQ đến trễ sau 3 tháng có hội chứng TAH, nhóm điều trị Lục vị phối hợp với châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu và Bổ dương hoàn ngũ thang có sự cải thiện các triệu chứng của TAH trong YHCT,

ngoài ra còn giúp tăng chỉ số Barthel, tăng số vòng trung bình bỏ được trong 1 phút và giảm thời gian trung bình đi 10 m nhiều hơn so với nhóm không sử dụng bổ sung Lục vị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] L. Liu, D. Wang, K.L. Wong, Y. Wang (2011), "Stroke and stroke care in China: huge burden, significant workload, and a national priority", *Stroke*, **42**(12), pp.3651-3654.

[2] Nguyễn Thị Lina, Nguyễn Văn Tùng (2003), *Đánh giá hiệu quả thể châm trong phục hồi di chứng vận động bệnh nhân ĐQ*, Luận văn CKI, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh.

[3] Phan Quan Chí Hiếu, Đoàn Xuân Dũng (2003), *Đánh giá hiệu quả đầu châm trong PHCN vận động của bệnh nhân ĐQ*, Luận văn CKII, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh.

[4] Phan Quan Chí Hiếu, Hà Thị Hồng Linh (2005), *Hiệu quả của thể châm trong phục hồi di chứng vận động bệnh nhân ĐQ*, Luận văn thạc sỹ, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh.

[5] Phan Quan Chí Hiếu, Nguyễn Văn Tùng (2010), *Hiệu quả phục hồi vận động của châm cứu cải tiến trên bệnh nhân bị ĐQ trước và sau 3 tháng*, Luận văn thạc sỹ, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh.

[6] C.C. Chang, Y.C. Lee, C.C. Lin, C.H. Chang, C.D. Chiu, L.W. Chou, H.R. Yen (2016), "Characteristics of traditional Chinese medicine usage in patients with stroke in Taiwan: a nationwide population-based study", *Journal of Ethnopharmacology*, **186**, pp.311-321.

[7] R.L. Wei, H.J. Teng, B. Yin, Y. Xu, Y. Du, F.P. He, G.Q. Zheng (2013), "A systematic review and meta-analysis of buyang huanwu decoction in animal model of focal cerebral ischemia", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**, Doi:10.1155/2013/138484.

[8] B.B. Johansson (2011), "Current trends in stroke rehabilitation. A review with focus on brain plasticity", *Acta Neurologica Scandinavica*, **123**(3), pp.147-159.

[9] S.K. Lui & M.H. Nguyen (2018), "Elderly stroke rehabilitation: overcoming the complications and its associated challenges", *Current Gerontology and Geriatrics Research*.

[10] S.B. Su, A. Lu, S. Li, W. Jia (2012), "Evidence-based ZHENG: a traditional Chinese medicine syndrome", *Evidence-*

Based Complementary and Alternative Medicine, **2012**, Doi: 10.1155/2012/246538.

[11] T. Huang (1999), *Heart and Brain Disease of Traditional Chinese Medicine*.

[12] N.Y. Tang, C.H. Liu, H.J. Liu, T.C. Li, J.C. Liu, P.K. Chen, C.L. Hsieh (2012), "Chinese medicine patterns in patients with post-stroke dementia", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **2**(2), pp.123-128.

[13] B.-B. Zhang & Q.-S. Tang (2005), "Relationship between post-stroke depression and kidney in traditional Chinese medicine", *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, **9**, pp.166-168.

[14] X.R. Cheng, Q.I. Chun-Hui, T.X. Wang, Wen-Xia Zhou, Y.X. Zhang (2019), "Characteristics of the traditional Liu-Wei-Di-Huang prescription reassessed in modern pharmacology", *Chinese Journal of Natural Medicines*, **17**(2), pp.103-121.

[15] J.W. Kimondo, Y. Zhang, P. Zhou (2014), "Effect of kidney tonifying prescriptions-Liu wei di huang wan and Bu wei di huang wan on insulin resistance", *The Journal of Phytopharmacology*, **3**(2), pp.82-89.

[16] A.L. Lee, B.C. Chen, C.H. Mou, M.F. Sun, H.R. Yen (2016), "Association of traditional Chinese medicine therapy and the risk of vascular complications in patients with type II diabetes mellitus: a nationwide, retrospective, Taiwanese-registry, cohort study", *Medicine*, **95**(3), Doi: 10.1097/MD.0000000000002536.

[17] C.C. Liao, J.G. Lin, C.C. Tsai, H.L. Lane, T.C. Su, H.H. Wang, C.C. Shih (2012), "An investigation of the use of traditional Chinese medicine in stroke patients in Taiwan", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, Doi: 10.1155/2012/387164.

[18] A. Alawieh, J. Zhao, W. Feng (2018), "Factors affecting post-stroke motor recovery: implications on neurotherapy after brain injury", *Behavioural Brain Research*, **340**, pp.94-101.

[19] Phan Quan Chí Hiếu, Phạm Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Hồng Hoa và Bùi Chí Hiếu (1993), "Tìm hiểu về chứng thận âm hư", *Tư liệu Y học Cổ truyền Đông Phương*, **1**, tr.30-32, Trung tâm Đào tạo và nghiên cứu y dược học cổ truyền dân tộc.

[20] T.J. Chien (2018), "The concern and prospective between precision medicine and traditional Chinese medicine", *Longhua Chinese Medicine*, **1**, Doi: 10.21037/lcm.2018.09.01.

Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến việc điều chế tiểu phân nano poly-(D,L-lactid-co-glycolid) tải ethambutol

Nguyễn Thái Dương, Phạm Đình Duy*

Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 26/8/2019; ngày chuyển phân biện 29/8/2019; ngày nhận phân biện 30/9/2019; ngày chấp nhận đăng 4/10/2019

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu là thiết kế và tối ưu hóa công thức tiểu phân nano tải ethambutol. Phương pháp: thiết kế mô hình thực nghiệm Taguchi L16 (4^5) bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 10.0.7 gồm 16 thực nghiệm với 5 biến số độc lập (tỷ lệ ethambutol/poly-(D,L-lactid-co-glycolid); tỷ lệ ethyl acetat/dicloromethan; mức độ siêu âm giai đoạn 1; mức độ siêu âm giai đoạn 2; áp suất cô quay), mỗi yếu tố khảo sát 4 mức. Thông qua phân tích phương sai các biến phụ thuộc (kích thước tiểu phân trung bình; chỉ số phân tán; hiệu suất mang dược chất; khả năng tải dược chất) và sự ảnh hưởng của các biến độc lập lên biến phụ thuộc mà phần mềm đưa ra các công thức tối ưu với các chỉ số mong muốn (desirability) khác nhau. Kết quả cho thấy, phần mềm Design-Expert đã thiết lập thực nghiệm tối ưu với chỉ số mong muốn cao nhất (0,897). Các giá trị tối ưu của các biến độc lập bao gồm: tỷ lệ ethambutol/poly-(D,L-lactid-co-glycolid) là 1:1; tỷ lệ ethyl acetat/dicloromethan là 0:10; mức độ siêu âm giai đoạn 1 là 150 W; mức độ siêu âm giai đoạn 2 là 150 W; áp suất cô quay là 150 mbar. Thực nghiệm kiểm chứng ($n=3$) thu được các giá trị phân tích có tính lặp lại cao và tương đồng với các số liệu dự đoán từ phần mềm. Kết luận: các yếu tố ảnh hưởng đến việc điều chế tiểu phân nano poly-(D,L-lactid-co-glycolid) tải ethambutol được tối ưu hóa thành công với sự trợ giúp của phần mềm Design-Expert.

Từ khóa: Design-Expert, ethambutol, thuốc kháng lao, tiểu phân nano.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), lao là một trong mười nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới. Nếu chỉ xét riêng trong các bệnh truyền nhiễm, lao chiếm số ca tử vong hàng đầu. Mặc dù đã có những cải thiện đáng kể trong chăm sóc và quản lý, bệnh lao vẫn là một vấn đề sức khỏe đáng lo ngại tại Việt Nam. Phác đồ điều trị kéo dài, phức tạp và các tác dụng không mong muốn, độc tính của thuốc là những nguyên nhân dẫn đến tình trạng tái nhiễm và kháng thuốc đang ngày càng gia tăng hiện nay [1].

Giống như các thuốc kháng lao hàng thứ nhất khác, ethambutol hấp thu tốt qua đường tiêu hóa. Tuy nhiên, sự phân bố dược chất vào mô không chọn lọc, bao gồm cả phổi, thận và hồng cầu. Bên cạnh đó, quá trình đào thải ethambutol nhanh, khoảng 80% bị thải trừ qua thận trong vòng 24 giờ. Tác dụng không mong muốn cũng là một yếu tố cản trở hiệu quả điều trị của ethambutol [2]. Do đó, việc nghiên cứu các dạng bào chế thuốc kháng lao thay thế tối

ưu hơn, đặc biệt cho ethambutol là cần thiết để giải quyết những vấn đề này.

Trong nhiều năm qua, công nghệ nano được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực dược phẩm. Tiểu phân nano có khả năng cải thiện độ tan của các dược chất kém tan, làm tăng diện tích tiếp xúc của tác nhân trị liệu với môi trường sinh học. Bên cạnh đó, khả năng tích điện bề mặt của tiểu phân nano còn góp phần tăng tính kháng khuẩn thông qua việc ảnh hưởng đến điện tích màng tế bào vi khuẩn [3]. Mặt khác, tiểu phân nano còn đóng vai trò như một hệ phân phối thuốc với khả năng kiểm soát sự phóng thích dược chất theo thời gian, giúp duy trì nồng độ thuốc hằng định trong thời gian dài [4].

Nhằm góp phần xây dựng một hướng đi mới trong điều trị lao đạt hiệu quả tốt hơn, giảm thiểu nhất độc tính cho bệnh nhân, đề tài thực hiện nghiên cứu điều chế tiểu phân nano mang thuốc kháng lao ethambutol.

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

Optimisation of the factors affecting the preparation of ethambutol-loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles

Thai Duong Nguyen, Dinh Duy Pham*

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

Received 26 August 2019; accepted 4 October 2019

Abstract:

The aim of this study was to design and optimize ethambutol-loaded nanoparticles. Methods: a Taguchi L16 (4^5) experimental model was designed by Design-Expert software v.10.0.7 including 16 experiments. Five independent variables were ethambutol/poly-(D,L-lactide-co-glycolide) ratio, acetate ethyl/dichloromethane ratio, amplitude of first-stage (W), amplitude of second-stage (W), pressure of evaporation (mbar). Each independent variable was studied at four levels. Dependent variables were size, polydispersity index, entrapment efficacy, drug loading. Based on ANOVA results and the influence of independent variables on dependent variables, Design-Expert software offered optimal formulas with different desirability values. Results exhibited that, the experiment with the highest desirability value (0.897) was selected; optimized parameters of independent variables included: ethambutol/poly-(D,L-lactide-co-glycolide) ratio was 1:1; acetate ethyl/dichloromethane ratio was 0:10; amplitude of first-stage was 150 (W); amplitude of second-stage was 150 (W). Verification experiments ($n=3$) obtained highly repeatable analytical values and were similar to the predicted data from the software. Conclusion: the factors that affect the preparation of ethambutol-loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles were successfully optimised by Design-Expert software.

Keywords: anti-tuberculosis drugs, Design-Expert, ethambutol, nanoparticles.

Classification number: 3.4

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Ethambutol hydroclorid độ tinh khiết $\geq 99\%$, đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất (Sigma Aldrich, Mỹ); poly-(D,L-lactid-co-glycolid) với tỷ lệ lactid:glycolid 75:25 có M_w 76.000-115.000 (Sigma Aldrich, Mỹ); poly(vinyl alcol) thủy phân 87-90% có M_w 30.000-70.000 (Sigma Aldrich, Mỹ); natri clorid (Merck, Đức); ethyl acetat (Merck, Đức), dicloromethan (Scharlau, Tây Ban Nha), nước cất 2 lần (Việt Nam) đạt tiêu chuẩn phân tích.

Phương pháp nghiên cứu

Bào chế tiểu phân nano tải ethambutol (ETB): tiểu phân nano tải ETB được bào chế bằng phương pháp bốc hơi dung môi từ nhũ tương: poly-(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) được hòa tan trong 10 ml các dung môi khác nhau [ethyl acetat (EA); dicloromethan (DCM) hoặc hỗn hợp EA:DCM]. Nhũ hóa 1 ml dung dịch ETB (1 mg/ml) vào dung dịch trên bằng siêu âm (Topt-500, Toption Instrument, Trung Quốc) trong thời gian 1 phút ở tần số 20 kHz, mức siêu âm thay đổi tùy từng thực nghiệm (giai đoạn 1). Tiền nhũ tương được nhũ hóa tiếp trong 10 ml dung dịch chứa 1% (khối lượng/thể tích) poly(vinyl alcol) và 0,5% (khối lượng/thể tích) natri clorid bằng siêu âm trong thời gian 3 phút ở tần số 20 kHz, mức siêu âm thay đổi tùy từng thực nghiệm (giai đoạn 2). Dung môi hữu cơ được loại bằng thiết bị cô quay (Heidolph laborota 4001 efficient, Heidolph, Đức) với tốc độ 150 vòng/phút.

Thiết kế và tối ưu hóa thực nghiệm: mô hình Taguchi L16 (4^5) được thiết kế bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 10.0.7 (Stat-Ease Inc., Mỹ) gồm 16 thực nghiệm với 5 biến số độc lập gồm 4 mức (bảng 1). Các biến số phụ thuộc là những đặc tính tiêu biểu của tiểu phân nano như kích thước tiểu phân trung bình (nm), chỉ số phân tán, hiệu suất mang dược chất (%) và khả năng tải dược chất (%).

Bảng 1. Các mức của biến độc lập trong mô hình Taguchi L16 (4^5).

Biến số độc lập	Mức			
	1	2	3	4
Tỷ lệ ETB/PLGA	1:1	1:2	1:3	1:4
Tỷ lệ EA/DCM	10:0	7:3	3:7	0:10
Mức độ siêu âm với tần số 20 kHz	Giai đoạn 1 (W)	50	100	150
	Giai đoạn 2 (W)	100	150	200
Áp suất cô quay (mbar)	100	150	200	250

Phần mềm Design-Expert xác định những biến độc lập quan trọng ảnh hưởng đến từng biến phụ thuộc thông qua phân tích phương sai (ANOVA). Từ đó, phần mềm đưa ra phương trình hồi quy của các biến phụ thuộc. Thực nghiệm tối ưu được lựa chọn là thực nghiệm có chỉ số mong muốn cao nhất được đưa ra từ phần mềm Design-Expert. Việc lựa chọn dựa vào chỉ số mong muốn nhằm đảm bảo khả năng thu được thực nghiệm tối ưu cho tiểu phân nano có các tính chất gần với dự đoán nhất.

Khảo sát các tính chất của tiểu phân nano tải ethambutol:

Kích thước tiểu phân trung bình (nm) và chỉ số phân tán (polydispersity index - PDI): được xác định dựa vào cơ chế tán xạ ánh sáng động trên thiết bị ZetaPALs (Brookhaven Instruments Corporation, Mỹ). Kết quả được xác định là giá trị trung bình của 3 lần đo lặp lại. Để đạt được mật độ tiểu phân phù hợp, mẫu được pha loãng 100 lần bằng nước cất 2 lần trước khi đo. Tiến hành đo ở nhiệt độ 25°C, góc tán xạ cố định 90°.

Thế zeta: cũng được xác định trên thiết bị ZetaPALs, dựa vào cơ chế tán xạ ánh sáng điện di. Kết quả được xác định là giá trị trung bình của 3 lần đo lặp lại. Mẫu được pha loãng 50 lần bằng dung dịch KCl 0,1 M trước khi đo. Tiến hành đo ở nhiệt độ 25°C, góc tán xạ cố định 90°.

Hiệu suất mang dược chất (Entrapment efficacy - EE) và khả năng tải dược chất (Drug loading - DL): giá trị EE và DL giúp đánh giá lượng dược chất được bắt giữ vào tiểu phân nano. Các giá trị này được tính gián tiếp thông qua xác định lượng dược chất tự do. Phần dược chất không được bắt giữ vào tiểu phân nano được tách ra bằng cách rửa 2 lần với nước cất 2 lần kết hợp ly tâm 4.000 vòng/phút trong 30 phút, sử dụng ống ly tâm lọc có giới hạn trọng lượng phân tử lọc (MWCO) là 100 kDa (Pall Laboratory, Mỹ). Tiến hành tạo phức màu với đồ tía bromo cresol và định lượng bằng quang phổ UV-Vis (Beckman DU530, Beckman Instruments, Mỹ) ở bước sóng 407 nm. Các giá trị EE và DL được tính dựa vào công thức:

$$EE (\%) = \frac{\text{Tổng lượng dược chất ban đầu (mg)} - \text{lượng dược chất tự do (mg)}}{\text{Tổng lượng dược chất ban đầu (mg)}} \times 100\%$$

$$DL (\%) = \frac{\text{Tổng lượng dược chất ban đầu (mg)} - \text{lượng dược chất tự do (mg)}}{\text{Tổng lượng polymer (mg)} + \text{lượng dược chất được bắt giữ (mg)}} \times 100\%$$

Kết quả và bàn luận

Ở nghiên cứu này, mô hình thực nghiệm Taguchi L16 (4⁵) được thiết kế với 5 biến độc lập đã được đề cập như trên, các thông số còn lại được giữ cố định. Dữ liệu thực nghiệm của 16 công thức được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Dữ liệu thiết kế thực nghiệm Taguchi L16 (4⁵).

TN	A	B	C	D	E	R ₁ (n=3)	R ₂ (n=3)	R ₃	R ₄
1	1:1	3:7	150	200	200	142,37±1,46	0,49±0,10	36,26	24,79
2	1:2	3:7	200	100	150	141,30±8,07	0,50±0,07	36,26	14,73
3	1:1	10:0	50	100	100	130,47±1,67	0,67±0,08	5,88	5,08
4	1:2	10:0	100	200	250	121,53±8,91	0,41±0,12	4,86	2,26
5	1:4	3:7	100	250	100	168,00±8,40	0,17±0,03	2,39	0,58
6	1:4	7:3	150	100	250	142,70±6,94	0,22±0,05	10,09	2,40
7	1:3	3:7	50	150	250	154,17±13,27	0,24±0,09	8,08	2,54
8	1:3	0:10	100	100	200	151,37±5,75	0,47±0,10	16,67	5,10
9	1:3	7:3	200	200	100	90,73±23,38	1,05±0,15	31,03	9,10
10	1:2	7:3	50	250	200	127,47±4,68	0,36±0,13	3,33	1,56
11	1:1	0:10	200	250	250	78,07±15,21	0,90±0,64	6,02	5,19
12	1:3	10:0	150	250	150	136,43±0,91	0,31±0,05	7,14	2,25
13	1:4	0:10	50	200	150	169,60±12,08	0,31±0,05	46,46	10,18
14	1:2	0:10	150	150	100	167,10±10,05	0,49±0,15	42,84	16,94
15	1:1	7:3	100	150	150	185,73±30,49	0,99±0,06	36,67	25,00
16	1:4	10:0	200	150	200	118,67±12,20	0,61±0,03	13,72	3,24

Ghi chú: A: tỷ lệ ETB/PLGA, B: tỷ lệ EA/DCM, C: mức độ siêu âm giai đoạn 1 (W), D: mức độ siêu âm giai đoạn 2 (W), E: áp suất cô quay (mbar), R₁: kích thước tiểu phân trung bình (nm), R₂: chỉ số phân tán, R₃: hiệu suất mang dược chất (%), R₄: khả năng tải dược chất (%).

Từ dữ liệu thực nghiệm thu được (bảng 2), tiến hành phân tích phương sai nhằm xác nhận ý nghĩa thống kê của mô hình phân tích (bảng 3). Các thông số đánh giá bao gồm trị số p-value, R², R² hiệu chỉnh (Adjusted R²), R² dự đoán (Predicted R²) và độ chính xác thích hợp (Adequate precision).

Phân tích phương sai

Bảng 3. Phân tích ANOVA các biến R₁, R₂, R₃ và R₄.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Tổng hợp	0,0471	0,0010	0,0017	0,0208
A: Tỷ lệ ETB/PLGA		0,0007		0,0142
B: Tỷ lệ EA/DCM		0,0030	0,0027	
C: Mức độ siêu âm giai đoạn 1	0,0471	0,0007		0,0449
D: Mức độ siêu âm giai đoạn 2			0,0022	0,0216
E: Áp suất cô quay			0,0046	0,0200
R²	0,471	0,991	0,988	0,999
R² hiệu chỉnh	0,3396	0,9710	0,9612	0,9992
R² dự đoán	0,0608	0,8867	0,8577	N/A
Độ chính xác thích hợp	4,280	20,496	16,705	105,546

N/A: not applicable (không áp dụng).

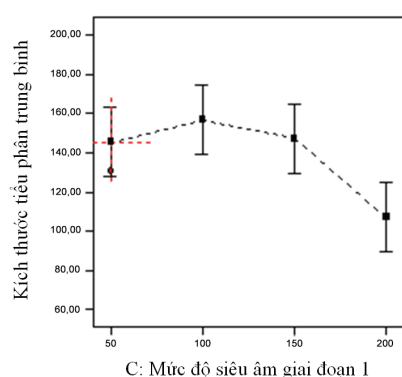
Kết quả phân tích phương sai các biến phụ thuộc được trình bày trong bảng 3. Trị số p-value <0,05 cho thấy sự ảnh hưởng có ý nghĩa về mặt thống kê của các biến độc lập lên biến phụ thuộc.

Giá trị R^2 thể hiện mối liên quan giữa sự biến thiên của biến độc lập và biến phụ thuộc. Giá trị này cho biết các biến độc lập ảnh hưởng bao nhiêu phần trăm đến sự biến thiên của biến phụ thuộc. R^2 của các biến R_2 , R_3 và R_4 đều đạt 0,99 chứng tỏ 99% sự thay đổi của các biến này là do các biến độc lập gây nên. R^2 của biến R_1 chỉ đạt 0,47 cho thấy chỉ khoảng 50% sự thay đổi kích thước tiểu phân là do biến C (mức độ siêu âm ở giai đoạn 1) gây ra, còn lại là do ảnh hưởng của các biến số ngoài mô hình và sai số ngẫu nhiên.

R^2 hiệu chỉnh cung cấp thông tin tương tự R^2 , tuy nhiên giá trị này loại trừ được ảnh hưởng của số lượng mẫu đến kết quả phân tích. Trong khi đó, R^2 dự đoán phản ánh khả năng dự đoán của mô hình. R^2 hiệu chỉnh và R^2 dự đoán lệch nhau 0,2 thì mô hình được xem là phân tích và dự đoán hợp lý. Trong các biến phụ thuộc, biến R_1 có R^2 hiệu chỉnh và R^2 dự đoán thấp, đồng thời hai giá trị này lệch nhau >0,2. Nguyên nhân có thể do vấn đề ở dữ liệu thực nghiệm hoặc mô hình phân tích. Tuy nhiên, với kết quả kiểm chứng thực nghiệm thu được (trình bày ở phần “**Thực nghiệm kiểm chứng**”), kết quả thu được tương đồng với kết quả dự đoán (lệch 0,85%). Các biến R_2 , R_3 và R_4 đều có R^2 hiệu chỉnh và R^2 dự đoán trên 85%, riêng biến R_4 xấp xỉ 1 nên không xác định trong thống kê.

Độ chính xác thích hợp thể hiện tỷ lệ giữa “tín hiệu” và “nhiều”. Hay nói cách khác, giá trị này là tỷ số giữa khoảng giá trị dự đoán (xung quanh giá trị dự đoán) và sai số dự đoán trung bình. Trị số này >4 được xem là phù hợp, chứng tỏ “tín hiệu” tạo ra là thích hợp. Tất cả các biến đều thỏa mãn yêu cầu này. Giá trị R^2 của biến R_1 nhỏ, tuy nhiên giá trị độ chính xác thích hợp thỏa mãn >4 nên vẫn có thể chấp nhận được.

Phân tích ảnh hưởng của các biến độc lập lên biến phụ thuộc

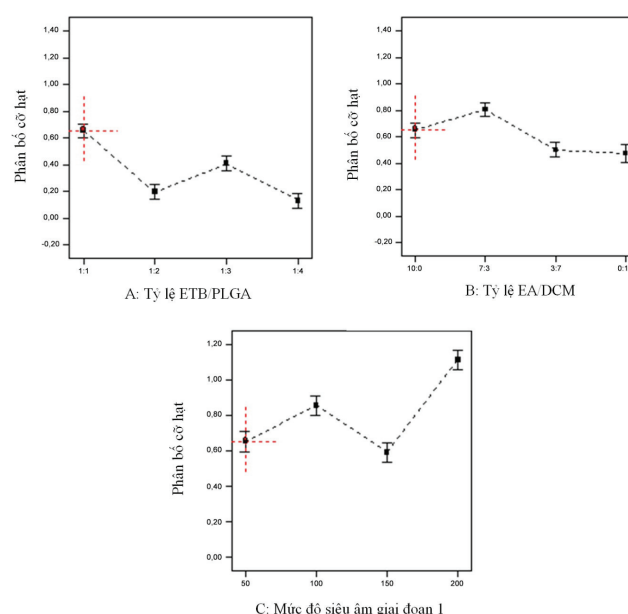


Hình 1. Ảnh hưởng của biến độc lập lên kích thước tiểu phân trung bình.

Sự ảnh hưởng của biến độc lập lên biến kích thước tiểu phân được thể hiện ở hình 1. Trong các biến số độc lập, kích thước tiểu phân nano ethambutol bị chi phối bởi mức độ siêu âm ở giai đoạn 1 ($p=0,0471$). Khi mức siêu âm vượt quá 150 W, kích thước tiểu phân giảm đáng kể.

Ở một nghiên cứu khác, tác giả Sonia Iurian và cộng sự khảo sát ảnh hưởng của các thông số quy trình siêu âm đến kích thước tiểu phân nano. Thông số ảnh hưởng lớn nhất lên kích thước là thời gian và mức độ siêu âm. Hai thông số này càng lớn thì kích thước hạt càng giảm [5].

Sự gia tăng mức độ siêu âm đồng thời làm gia tăng nhiệt độ môi trường phân tán. Để tránh bị tác động của nhiệt độ, tiểu phân nano được duy trì nhiệt độ cố định 8-10°C.



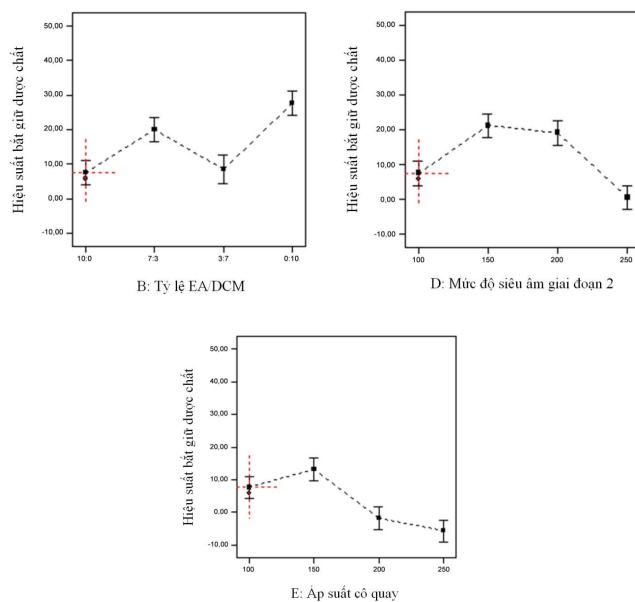
Hình 2. Ảnh hưởng của các biến độc lập lên chỉ số phân tán.

Sự ảnh hưởng của các biến số độc lập lên chỉ số phân tán không có sự nhất quán chung (hình 2). Khi lượng polymer tăng, nhìn chung chỉ số phân tán giảm, với tỷ lệ ETB/PLGA là 1:2 và 1:4 thì chỉ số phân tán thấp nhất, tiểu phân nano có sự đồng nhất cao ($p=0,0007$). Kết quả này có sự tương đồng với Kabiru Dauda và cộng sự khi nghiên cứu tiểu phân nano PLGA tải artesunat bằng phương pháp nhũ tương kép kết hợp bay hơi dung môi. Khi tỷ lệ artesunat:PLGA thay đổi từ 1:5 xuống 1:10 thì PDI lần lượt là $1,000\pm0,000$ và $0,355\pm0,040$ [6].

Loại dung môi sử dụng để hòa tan polymer cũng ảnh hưởng đến PDI. Sử dụng DCM làm dung môi hòa tan PLGA thu được các tiểu phân nano đồng nhất hơn so với sử dụng EA ($p=0,0030$). Điều này có thể giải thích là do tốc độ bay hơi của DCM nhanh hơn EA, khiến DCM được loại nhanh chóng và tiểu phân nano hình thành dễ dàng hơn với cỡ hạt

đồng nhất hơn [7]. Tuy nhiên, điều này còn tùy thuộc vào phương pháp loại dung môi hữu cơ. Ở một nghiên cứu khác, Phạm Đình Duy và cộng sự đã nghiên cứu tiểu phân nano tải pyrazinamid sử dụng DCM, EA và hỗn hợp EA/DCM làm dung môi hòa tan PLGA; và các dung môi này được loại bỏ bằng cách bay hơi tự nhiên. Khi đó, sử dụng EA giúp thu được tiểu phân nano có độ đồng nhất cao hơn [8].

Mức độ siêu âm ở giai đoạn 1 thay đổi cũng ảnh hưởng đến chỉ số phân tán của tiểu phân nano, sự thay đổi chỉ số phân tán không tuyến tính theo sự thay đổi mức độ siêu âm ($p=0,0007$). Về mặt lý thuyết, khi mức độ siêu âm tăng thì khả năng nhũ hóa tăng, đồng thời lực phân tán mạnh sẽ tạo ra tiểu phân nano có kích thước nhỏ, đồng nhất. Tuy nhiên, khi lực phân tán càng mạnh, nhiệt độ môi trường càng cao thì các tiểu phân nano có kích thước nhỏ tạo thành có năng lượng bề mặt lớn sẽ chuyển động hỗn loạn, dễ dẫn đến tình trạng kết tập, làm tăng PDI.



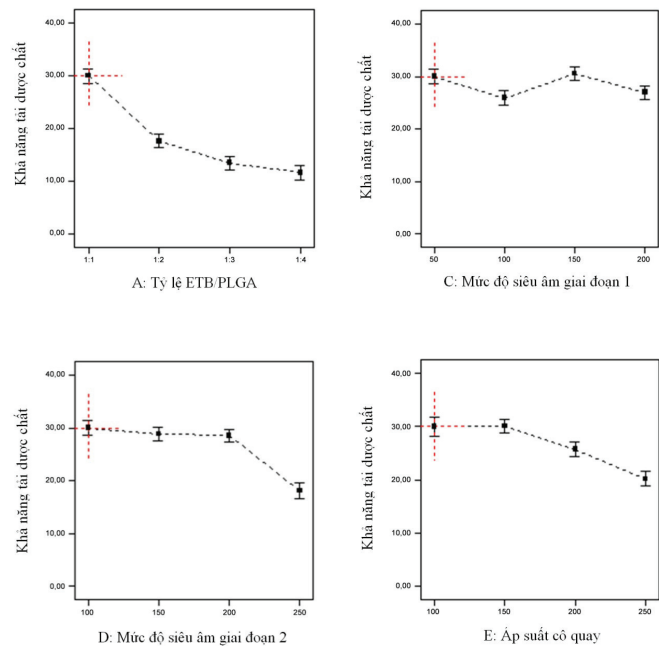
Hình 3. Ảnh hưởng của các biến độc lập lên hiệu suất mang dược chất.

Các biến độc lập và xu hướng ảnh hưởng đến hiệu suất mang dược chất được thể hiện ở hình 3. Giá trị EE có sự thay đổi đáng kể khi sử dụng các dung môi hữu cơ khác nhau ($p=0,003$). Khi dung môi được loại nhanh chóng sẽ giúp tiểu phân nano dễ hình thành hơn, khi đó khả năng bắt giữ dược chất hiệu quả hơn [7]. Do đó, khi sử dụng DCM sẽ tác động tích cực hơn đến giá trị EE so với sử dụng riêng EA hoặc phối hợp 2 loại dung môi.

Tương tự, mức độ siêu âm ở giai đoạn 2 cũng có ảnh hưởng mạnh đến giá trị EE ($p=0,002$). Khả năng nhũ hóa

tăng khi mức độ siêu âm tăng dần, tuy nhiên, cấu trúc nhũ tương đã được tạo thành có khả năng bị phá vỡ khi sự siêu âm diễn ra ở cường độ quá cao, dẫn đến thất thoát dược chất.

Trong khi mức độ siêu âm giai đoạn 2 tỷ lệ thuận với EE thì áp suất cô quay loại dung môi tác động ngược lại. Áp suất cô quay càng nhỏ thì sự loại dung môi hữu cơ hiệu quả hơn. Do vậy, khi tăng áp suất cô quay, giá trị EE có xu hướng giảm ($p=0,005$).



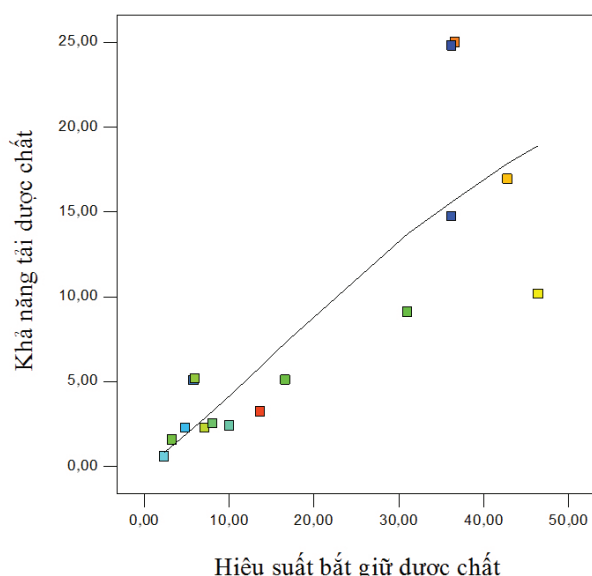
Hình 4. Ảnh hưởng của các biến độc lập lên khả năng tải dược chất.

Các biến độc lập và xu hướng ảnh hưởng đến khả năng tải dược chất được thể hiện ở hình 4. Giá trị DL giảm mạnh khi tỷ lệ ETB/PLGA tăng lên, nguyên nhân là do khi tăng lượng polymer làm tổng lượng chất rắn trong công thức tăng, trong khi lượng dược chất được bắt giữ không tăng theo tương ứng. Đây cũng là biến số ảnh hưởng lớn nhất lên DL ($p=0,014$).

Trong khi đó, giá trị DL không có sự thay đổi đáng kể khi mức độ siêu âm ở giai đoạn 1 thay đổi ($p=0,045$). Sự thay đổi mức độ siêu âm ở giai đoạn 2 cũng ảnh hưởng gần như tương tự lên giá trị DL, tuy nhiên, khi tăng đến 250 W giá trị DL có sự giảm sâu ($p=0,02$). Mức độ siêu âm quá lớn ở giai đoạn này có thể làm phá vỡ cấu trúc nhũ tương đã hình thành, gây ra thất thoát dược chất ra ngoài pha ngoại, dẫn đến làm giảm EE và DL.

Tương tự như đối với EE, áp suất cô quay cũng ảnh hưởng tỷ lệ nghịch với khả năng tải dược chất. Áp suất cô

quay càng nhỏ thì sự loại dung môi hữu cơ càng hiệu quả hơn. Do vậy, khi tăng áp suất cô quay, giá trị DL có xu hướng giảm ($p=0,02$).



Hình 5. Mối tương quan giữa EE và DL.

Giữa EE và DL có mối tương quan thuận, mức độ tương quan chặt chẽ với hệ số tương quan là 0,822. Hai thông số này cùng giúp đánh giá lượng dược chất được bắt giữ vào tiểu phân nano. EE biểu thị phần trăm lượng dược chất mà tiểu phân tải được, DL biểu thị tỷ lệ dược chất đã được bắt giữ so với tổng lượng chất rắn có trong công thức. Ở nghiên cứu này, EE và DL cùng bị chi phối bởi mức độ siêu âm giai đoạn 2 và áp suất cô quay giai đoạn loại dung môi hữu cơ. Ngoài ra, DL còn bị tác động bởi tỷ lệ ETB/PLGA. Chính tỷ lệ ETB/PLGA thay đổi làm tổng lượng chất rắn thay đổi nên giá trị DL không tuyến tính tuyệt đối so với EE (hệ số tương quan 0,822). Mối tương quan giữa EE và DL được thể hiện ở hình 5.

Tối ưu hóa

Dựa vào dữ liệu thực nghiệm, phần mềm Design-Expert tiến hành phân tích phương sai nhằm đánh giá ảnh hưởng của biến độc lập lên biến phụ thuộc (bảng 3). Kết hợp với điều kiện ràng buộc cho các biến độc lập và phụ thuộc, các thực nghiệm tối ưu với các chỉ số mong muốn (Desirability value) khác nhau được phần mềm đề xuất. Chỉ số mong muốn càng cao phản ánh khả năng tái lập càng cao khi so sánh giữa các dữ liệu được đề xuất bởi phần mềm và các dữ liệu thực nghiệm kiểm chứng. Thực nghiệm có chỉ số mong muốn cao nhất (0,897) được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Thông số công thức và quy trình của công thức tối ưu.

Thông số	Giá trị	Ghi chú
Tỷ lệ ETB/PLGA	1:1	
Tỷ lệ EA/DCM	0:10	
Mức độ siêu âm giai đoạn 1 (W)	150	1 phút
Mức độ siêu âm giai đoạn 2 (W)	150	3 phút
Áp suất cô quay (mbar)	150	150 vòng/phút

Thực nghiệm kiểm chứng

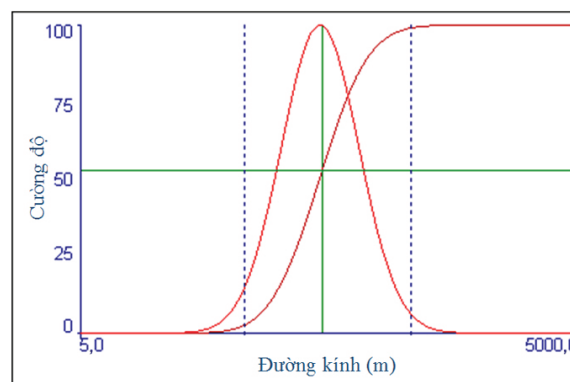
Tiến hành lặp lại 3 lần thực nghiệm tối ưu đã được đề xuất. Dữ liệu đánh giá được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Kết quả kiểm chứng công thức tối ưu ($n=3$).

	Size (nm)	PDI	EE (%)	DL (%)
Dự đoán	147,15±23,12	0,41±0,05	46,92±3,07	29,50±0,23
Khoảng tin cậy 95% cho giá trị dự đoán	Giới hạn trên 172,33	0,56	53,97	32,43
	Giới hạn dưới 121,97	0,27	39,86	26,58
Thực nghiệm	148,40±8,22	0,39±0,03	44,94±0,61	29,00±0,28

Kết quả thực nghiệm kiểm chứng thu được các thực nghiệm tối ưu có tính lặp lại cao. Đồng thời, giá trị thực nghiệm có sự tương đồng cao với giá trị dự đoán bởi phần mềm.

Các tiểu phân nano tải ethambutol có kích thước trung bình 148,40±8,22 nm (hình 6). Các tiểu phân có kích thước dưới 150 nm bị thanh thải ở phổi chậm hơn so với các tiểu phân lớn hơn, do đó duy trì hiệu lực điều trị lâu hơn [9]. Chỉ số phân tán là 0,39±0,03, kiểu phân bố một đỉnh. Hiệu suất bắt giữ và khả năng tải dược chất lần lượt là 44,94±0,61% và 29,00±0,28%. Hiệu suất này ở mức chấp nhận được do phương pháp nhũ tương kép kết hợp bay hơi dung môi (DE) để làm thất thoát dược chất ra pha ngoại [10]. So sánh với các phương pháp khác khi bào chế cùng một dược chất, phương pháp DE cho hiệu suất mang dược chất cũng thấp hơn [11].



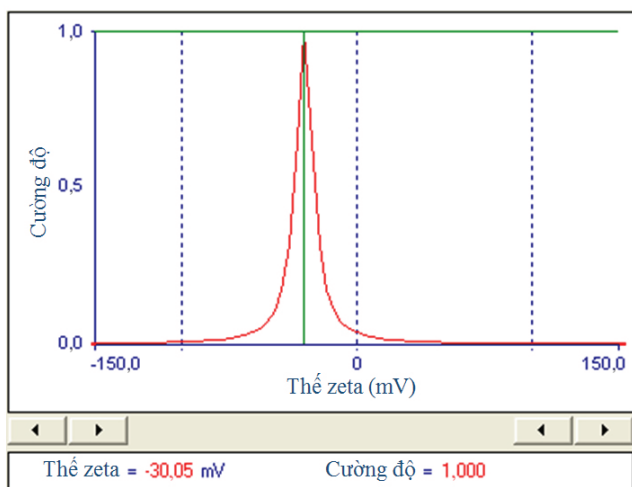
Hình 6. Đồ thị phân bố kích thước tiểu phân của công thức kiểm chứng.

Thế zeta

Kết quả xác định thế zeta từ 3 lô kiểm chứng được trình bày ở 6.

Bảng 6. Thế zeta các công thức kiểm chứng.

Lô	Thế zeta (mV)
1 (n=10)	- 29,91±2,90
2 (n=10)	- 30,97±5,53
3 (n=10)	- 30,88±3,45



Hình 7. Đồ thị thế zeta của công thức kiểm chứng.

Các tiểu phân nano PLGA thường có thế zeta âm, trị số khác nhau tùy thuộc vào thành phần công thức và phương pháp bào chế [8, 11, 12]. Thế zeta của công thức kiểm chứng có giá trị trung bình là $-0,59 \pm 0,59$ mV (hình 7). Trị số này giúp tiểu phân nano tránh bị kết tập và bền vững trong quá trình bảo quản nhờ tạo sự ổn định tĩnh điện học do lực đẩy của các tiểu phân tích điện cùng dấu [13]. Sự tích điện bề mặt không những ảnh hưởng đến tính bền về mặt hóa lý, mà còn ảnh hưởng đến điện tích màng tế bào vi khuẩn. Điều này lại càng có ý nghĩa khi ethambutol thể hiện tác dụng thông qua quá trình tác động đến màng tế bào trực khuẩn lao [2].

Kết luận

Tối ưu hóa thành công các yếu tố ảnh hưởng đến việc điều chế tiểu phân nano poly-(D,L-lactid-co-glycolid) tải ethambutol bằng phương pháp nhũ tương kép kết hợp bay hơi dung môi với sự trợ giúp của phần mềm Design-Expert. Các giá trị tối ưu của các biến độc lập bao gồm: tỷ lệ ETB/

PLGA là 1:1; tỷ lệ EA/DCM là 0:10; mức độ siêu âm giai đoạn 1 là 150 W; mức độ siêu âm giai đoạn 2 là 150 W; áp suất cô quay là 150 mbar.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2017), *Global Tuberculosis Report 2017*.
- [2] Bộ Y tế (2018), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr. 631-633.
- [3] J.T. Seil, T.J. Webster (2012), "Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature", *International Journal of Nanomedicine*, **7**, pp.2767-2781.
- [4] R. Sagar Mudshinge, B. Amol Deore, Sachin Patil, M. Chetan Bhalgat (2011), "Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery", *Saudi Pharmaceutical Journal*, **19**(3), pp.129-141.
- [5] Sonia Iurian, Ioan Tomuta, Lucia Rus, Marcela Achim (2015), "Optimization of the sonication process for meloxicam nanocrystals preparation", *Clujul Medical*, **88**(3), pp.366-372.
- [6] Kabiru Dauda, Zulaikha Busari, Olajumoke Morenikeji, Funmilayo Afolayan, Oyetunde Oyeyemi, Jairam Meena, Debasis Sahu, Amulya Panda (2017), "Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-based artesunate nanoparticles: formulation, antimalarial and toxicity assessments", *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, **18**(11), pp.977-985.
- [7] M. Ian Smallwood (1996), *Handbook of organic solvent properties*, Arnold.
- [8] Dinh-Duy Pham, Elias Fattal, Nicolas Tsapis (2015), "Pyrazinamide-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Optimization by experimental design", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **30**(Part B), pp.384-390.
- [9] A.H. Chow, H.H. Tong, P. Chattopadhyay, B.Y. Shekunov (2007), "Particle engineering for pulmonary drug delivery", *Pharm. Res.*, **24**(3), pp.411-437.
- [10] E. Cohen-Sela, et al. (2009), "A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles", *J. Control. Release*, **133**(2), pp.90-95.
- [11] Sebastian Piepera, Klaus Langera (2017), "Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles - a systematic evaluation of preparation techniques and parameters", *Materials Today: Proceedings*, **4**(Supplement 2), pp.188-192.
- [12] Ceyda Tuba Sengel Turk, Umut Can Oz, Tugrul Mert Serim, Canan Hascicek (2014), "Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide - loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments", *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **15**(1), pp.161-176.
- [13] Beatrice Heurtault, Patrick Saulnier, Brigitte Pech, Jacques-Emile Proust, Jean-Pierre Benoit (2003), "Physico-chemical stability of colloidal lipid particles", *Biomaterials*, **24**(23), pp.4283-4300.

Đánh giá khả năng đối kháng của một số giống lúa (*Oryza sativa* L.) với 3 loại cây cỏ gây hại chính trong ruộng lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long

Nguyễn Thị Cẩm Tú¹, Nguyễn Thị Thùy Trang², Lê Văn Vàng¹, Hồ Lệ Thi^{3*}

¹Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Trạm Trồng trọt và bảo vệ thực vật huyện Thới Lai, TP Cần Thơ

³Phòng thí nghiệm trung tâm, Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

Ngày nhận bài 2/7/2019; ngày chuyển phản biện 5/7/2019; ngày nhận phản biện 6/8/2019; ngày chấp nhận đăng 12/8/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định khả năng đối kháng trực tiếp của các giống lúa OM (4498, 3536, 5930, 2395, 6976, 7347, 5451 và N406) với cỏ lồng vực nước, cỏ đuôi phụng, cỏ chác, cải bẹ xanh và cải xoong trong điều kiện phòng thí nghiệm. 10 hạt lúa nứt nanh được đặt cho nảy mầm trên đĩa petri trong 48 giờ. Sau đó, 10 hạt cỏ lồng vực nước, cỏ đuôi phụng, cỏ chác, cải bẹ xanh hoặc cải xoong đã ngâm ủ vừa nứt nanh được đưa vào trồng chung xen kẽ với cây lúa mầm trong buồng nuôi cây (25°C, 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) có điều chỉnh 12 giờ sáng tối xen kẽ trong 48 giờ tiếp theo. Phần trăm ức chế chiều dài thân và rễ của các loại cây thử nghiệm khi trồng chung với các giống lúa khác nhau được ghi nhận. Kết quả cho thấy, các giống lúa OM nêu trên đều cho hiệu quả ức chế đối với sự sinh trưởng của các loại cây thử nghiệm ở các mức độ khác nhau. Trong đó, giống OM 5930 ức chế trung bình cao nhất (47,0%) đối với chiều dài thân và rễ của các loại cây thử nghiệm so với các giống lúa còn lại. Cụ thể là cỏ lồng vực nước (28,9 và 40,4%), cỏ đuôi phụng (47,1 và 48,7%), cỏ chác (49,8 và 57,5%), cải bẹ xanh (45,0 và 46,6%), cải xoong (44,8 và 58,3%). Kết quả đã chỉ ra là tất cả các giống lúa thử nghiệm đều ít nhiều có chứa chất đối kháng thực vật, những chất này đã rỉ ra từ rễ cây lúa và gây ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của hạt mầm các loài cây thử nghiệm bao gồm cỏ lồng vực nước, cỏ đuôi phụng và cỏ chác. Việc nghiên cứu ứng dụng các giống lúa này trong chương trình phòng trừ sinh học các loài cỏ dại trên thông qua hiện tượng đối kháng cỏ trong cây lúa là rất khả thi và hứa hẹn nhiều thành công trong tương lai.

Từ khóa: cải bẹ xanh (*Brassica juncea*), cải xoong (*Lepidium sativum*), cỏ chác (*Fimbristylis miliacea* L.), cỏ đuôi phụng (*Leptochloa chinensis* L.), cỏ lồng vực nước (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv), đối kháng trực tiếp, lúa (*Oryza sativa* L.).

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Trên thế giới, cỏ dại luôn là mối quan tâm hàng đầu của nông dân trồng lúa, tổng thiệt hại do cỏ dại gây ra trên cây trồng lớn hơn nhiều so với côn trùng và bệnh hại, có thể làm giảm tới 60% năng suất lúa [1]. Ở Việt Nam, nhiều yếu tố làm ảnh hưởng đến năng suất cây trồng, trong đó thiệt hại do cỏ dại là một trong những yếu tố chính, trung bình năng suất giảm do cỏ dại trên lúa sạ khoảng 46% [2]. Thêm vào đó, hạt cỏ lẫn trong lúa sau thu hoạch làm giảm chất lượng và giá trị lúa gạo. Sự giảm mạnh năng suất lúa do cỏ dại gây ra dẫn đến tình trạng người nông dân gia tăng sử dụng thuốc trừ cỏ hóa học, vì có thể mang lại hiệu quả phòng trừ cao, ít tốn công và tiết kiệm thời gian. Tuy nhiên, việc

lạm dụng thuốc trừ cỏ hóa học quá mức thông qua việc áp dụng thuốc quá liều liên tục qua nhiều năm có thể gây ra những rủi ro cho con người, môi trường và gây ra tình trạng cỏ kháng thuốc. Tại Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), thuốc trừ cỏ được sử dụng rất cao dựa trên kinh nghiệm cá nhân và thói quen, ước tính 3,1-7,0 kg hoạt chất/ha/năm. Nguồn nhập khẩu thuốc bảo vệ thực vật và nguyên liệu chủ yếu từ Trung Quốc (chiếm tới 53,4% tổng giá trị của mặt hàng này). Trong đó, thuốc trừ cỏ chiếm 48% (19.000 tấn), còn thuốc trừ sâu và trừ bệnh chiếm khoảng 32% (16.400 tấn), ngoài ra còn một lượng thuốc điều hòa sinh trưởng khoảng 900 tấn [3].

Trong quá trình chuyển hóa vật chất, cây lúa tạo ra hơn một trăm sản phẩm thứ cấp có phân tử thấp, bao gồm

*Tác giả liên hệ: Email: thihl.clrri@mard.gov.vn

Evaluation of direct resistance of some rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to three main invasive weeds in rice production at the Mekong River Delta

Thi Cam Tu Nguyen¹, Thi Thuy Trang Nguyen²,
Van Vang Le¹, Le Thi Ho^{3*}

¹Faculty of Agriculture, Can Tho University

²Cultivation and Plant Protection Station, Thoi Lai district, Can Tho city

³Central Laboratory, Cuu Long Delta Rice Research Institute

Received 2 July 2019; accepted 12 August 2019

Abstract:

The experiment was carried out to determine the direct antagonistic ability (donor - receiver bioassay) of OM rice varieties (4498, 3536, 5930, 2395, 6976, 7347, 5451, and N406) on the growth of barnyardgrass, red sprangletop, grasslike fimbry, mustard green, and watercress in laboratory conditions. Ten germinated rice seeds were placed on petri dishes for 48 hours. After that, 10 just-germinated seeds of barnyardgrass, red sprangletop, grasslike fimbry, mustard green, and watercress were put into intercropping with the rice seedlings in the breeding chamber (25°C, 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 12 hours of photosynthesis in the next 48 hours. The inhibition percentage on the shoot and root length of the tested plants when grown together with different rice varieties were recorded. The results showed that OM rice varieties (4498, 3536, 5930, 2395, 6976, 7347, 5451, and N406) addressed the inhibitory effect on the growth of tested plants at different levels. In particular, OM 5930 caused the inhibition at the highest average (47.0%) on the shoot and root length of the tested plants compared with the remaining rice varieties, specifically, barnyardgrass (28.9 and 40.4%), red sprangletop (47.1 and 48.7%), grasslike fimbry (49.8 and 57.5%), mustard green (45.0 and 46.6%), and watercress (44.8 and 58.3%), respectively. The results exhibited that all tested rice varieties might contain allelochemicals, which released from the roots of rice and affected the growth and development of the tested germinated seeds, including invasive weeds as barnyardgrass, red sprangletop, and grasslike fimbry. The application of these rice varieties in the weed biological control program via allelopathy in rice is very useful and promising in the future.

Keywords: barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv), direct antagonistic ability, grasslike fimbry (*Fimbristylis miliacea* L.), mustard green (*Brassica juncea*), red sprangletop (*Leptochloa chinensis* L.), rice (*Oryza sativa* L.), watercress (*Lepidium sativum*).

Classification number: 4.1

alkaloids, alkylresorcinols, cyclohexenone và các dẫn xuất ure, flavonoid và glucosides, diterpenoids và triterpenes. Các hợp chất ban đầu được tìm và phân lập trong cây lúa dưới dạng phytoalexin và là chất đối kháng thực vật mạnh trong cây lúa. Bên cạnh đó, một loạt các acid phenolic, terpen dễ bay hơi và các loại hợp chất khác cũng được xác định từ cây lúa mầm. Việc nghiên cứu, chọn tạo các giống lúa có khả năng xử lý hoặc hạn chế sự phát triển của cỏ dại dựa trên hiện tượng đối kháng thực vật đã và đang được các nhà quản lý, nhà khoa học, các doanh nghiệp và nông dân quan tâm. Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã công bố những giống lúa có khả năng phát triển lẫn át cỏ dại nhờ vào cơ chế đối kháng thực vật, bằng cách tiết ra các chất hóa sinh được gọi là chất đối kháng (CĐK - allelochemicals) có thể hạn chế sự sinh trưởng, phát triển của quần thể cỏ dại [4].

Hiện nay, các tỉnh/thành phố ĐBSCL đang đẩy mạnh việc thực hiện chủ trương tái cơ cấu ngành nông nghiệp theo hướng nâng cao giá trị gia tăng, phát triển bền vững, trong đó cây lúa là một trong các loại cây trồng rất quan trọng. Vì vậy, việc quản lý cỏ dại dựa vào tiềm năng đối kháng thực vật của cây lúa là rất cần thiết, vì hạn chế tình trạng kháng thuốc, an toàn và thân thiện với môi trường. Nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu xác định được khả năng đối kháng thực vật trực tiếp của các giống OM (5930, 4498, 3536, 2395, 5451, 7347, 6976 và N406) đối với 3 loài cỏ gây hại chính trong ruộng lúa nước (cỏ lồng vực nước, cỏ đuôi phụng và cỏ chác) và 2 loại cây trồng (cải bẹ xanh và cải xoong). Trên cơ sở đó, lựa chọn giống lúa cho hiệu quả đối kháng trực tiếp cao nhất để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn trong việc ứng dụng giống lúa này để kiểm soát cỏ dại bằng biện pháp sinh học trong tương lai.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Các giống lúa (*Oryza sativa* L.) bao gồm OM 5930, OM 4498, OM 3536, OM 2395, OM 5451, OM 7347, OM 6976 và OM N406 được lai tạo tại Viện Lúa ĐBSCL và hiện được trồng phổ biến ở ĐBSCL. Hạt cỏ lồng vực (*Echinochloa crus-galli* L.), cỏ đuôi phụng (*Leptochloa chinensis* L.) và cỏ chác (*Fimbristylis miliacea* L.) được thu trong ruộng lúa tại ĐBSCL. Hạt cải xoong (*Lepidium sativum*) được mua từ Công ty Bamert Seed, Muleshoe, TX 79.347, Hoa Kỳ. Hạt cải bẹ xanh (*Brassica juncea*) được mua tại Công ty TNHH MTV hạt giống Rạng Đông.

Phương pháp nghiên cứu

Hạt lúa được phá vỡ miền trạng bằng cách sấy ở nhiệt độ

40°C trong 48 giờ, sau đó ngâm trong nước ấm khoảng 24 giờ và ủ ở nhiệt độ 35°C trong 24 giờ. Khi hạt lúa nứt nanh tiến hành đặt 10 hạt lúa vào mỗi đĩa petri (đường kính 55 mm) có lót giấy thấm đã qua tiệt trùng và làm ẩm với 2 ml dung dịch 0,05% Tween 20. Các đĩa petri chứa hạt lúa được đặt trong buồng nuôi cây (25°C, 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) có điều chỉnh 12 giờ sáng tối xen kẽ trong 48 giờ. Sau 48 giờ, đặt 10 hạt cỏ lồng vực nước, cỏ đuôi phụng, cỏ chác, cải bẹ xanh hoặc cải xoong đã được ngâm ủ nứt nanh vào xen kẽ với cây lúa mầm và để phát triển trong buồng nuôi cây (25°C, 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) có điều chỉnh 12 giờ sáng tối xen kẽ trong 48 giờ tiếp theo. Thí nghiệm bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại. Đối với nghiệm thức đối chứng cũng được thực hiện theo quy trình trên nhưng không có sự hiện diện của cây lúa. Phương pháp đánh giá khả năng đối kháng trực tiếp của cây lúa mầm với sự sinh trưởng của ba loài cỏ và hai loài cây trồng thử nghiệm được thực hiện dựa trên việc tính tỷ lệ chiều dài thân và rễ của cỏ dại và cây trồng thử nghiệm so với nghiệm thức đối chứng [5].

Phân tích thống kê

Công thức tính tỷ lệ % ức chế thông qua số liệu về chiều dài thân và rễ tiến hành trong phòng thí nghiệm:

$$I = [(L_1 - L_2)/L_1] \times 100$$

Trong đó: I là tỷ lệ % ức chế; L_1 là chiều dài trung bình của rễ hoặc thân của cây đối chứng; L_2 là chiều dài trung bình của rễ hoặc thân của cây được xử lý.

Các số liệu thu được từ các thí nghiệm được nhập và xử lý bằng phần mềm Excel, thống kê số liệu bằng chương trình SPSS. Sử dụng ký hiệu chữ để so sánh sự khác nhau giữa kết quả trung bình của tất cả các nghiệm thức qua phép thử Duncan (Duncan Multiple Range Test).

Kết quả và thảo luận

Đánh giá hiệu quả đối kháng trực tiếp của 8 giống lúa OM với sự sinh trưởng của cỏ lồng vực nước, cỏ đuôi phụng, cỏ chác, cải bẹ xanh và cải xoong trong điều kiện phòng thí nghiệm

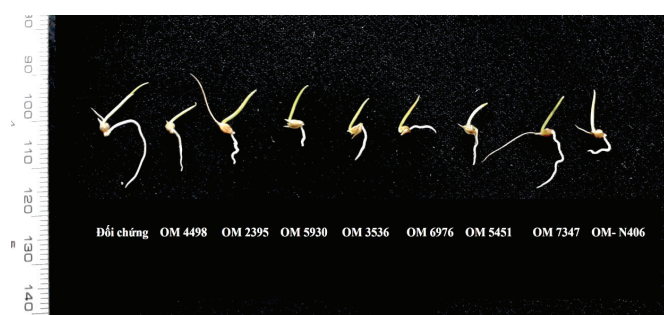
Kết quả ghi nhận ở bảng 1 cho thấy, hiệu quả ức chế trung bình của 8 giống lúa đối với chiều dài thân và rễ cỏ lồng vực nước lần lượt là 17,9 và 32,5%. Giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế chiều dài thân cao nhất đạt 28,9% và thấp nhất là giống OM 7347 với hiệu quả ức chế đạt 10,6%. Tương tự, các giống lúa cho hiệu quả ức chế chiều dài thân giảm dần theo thứ tự lần lượt là OM 6976 (23,0%), OM 3536 (21,8%), OM N406 (18,4%), OM 5451 (15,1%) và OM 4498 (13,4%).

Bảng 1. Hiệu quả đối kháng trực tiếp của 8 giống lúa OM với sự sinh trưởng của cỏ lồng vực nước.

Giống lúa	Độ hữu hiệu (%) - Cỏ lồng vực nước		Trung bình (%)
	Chiều dài thân	Chiều dài rễ	
OM 4498	13,4 ^c	28,3 ^c	20,8
OM 3536	21,8 ^b	40,3 ^a	31,0
OM 5930	28,9 ^a	40,4 ^a	34,6
OM 2395	12,2 ^f	22,8 ^d	17,5
OM 6976	23,0 ^b	41,0 ^a	32,0
OM 7347	10,6 ^g	11,7 ^e	11,1
OM 5451	15,1 ^d	35,6 ^b	25,4
OM N406	18,4 ^c	40,1 ^a	29,2
Trung bình (%)	17,9	32,5	-
Mức ý nghĩa	**	**	-
CV (%)	2,0	0,7	-

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Duncan; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Hiệu quả ức chế chiều dài rễ dao động từ 11,7 đến 41,0%, cao gấp 1,7 lần so với hiệu quả ức chế chiều dài thân của cỏ lồng vực nước. Do trong quá trình sinh trưởng, rễ hút nước và khoáng chất cho quá trình trao đổi chất trong cây nên rễ bị ảnh hưởng trực tiếp và biểu hiện triệu chứng rõ hơn so với biểu hiện ở thân (hình 1). Trong đó, 4 giống lúa OM (3536, 5930, 6976 và N406) cho hiệu quả ức chế cao nhất, dao động từ 40,1 đến 41,0% so với các giống lúa còn lại, giống OM 7347 cho hiệu quả ức chế chiều dài rễ thấp nhất (11,7%).



Hình 1. Hiệu quả ức chế của 8 giống lúa OM đối với sự sinh trưởng của cỏ lồng vực nước.

Theo kết quả ghi nhận, hiệu quả ức chế trung bình của các giống lúa đối với chiều dài thân và rễ của cỏ lồng vực nước ở bảng 1 lần lượt là OM 4498 (20,8%), OM 3536 (31,0%), OM 5930 (34,6%), OM 2395 (17,5%), OM 6976 (32,0%), OM 7347 (11,1%), OM 5451 (25,4%) và OM N406 (29,2%). Như vậy, giống OM 5930 cho hiệu quả ức

chế cao nhất đối với chiều dài thân và rễ của cỏ lồng vực nước (34,6%), cao gấp 3 lần so với giống cho hiệu quả ức chế thấp nhất là OM 7347 (11,1%) qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1%.

Bảng 2. Hiệu quả đối kháng trực tiếp của 8 giống lúa OM với sự sinh trưởng của cỏ đuôi phụng.

Giống lúa	Độ hữu hiệu (%) - Cỏ đuôi phụng		Trung bình (%)
	Chiều dài thân	Chiều dài rễ	
OM 4498	21,6 ^e	23,2 ^e	22,4
OM 3536	32,4 ^d	34,3 ^c	33,3
OM 5930	47,1 ^a	48,7 ^a	47,9
OM 2395	34,3 ^c	36,6 ^c	35,5
OM 6976	44,1 ^b	45,2 ^b	44,7
OM 7347	17,6 ^h	22,5 ^e	20,1
OM 5451	29,4 ^e	36,6 ^c	33,0
OM N406	26,5 ^f	29,6 ^d	28,0
Trung bình (%)	31,6	34,6	-
Mức ý nghĩa	**	**	-
CV (%)	1,5	2,0	-

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Duncan; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Tương tự, thí nghiệm cũng được khảo sát trên cỏ đuôi phụng và ghi nhận hiệu quả ức chế cao đối với cả chiều dài thân và rễ của cỏ đuôi phụng (bảng 2). Hiệu quả ức chế trung bình của 8 giống lúa OM đối với chiều dài thân và rễ của cỏ đuôi phụng lần lượt là 31,6 và 34,6% qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Đối với chiều dài thân của cỏ đuôi phụng, 8 giống lúa OM cho hiệu quả ức chế dao động từ 17,6 đến 47,1%. Trong đó, giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế chiều dài thân cao nhất (đạt 47,1%) và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là các giống OM (6976, 2395, 3536, 5451, N406 và 4498) cho hiệu quả ức chế giảm dần trong khoảng từ 44,1 xuống 21,6%. Cuối cùng là giống OM 7347 cho hiệu quả ức chế thấp nhất (17,6%) đối với chiều dài thân của cỏ đuôi phụng. Bên cạnh đó, hiệu quả ức chế của 8 giống lúa đối với chiều dài rễ từ 22,5 đến 48,7%, tương đối cao và khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Trong đó, giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế chiều dài rễ cao nhất là 48,7% và 2 giống OM 7347 và OM 4498 cho hiệu quả ức chế thấp tương đương nhau, lần lượt là 22,5 và 23,2%. Ngoài ra, giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế cao đối với cả chiều dài thân và rễ của cỏ đuôi phụng, lần lượt là 47,1 và 48,7%. Ngược lại, giống OM 4498 và OM 7347 cho hiệu quả ức chế thấp đối với sự sinh trưởng của cỏ đuôi phụng so với các giống lúa còn lại.

Bảng 3. Hiệu quả đối kháng trực tiếp của 8 giống lúa OM với sự sinh trưởng của cỏ chác.

Giống lúa	Độ hữu hiệu (%) - Cỏ chác		Trung bình (%)
	Chiều dài thân	Chiều dài rễ	
OM 4498	17,5 ^e	29,8 ^f	23,6
OM 3536	31,5 ^d	39,7 ^d	35,6
OM 5930	49,8 ^a	57,5 ^a	53,7
OM 2395	25,9 ^e	31,7 ^f	28,8
OM 6976	37,4 ^c	44,0 ^c	40,7
OM 7347	22,1 ^f	26,7 ^g	24,4
OM 5451	42,6 ^b	49,5 ^b	46,0
OM -N406	21,0 ^f	35,3 ^c	28,2
Trung bình (%)	31,0	39,3	-
Mức ý nghĩa	**	**	-
CV (%)	1,9	1,9	-

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Duncan; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Kết quả bảng 3 cho thấy, 8 giống lúa OM cho hiệu quả ức chế trung bình đối với chiều dài thân và rễ của cỏ chác dao động từ 23,6 đến 53,7%. Hiệu quả ức chế trung bình đối với chiều dài thân và rễ lần lượt là 31,0 và 39,3%. Trong đó, giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế cao đối với chiều dài thân và rễ của cỏ chác, lần lượt là 49,8 và 57,5%. Hiệu quả ức chế đối với chiều dài thân và rễ giảm dần đối với từng giống lúa như OM 5451 (42,6 và 49,5%), OM 6976 (37,4 và 44,0%), OM 3536 (31,5 và 39,7%), OM 2395 (25,9 và 31,7%), OM N406 (21,0 và 35,3%). Hai giống OM 4498 (17,5 và 29,8%) và OM 7347 (22,1 và 26,7) đều cho hiệu quả ức chế thấp so với các giống lúa còn lại qua phép thống kê ở mức ý nghĩa 1%.

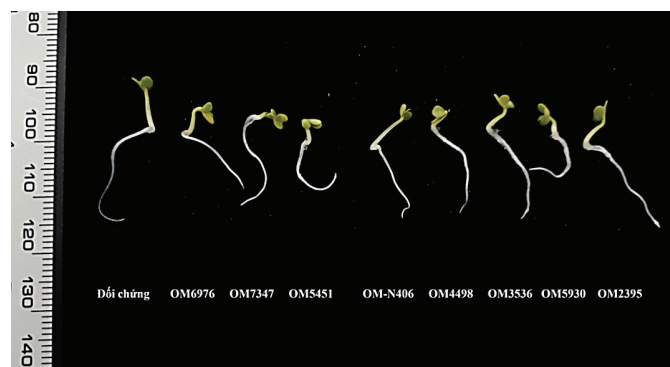
Olofsdotter (2001) [6] ghi nhận cây xà lách (*Lactuca sativa* L.), cải củ (*Raphanus sativus*) và cải xoong được sử dụng như cây chỉ thị vì có độ mẫn cảm cao với nồng độ chất ức chế thấp. Vì vậy, cải bẹ xanh và cải xoong cũng được sử dụng tương tự cây chỉ thị trong thí nghiệm. Do đó, bên cạnh việc khảo sát hiệu quả ức chế của 8 giống lúa đối với cỏ lồng vực nước, cỏ đuôi phụng và cỏ chác thì thí nghiệm còn được khảo sát đối với sự sinh trưởng của cải bẹ xanh và cải xoong trong điều kiện phòng thí nghiệm (bảng 4 và 5).

Bảng 4. Hiệu quả đối kháng trực tiếp của 8 giống lúa OM với sự sinh trưởng của cải bẹ xanh.

Giống lúa	Độ hữu hiệu (%) - Cải bẹ xanh		Trung bình (%)
	Chiều dài thân	Chiều dài rễ	
OM 4498	36,9 ^c	43,2 ^b	40,1
OM 3536	32,7 ^d	39,7 ^d	35,3
OM 5930	45,0 ^a	47,1 ^a	46,0
OM 2395	30,9 ^e	41,0 ^{bc}	36,0
OM 6976	40,7 ^b	41,3 ^{bc}	41,0
OM 7347	23,1 ^g	24,9 ^f	24,0
OM 5451	27,5 ^f	39,1 ^{cd}	33,3
OM N406	23,6 ^g	33,6 ^c	28,6
Trung bình (%)	32,6	38,5	-
Mức ý nghĩa	**	**	-
CV (%)	1,1	1,8	-

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Duncan; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

8 giống lúa OM cho hiệu quả ức chế trung bình lên sự sinh trưởng của cải bẹ xanh dao động trong khoảng 24,0-46,0%. Trong đó, giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế chiều dài thân cao nhất đạt 45,0% so với các giống còn lại, kế đến là giống OM 6976 (40,7%), OM 4498 (36,9%), OM 3536 (32,7%), OM 2395 (30,9%), OM 5451 (27,5%), OM N406 (23,6%) và OM 7347 (23,1%). Bên cạnh đó, hiệu quả ức chế đối với rễ cao hơn 5,9% so với thân của cải bẹ xanh (hình 2). Cụ thể, giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế rễ cao nhất (47,1%) và giống OM 7347 cho hiệu quả ức chế thấp nhất (24,9%).

**Hình 2. Hiệu quả ức chế của 8 giống lúa OM đối với sự sinh trưởng của cải bẹ xanh.**

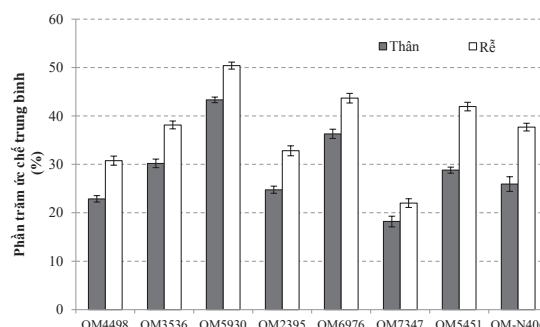
Tương tự đối với cải xoong, hiệu quả ức chế trung bình của các giống lúa đối với sự sinh trưởng của cải xoong tương đối cao hơn khi so sánh với hiệu quả trên cỏ dại, dao

động từ 20,9 đến 52,0% (bảng 5). Trong đó, hiệu quả ức chế trung bình chiều dài thân và rễ của cải xoong lần lượt là 30,9 và 41,0%. Giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế cao nhất đối với thân và rễ của cải xoong (45,8 và 58,3%) so với các nghiệm thức còn lại qua phân tích thống kê mức ý nghĩa 1%. Hiệu quả ức chế trung bình giảm dần ở các giống lúa OM (N406, 6976, 5451, 3536, 4498, 2395, 7347), từ 45 xuống 20,9%.

Bảng 5. Hiệu quả đối kháng trực tiếp của 8 giống lúa OM với sự sinh trưởng của cải xoong.

Giống lúa	Độ hữu hiệu (%) - Cải xoong		Trung bình (%)
	Chiều dài thân	Chiều dài rễ	
OM 4498	25,0 ^f	29,3 ^f	27,2
OM 3536	32,7 ^d	38,6 ^d	35,7
OM 5930	45,8 ^a	58,3 ^a	52,0
OM 2395	20,5 ^g	31,9 ^e	26,2
OM 6976	36,3 ^c	46,8 ^c	41,5
OM 7347	17,5 ^h	24,2 ^g	20,9
OM 5451	29,4 ^e	48,9 ^{bc}	39,1
OM -N406	40,1 ^b	49,9 ^b	45,0
Trung bình (%)	30,9	41,0	-
Mức ý nghĩa	**	**	-
CV (%)	1,9	1,9	-

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Duncan; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

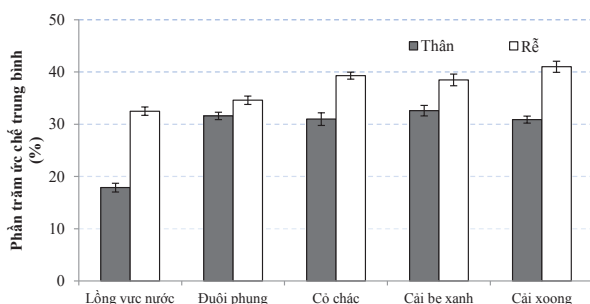
**Hình 3. Tỷ lệ phần trăm ức chế trung bình của 8 giống lúa đối với chiều dài thân và rễ của các loại cây thử nghiệm.**

Trong quá trình trao đổi chất của cây, việc phóng thích các hợp chất sinh hóa có thể ảnh hưởng có lợi hoặc bất lợi đối với cây khác, kể cả cây trồng và các loài cỏ dại với các chất sinh hóa được tiết ra từ rễ, sự bay hơi, sự phân hủy xác bã thực vật và tiến trình khác từ các bộ phận của cây trong tự nhiên và hệ thống nông nghiệp [7]. Theo Lee và cs (2003) [8], các hợp chất sinh hóa được tiết ra từ rễ lúa có ảnh hưởng lớn đến sự nảy mầm của hạt cỏ trong đất. Thông qua kết quả ghi nhận khả năng đối kháng của 8 giống lúa OM (4498, 3536, 5930, 2395, 6976, 7347, 5451 và N406) với chiều dài

thân và rễ của cỏ lồng vục nước, cỏ đuôi phụng, cỏ chác, cải bẹ xanh và cải xoong cho hiệu quả ức chế trung bình khác nhau (hình 3). Giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế trung bình đối với chiều dài thân và rễ của các loại cây thử nghiệm cao nhất đạt 43,4 và 50,5%; thấp nhất là giống OM 7347 (18,3 và 21,9%). Bên cạnh đó, hiệu quả ức chế trung bình của các giống lúa theo thứ tự giảm dần đối với các loại cây thử nghiệm như sau: OM 6976 (36,2 và 43,7%), OM 5451 (30,1 và 42,3%), OM 3536 (29,9 và 37,8%), OM N406 (25,9 và 37,5%) và OM 4498 (22,7 và 30,8%).

So sánh hiệu quả ức chế trung bình giữa các loại cây thử nghiệm (cỏ lồng vục nước, cỏ đuôi phụng, cỏ chác, cải bẹ xanh và cải xoong) trong điều kiện phòng thí nghiệm

Trên từng đối tượng khảo sát khác nhau bao gồm cỏ lồng vục nước, cỏ đuôi phụng, cỏ chác, cải bẹ xanh và cải xoong thì mức độ ức chế cũng khác nhau (hình 4). Kết quả ghi nhận 8 giống lúa OM thí nghiệm cho hiệu quả đối kháng thực vật cao và ức chế chiều dài thân và rễ của cỏ lồng vục nước (17,9 và 32,4%), cỏ đuôi phụng (31,6 và 34,6%), cỏ chác (31,0 và 39,2%), cải bẹ xanh (32,4 và 38,5%) và cải xoong (30,9 và 41,0%).



Hình 4. Tỷ lệ phần trăm ức chế trung bình của 8 giống lúa đối với sự sinh trưởng của các loại cây thử nghiệm.

Chau và cs (2008) [9] đã tiến hành đánh giá khả năng cạnh tranh thực vật của dịch trích nước từ 19 giống lúa được trồng phổ biến nhất ở ĐBSCL và cho thấy, chỉ có giống lúa AS 996 kích thích chiều dài rễ (32,8%) của rau diếp, trong khi hầu hết các giống còn lại là ức chế. Trong đó, các giống lúa OM 5930, OM 4498, OM 5900, OM 3536, OM 4900, OM 4059, OM 2395, OM 4887 cho kết quả đối kháng thực vật cao và gây giảm chiều dài rễ lần lượt là rau diếp (50,7 và 51,6%), cải xoong (40,1 và 81,5%) và lúa cỏ (79,4 và 81,5%). Tuy đối tượng thử nghiệm khác, nhưng lấy kết quả của cải xoong (40,1 và 81,5%) so với kết quả thí nghiệm ghi nhận ở hình 4 cho hiệu quả ức chế của 8 giống lúa OM đối với sự sinh trưởng của cải xoong (30,9 và 41,0%) tương đối thấp. Điều này có thể giải thích do khả năng đối kháng thực vật bằng cách sử dụng dịch trích cây lúa bao giờ cũng cao hơn khi sử dụng cây trồng thử nghiệm cho nảy mầm trong cùng một môi trường trực tiếp với cây lúa.

Kết luận

Các giống lúa OM (4498, 3536, 5930, 2395, 6976, 7347, 5451 và N406) cho khả năng đối kháng trực tiếp khác nhau với sự sinh trưởng của các loại cây thử nghiệm. Trong đó, giống OM 5930 cho hiệu quả ức chế cao nhất đối với chiều dài thân và rễ của cỏ lồng vục nước (28,9 và 40,4%), cỏ đuôi phụng (47,1 và 48,7%), cỏ chác (49,8 và 57,5%), cải bẹ xanh (45,0 và 47,1%) và cải xoong (45,8 và 58,3%). Ngược lại giống OM 7347 cho hiệu quả ức chế thấp nhất đối với chiều dài thân và rễ của cỏ lồng vục nước (10,6 và 11,7%), cỏ đuôi phụng (17,6 và 22,5%), cỏ chác (22,1 và 26,7%), cải bẹ xanh (23,1 và 24,9%) và cải xoong (17,5 và 24,2%). Hiệu quả ức chế trung bình của các giống lúa đối với sự sinh trưởng của cỏ lồng vục nước (17,9 và 32,4%) thấp hơn so với cỏ đuôi phụng (31,6 và 34,6%) và cỏ chác (31,0 và 39,2%). Kết quả đã chỉ ra nhóm 4 giống lúa OM theo thứ tự ưu tiên từ cao đến thấp (5930, 6976, 5451 và 3536) có thể sử dụng để nghiên cứu sâu hơn trong chương trình phòng trừ cỏ dại trong ruộng lúa bằng biện pháp sinh học.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này được hỗ trợ tài chính bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) thông qua Dự án mã số 106.03-2017.45. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.L. Zimdahl (2010), *A history of weed science in the United State*, Elsevier Inc.
- [2] Phùng Đăng Chinh, Lương Hữu Tề, Lê Trường (1978), *Cỏ dại và biện pháp phòng trừ*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [3] Viện Nghiên cứu chiến lược thương hiệu và cạnh tranh (2017), http://vibiz.vn/tin-tuc/vibiz_xep-hang-cac-doanh-nghiep-tbvtv-uy-tin-dat-duoc-su-hai-long-cua-khach-hang.html.
- [4] K.U. Kim, D.H. Shin, I.J. Lee, H.Y. Kim (2000), *Rice allelopathy in Korea, Rice allelopathy*, Kyungpook National University (Korea), pp.57-82.
- [5] Ho Le Thi, et al. (2014), "Isolation and identification of an allelopathic phenylethylamine in rice", *Phytochemistry*, **108**, pp.109-121.
- [6] M. Olofsdotter (2001), "Rice-a step toward use of allelopathy", *Agronomy Journal*, **93**, pp.3-8.
- [7] M.K. Amb, A.S. Ahluwalia (2016), "Allelopathy: Potential role to achieve new milestones in rice cultivation", *Rice Science*, **23**(4), pp.165-183.
- [8] S.B. Lee, K.H. Kim, S.J. Hahn, I.M. Chung (2003), "Evaluation of screening methods to determine the allelopathic potential of rice varieties against *Echinochloa crus-galli*. Beauv. var. *oryzicola* Ohwi", *Allelopathy Journal*, **12**, pp.37-52.
- [9] D.P.M. Chau, T.T. Kieu, D.V. Chin (2008), "Allelopathic effects of Vietnamese rice varieties", *Allelo. J.*, **22**, pp.409-412.

Đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn nảy mầm của một số mẫu giống lúa cận địa phương thu thập tại tỉnh Sơn La

Vì Thị Xuân Thủy^{1*}, Lò Thị Mai Thu¹, Vũ Việt Dũng²

¹Trường Đại học Tây Bắc

²Trường Cao đẳng Sơn La

Ngày nhận bài 25/6/2019; ngày chuyển phản biện 1/7/2019; ngày nhận phản biện 5/8/2019; ngày chấp nhận đăng 19/8/2019

Tóm tắt:

Với cây trồng nói chung, hạn có thể làm giảm tới 70% năng suất, trong khi cây lúa được xếp vào nhóm chịu hạn kém nhất nên ảnh hưởng của hạn càng trở nên nặng nề hơn. Bài báo trình bày kết quả đánh giá một số chỉ tiêu liên quan đến khả năng chịu hạn ở giai đoạn nảy mầm của 5 mẫu giống lúa cận địa phương thu thập tại tỉnh Sơn La, làm cơ sở cho việc lựa chọn các giống lúa có khả năng chịu hạn tốt, phổ biến vào sản xuất. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu giống SM2 có khả năng chịu hạn tốt nhất, tiếp đến là các mẫu giống YC, SM1, MS2 và thấp nhất là MS1.

Từ khóa: α -amylase, chịu hạn, lúa, nảy mầm, protease, Sơn La.

Chỉ số phân loại: 4.1

Assessment on drought tolerance of some local rice varieties collected in Son La province at the germination stage

Thi Xuan Thuy Vi^{1*}, Thi Mai Thu Lo¹, Viet Dung Vu²

¹Tay Bac University

²Son La College

Received 25 June 2019; accepted 19 August 2019

Abstract:

Drought that can generally reduce up to 70% of crop yield, whereas rice is considered to have the worst droughty tolerance, so the impact of drought on it is more serious. In this study, the assessment on the drought tolerance of five local rice varieties collected in Son La province at the germination stage was implemented through the indicators related. Results from the study showed that, SM2 varieties had the best drought tolerance, followed by YC, SM1, MS2 and MS1 ones. The results could be a good basis for screening the droughty tolerant rice cultivars in the future.

Keywords: α -amylase, drought tolerance, germination, protease, rice, Son La.

Classification number: 4.1

Mở đầu

Lúa (*Oryza Sativa* L.) là cây lương thực chính của hơn nửa số dân trên trái đất và là cây lương thực quan trọng nhất của nước ta. Việt Nam là nước có nghề trồng lúa từ lâu đời và được coi là trung tâm đa dạng về cây lúa trồng. Năm 2018, diện tích trồng lúa của cả nước là hơn 7.700 nghìn ha, trong đó tỉnh Sơn La có 51 nghìn ha (Tổng cục Thống kê năm, 2017). Lúa không chỉ có ý nghĩa về mặt an ninh lương thực mà còn có ý nghĩa kinh tế với đa số nông dân, nhất là các dân tộc miền núi.

Hạn là yếu tố ảnh hưởng lớn nhất đến an ninh lương thực thế giới, có thể làm giảm tới 70% năng suất cây trồng nói chung, trong khi lúa được xếp vào nhóm chịu hạn kém nhất [1, 2].

Cùng với lúa nước, lúa cạn ở Việt Nam có ý nghĩa quan trọng trong đời sống của người dân miền núi, tuy năng suất có thấp hơn nhưng khả năng chịu hạn tốt, thích nghi cao với điều kiện khí hậu khó khăn, đồng thời có chất lượng gạo tốt, cơm dẻo, thơm, phù hợp với thị hiếu người tiêu dùng và có thể phục vụ cho xuất khẩu [3, 4]. Hiện nay do việc canh tác còn phân tán, tự phát, chưa có khoanh vùng và định hướng phát triển nên nhiều giống lúa cạn có chất lượng bị mất dần, diện tích trồng lúa cạn bị thu hẹp. Vì vậy, việc tuyển chọn các giống lúa cạn có chất lượng tốt, khả năng chịu hạn cao

*Tác giả liên hệ: Email: xuanthuy@utb.edu.vn

làm vật liệu ban đầu phục vụ cho công tác chọn tạo giống lúa có khả năng chịu hạn trở thành một vấn đề cấp thiết.

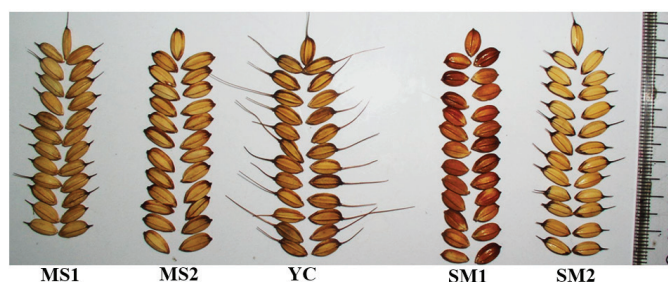
Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Sử dụng 5 giống lúa cận địa phương thu thập tại tỉnh Sơn La, với đặc điểm hình thái và kích thước của các mẫu được trình bày ở bảng 1 và hình 1 theo phương pháp cho điểm của IRRI [5].

Bảng 1. Các giống lúa cận sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

TT	Ký hiệu mẫu	Tên địa phương	Màu sắc vỏ trấu (điểm)	Độ phủ lông vỏ trấu (điểm)	Độ dài râu đầu hạt (điểm)	Khối lượng 1000 hạt (g)	Địa điểm thu mẫu
1	MS1	Khaurualon	10 (trắng)	2 (có lông bao phủ)	4 (râu dài đến 4 mm)	33,8±0,132	Xã Chiềng Kheo, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La
2	MS2	Khautan	6 (chấm tím trên nền vàng rơm)	1 (nhẵn)	0 (không có râu)	34,8±0,263	Xã Mường Chanh, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La
3	YC	Khautanhay	1 (có vành và rãnh màu vàng trên nền vàng rơm)	2 (có lông bao phủ)	9 (râu rất dài: 9-20 mm)	34,3±0,423	Xã Tú Nang, huyện Yên Châu, tỉnh Sơn La
4	SM1	Khautanlanh	5 (đỏ đến tím nhạt)	1 (nhẵn)	0 (không có râu)	36,7±0,274	Xã Chiềng Cang, huyện Sông Mã, tỉnh Sơn La
5	SM2	Khaule	6 (có rãnh nâu trên nền vàng rơm)	1 (nhẵn)	5 (râu dài đến 5 mm)	34,7±0,381	Xã Chiềng Sơ, huyện Sông Mã, tỉnh Sơn La



Hình 1. Hình thái hạt của các mẫu giống lúa nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu: hạt của các mẫu giống lúa nghiên cứu được xử lý nhiệt 60°C trong 15 phút, ngâm nước trong 24h, sau đó ủ trong dung dịch MS chứa sorbitol 5% (để gây hạn sinh lý). Hạt nảy mầm sau các thời gian ủ 3, 5, 7 và 9 ngày được sử dụng để xác định hoạt độ của α -amylase, hàm lượng đường tan, hoạt độ của protease và hàm lượng protein tan.

Xác định hoạt độ α -amylase: i) Định lượng hoạt độ α -amylase: hoạt độ α -amylase theo phương pháp của Heilken được mô tả bởi Nguyễn Lâm Dũng (1979) [6]; ii) Định tính hoạt độ α -amylase (để có hình ảnh trực quan hơn): cho hỗn hợp dịch gồm thạch agar 2%, tinh bột 1% và nước cất vào bình tam giác, đun cách thủy cho tan thạch, đổ vào đĩa petri dày 4 mm để nguội, đục lỗ đường kính 9 mm. Nhỏ 100 μ l dịch chiết chứa enzyme vào mỗi lỗ, để tủ lạnh qua đêm để enzyme khuếch tán, chuyển sang tủ ấm ở 30°C trong 24h. Nhuộm bằng lugol 5 phút và tráng lại bằng NaCl 1 N.

Xác định hàm lượng đường tan: hàm lượng đường được xác định theo phương pháp vi phân tích được mô tả bởi Phạm Thị Trân Châu và cs (1997) [7].

Xác định hoạt độ protease: i) Định lượng hoạt độ protease: hoạt độ protease xác định theo phương pháp Anson được mô tả bởi Nguyễn Văn Mùi (2001) [8]; ii) Định tính hoạt độ protease: tiến hành tương tự như định tính hoạt độ α -amylase, cơ chất là gelatin 1%.

Xác định hàm lượng protein tan: hàm lượng protein tan được xác định theo phương pháp Lowry được mô tả bởi Phạm Thị Trân Châu và cs (1997) [7].

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của hạn sinh lý đến hoạt độ của α -amylase của các mẫu giống lúa ở giai đoạn nảy mầm

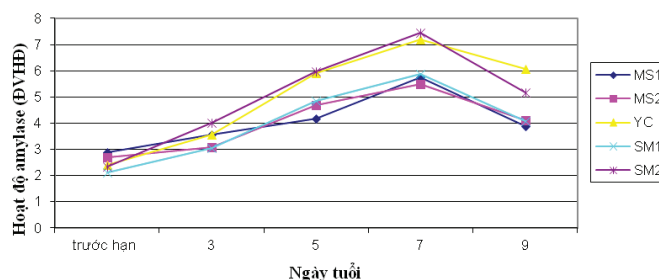
Amylase là enzyme phân giải tinh bột, xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết 1-4 glucosit của tinh bột và một số polysacarit khác. Sự gia tăng hoạt độ của α -amylase làm tăng hàm lượng đường do tinh bột bị thủy phân cung cấp năng lượng cho quá trình nảy mầm của hạt. Khi hoạt độ α -amylase tăng lên, hàm lượng đường tăng theo nên áp suất thẩm thấu của tế bào tăng, nhờ đó mà thực vật có khả năng chống lại sự mất nước ở giai đoạn nảy mầm. Đây là điều rất có ý nghĩa đối với quá trình nảy mầm của hạt, vì nó đảm bảo cho sự phát triển của mầm và cây non trong điều kiện thiếu nước. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng chịu hạn của các giống lúa thông qua sự thay đổi hoạt độ của α -amylase và biến động hàm lượng đường tan ở giai đoạn nảy mầm trong điều kiện gây hạn sinh lý bằng cách bổ sung sorbitol 5%.

Hoạt độ α -amylase được xác định thông qua hàm lượng tinh bột bị thủy phân ở 30°C trong 30 phút, dựa vào đồ thị chuẩn tinh bột với giá trị OD đo ở bước sóng 560 nm. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Hoạt độ α -amylase của các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%.

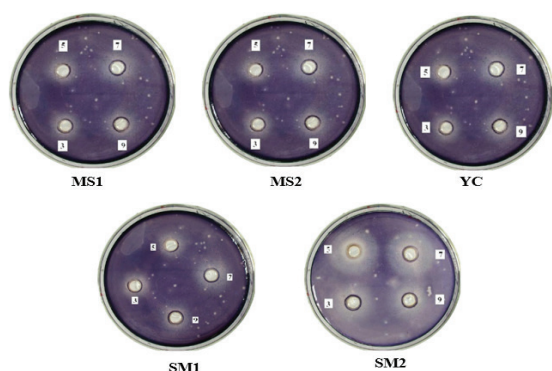
Ký hiệu mẫu	Hoạt độ enzyme α -amylase (ĐVHD/mg hạt nảy mầm)				
	Trước hạn	3 ngày tuổi	5 ngày tuổi	7 ngày tuổi	9 ngày tuổi
MS1	2,90 $\pm$ 0,217	3,57 $\pm$ 0,614	4,19 $\pm$ 0,177	5,75 $\pm$ 0,334	3,87 $\pm$ 0,820
MS2	2,71 $\pm$ 0,293	3,07 $\pm$ 0,134	4,69 $\pm$ 0,236	5,48 $\pm$ 0,118	4,11 $\pm$ 0,194
YC	2,41 $\pm$ 0,166	3,57 $\pm$ 0,525	5,91 $\pm$ 0,156	7,18 $\pm$ 0,298	6,07 $\pm$ 0,845
SM1	2,13 $\pm$ 0,352	3,04 $\pm$ 0,115	4,86 $\pm$ 0,375	5,89 $\pm$ 0,427	4,08 $\pm$ 0,654
SM2	2,35 $\pm$ 0,081	4,01 $\pm$ 0,826	5,97 $\pm$ 0,464	7,44 $\pm$ 0,236	5,17 $\pm$ 0,512

ĐVHD: đơn vị hoạt độ.



Hình 2. Đồ thị biểu hiện hoạt độ α -amylase của các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%.

Số liệu bảng 2 và hình 2 cho thấy, hoạt độ α -amylase khác nhau ở các mẫu giống lúa và thời gian gây hạn khác nhau. Xu hướng chung của sự biến động này là hoạt độ α -amylase tăng dần trong 7 ngày gây hạn và cao nhất ở ngày hạn thứ 7, sau đó giảm dần ở 9 ngày. Tại thời điểm 7 ngày tuổi hoạt độ của α -amylase cả 5 giống đều tăng so với thời điểm trước gây hạn sinh lý bằng sorbitol, trong đó mẫu giống SM2 có hoạt độ α -amylase tăng 3,17 lần so với trước thời điểm gây hạn sinh lý, tiếp đến là mẫu giống YC (tăng 2,98 lần), mẫu giống SM1 (tăng 2,77 lần), mẫu giống MS2 (tăng 2,02 lần) và tăng thấp nhất là giống MS1 (1,98 lần). Để khẳng định thêm và trực quan hơn về sự biến động của hoạt độ α -amylase, chúng tôi tiến hành định tính hoạt độ α -amylase của các mẫu giống lúa, kết quả thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Hình ảnh định tính hoạt độ α -amylase của các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%. 3: 3 ngày tuổi; 5: 5 ngày tuổi; 7: 7 ngày tuổi; 9: 9 ngày tuổi.

Các kết quả trên đây cho thấy, sorbitol có tác động đến hoạt độ của α -amylase ở giai đoạn nảy mầm và sự ảnh hưởng này có sự khác nhau giữa các mẫu giống lúa, phụ thuộc vào khả năng chịu hạn của từng giống.

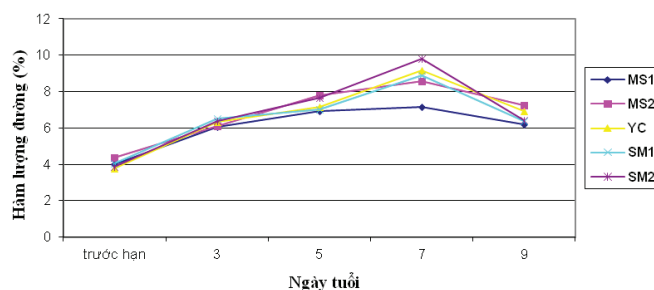
Ảnh hưởng của hạn sinh lý đến hàm lượng đường của các mẫu giống lúa ở giai đoạn nảy mầm

Hàm lượng đường tan trong tế bào đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh áp suất thẩm thấu của dịch bào khi cây gặp điều kiện ngoại cảnh bất lợi. Vì vậy, chúng tôi khảo sát hàm lượng đường ở giai đoạn nảy mầm với mục đích tìm mối liên quan đến khả năng chịu hạn của các giống lúa. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng đường tan của các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%.

Ký hiệu mẫu	Hàm lượng đường tan (%)				
	Trước hạn	3 ngày tuổi	5 ngày tuổi	7 ngày tuổi	9 ngày tuổi
MS1	4,02 $\pm$ 0,241	6,08 $\pm$ 0,125	6,91 $\pm$ 0,243	7,15 $\pm$ 0,191	6,19 $\pm$ 0,425
MS2	4,35 $\pm$ 0,312	6,11 $\pm$ 0,656	7,78 $\pm$ 0,186	8,56 $\pm$ 0,633	7,23 $\pm$ 0,324
YC	3,79 $\pm$ 0,623	6,33 $\pm$ 0,236	7,17 $\pm$ 0,875	9,17 $\pm$ 0,513	6,93 $\pm$ 0,184
SM1	4,07 $\pm$ 0,134	6,52 $\pm$ 0,177	7,03 $\pm$ 0,033	8,87 $\pm$ 0,180	6,39 $\pm$ 0,413
SM2	3,87 $\pm$ 0,285	6,39 $\pm$ 0,185	7,67 $\pm$ 0,363	9,82 $\pm$ 0,542	6,43 $\pm$ 0,530

Kết quả bảng 3, hình 4 cho thấy, trong quá trình hạt nảy mầm, hàm lượng đường tan ở các mẫu thí nghiệm có chung quy luật là tăng từ 3 ngày tuổi đến 7 ngày tuổi và tăng cao nhất ở thời điểm 7 ngày tuổi, sau đó bắt đầu giảm vào giai đoạn 9 ngày tuổi. Sự biến động hàm lượng đường tan giữa các giống có sự khác nhau tương đối rõ. Tại thời điểm 7 ngày tuổi, hàm lượng đường tan của mẫu giống SM2 cao nhất (9,82%), tiếp đến là YC, SM1, MS2 và thấp nhất là MS1 với 7,15%. Sự biến động của hàm lượng đường tan ở thời điểm cao nhất so với trước hạn của giống SM2 lớn nhất (tăng 2,54 lần), tiếp sau là các giống YC (2,42 lần), SM1 (2,18 lần), MS2 (1,97 lần) và thấp nhất là giống MS1 (tăng 1,78 lần).



Hình 4. Đồ thị biểu hiện hàm lượng đường tan của các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%.

Khi tế bào mất nước, các chất hòa tan được tích lũy trong tế bào nhằm làm tăng khả năng giữ nước của chất nguyên sinh. Đây là một phương thức thích nghi của thực vật với stress của môi trường [9]. Kết quả nghiên cứu về hàm lượng đường tan trong giai đoạn nảy mầm của các giống lúa khi gây hạn sinh lý bằng sorbitol 5% phù hợp với những nhận định trên.

Hoạt độ của α -amylase càng cao thì hàm lượng đường tan càng lớn, cung cấp cho quá trình nảy mầm của hạt, sự sinh trưởng của mầm và điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào trong điều kiện cực đoan. Giữa các mẫu giống có sự thay đổi về hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường tan khác nhau liên quan đến khả năng chống chịu của từng giống.

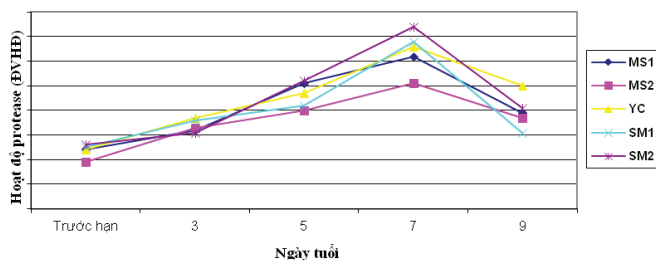
Ảnh hưởng của hạn sinh lý đến hoạt độ của protease của các giống lúa ở giai đoạn nảy mầm

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hạn sinh lý đến hoạt độ của protease ở giai đoạn nảy mầm của các mẫu giống lúa nghiên cứu được trình bày ở bảng 4, hình 5 và 6.

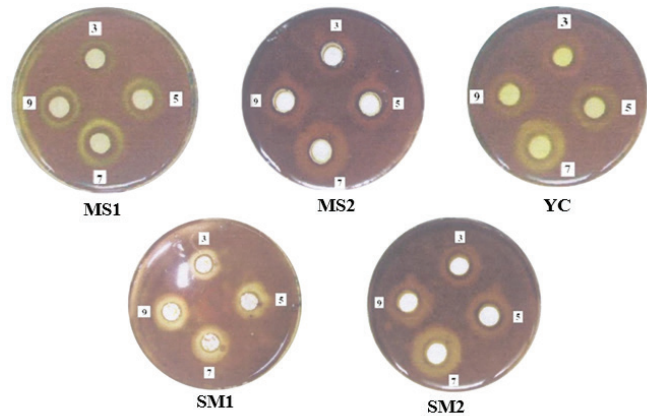
Bảng 4. Hoạt độ protease của các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%.

Ký hiệu mẫu	Hoạt độ của enzyme protease (ĐVHĐ/mg)				
	Trước hạn	3 ngày tuổi	5 ngày tuổi	7 ngày tuổi	9 ngày tuổi
MS1	0,24±0,551	0,32±0,342	0,51±0,173	0,62±0,114	0,39±0,715
MS2	0,19±0,309	0,33±0,219	0,40±0,838	0,51±0,067	0,37±0,566
YC	0,24±0,268	0,37±0,314	0,47±0,148	0,66±0,510	0,50±0,074
SM1	0,25±0,823	0,36±0,865	0,42±0,267	0,68±0,282	0,31±0,814
SM2	0,26±0,182	0,31±0,115	0,52±0,376	0,74±0,093	0,41±0,645

Qua số liệu bảng 4, hình 5 chúng ta thấy, hoạt độ của protease của mỗi giống biểu hiện khác nhau. Sự biến động hoạt độ của các giống tuân theo quy luật, tăng dần theo thời gian ở giai đoạn từ 3 đến 7 ngày, sau đó giảm cho đến 9 ngày sau khi gây hạn nhân tạo. Tại thời điểm 7 ngày tuổi hoạt độ protease của giống SM2 đạt cao nhất (0,74 ĐVHĐ/mg), thấp nhất là giống MS2 (0,51 ĐVHĐ/mg). Nhưng nếu xét về tỷ lệ tăng so với trước khi gây hạn sinh lý, giống SM2 xếp hàng đầu (tăng 2,85 lần), tiếp đến là giống YC (tăng 2,75 lần), SM1 (2,72 lần), MS2 (2,68 lần) và thấp nhất là giống MS1 (2,58 lần). Sự biến động này cũng thể hiện ở hình 6.



Hình 5. Đồ thị biểu hiện hoạt độ protease của các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%.



Hình 6. Hình ảnh định tính hoạt độ protease của các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%. 3: 3 ngày tuổi; 5: 5 ngày tuổi; 7: 7 ngày tuổi; 9: 9 ngày tuổi.

Trong giai đoạn nảy mầm, khi xử lý hạn sinh lý thì sự biến động hoạt độ của protease sẽ làm tăng áp suất thẩm thấu của tế bào thông qua các phân tử chất tan do protein bị phân giải, qua đó làm tăng tính chống chịu của cây trồng.

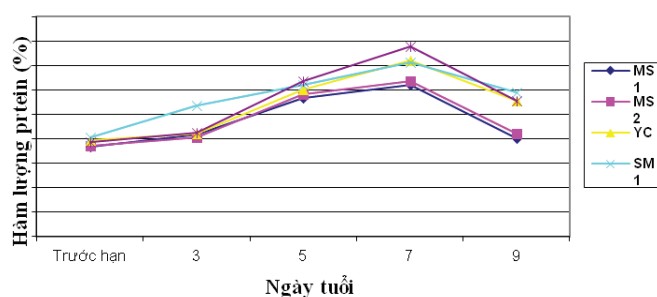
Ảnh hưởng của hạn sinh lý đến hàm lượng protein tan của các giống lúa ở giai đoạn nảy mầm

Protein dự trữ trong hạt là nguồn cung cấp các chất cho hạt nảy mầm và cây sinh trưởng, phát triển. Phân tích sự biến động protein của các giống lúa tại thời điểm 3, 5, 7 và 9 ngày tuổi gây hạn ở giai đoạn nảy mầm, chúng tôi thu được kết quả ở bảng 5 và hình 7.

Bảng 5. Hàm lượng protein tan của các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%.

Ký hiệu mẫu	Hàm lượng protein của các giống lúa (%)				
	Trước hạn	3 ngày tuổi	5 ngày tuổi	7 ngày tuổi	9 ngày tuổi
MS1	1,83±0,131	2,08±0,314	2,83±0,173	3,11±0,113	2,01±0,715
MS2	1,86±0,021	2,04±0,180	2,91±0,833	3,18±0,061	2,11±0,565
YC	1,97±0,124	2,11±0,328	3,01±0,144	3,60±0,512	2,78±0,174
SM1	2,03±0,926	2,69±0,184	3,11±0,265	3,57±0,286	2,95±0,074
SM2	1,94±0,127	2,12±0,812	3,19±0,375	3,89±0,095	2,78±0,640

Số liệu bảng 5 và hình 7 cho thấy, hàm lượng protein của các giống lúa tăng từ giai đoạn 3 đến 7 ngày tuổi, ở 9 ngày tuổi hàm lượng protein bắt đầu giảm. Giống có hàm lượng protein tăng cao nhất ở giai đoạn nảy mầm là SM2 với hàm lượng protein tương ứng của trước hạn và 3, 5, 7 ngày tuổi lần lượt là 1,94 và 2,12, 3,19, 3,89% và giảm ở 9 ngày tuổi 2,78%. Ở 7 ngày tuổi so với trước hạn, giống SM2 có hàm lượng protein tăng từ 1,94 đến 3,89% (tăng 2,0 lần). Giống có hàm lượng tăng thấp nhất là MS1 từ 1,83 lên 3,11% (tăng 1,7 lần). Có thể xếp thứ tự tăng hàm lượng protein của các giống như sau: SM2>YC>SM1>MS2>MS1.



Hình 7. Đồ thị biểu hiện hàm lượng protein các mẫu giống lúa nghiên cứu ở các thời điểm gây hạn bởi sorbitol 5%.

Như vậy, khi xử lý hạn sinh lý bằng dung dịch sorbitol 5%, hoạt độ của protease và hàm lượng protein cũng chỉ đạt đến một giới hạn nhất định tùy thuộc vào khả năng chịu hạn của giống. Hàm lượng protein tan tăng dần tới tăng áp suất thẩm thấu của tế bào, làm tăng khả năng chống chịu của cây. Hoạt độ protease càng cao thì lượng protein được hình thành do quá trình phân giải proetin dự trữ càng nhiều và cung cấp cho quá trình nảy mầm của hạt cũng như điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào trong điều kiện mất nước cực đoạn.

Kết luận

Gây hạn nhân tạo bằng sorbitol 5% đã làm thay đổi hoạt độ α -amylase, hàm lượng đường tan, hoạt độ protease, hàm lượng protein trong giai đoạn nảy mầm của các giống lúa cạn thu thập tại Sơn La và sự thay đổi này có sự khác nhau tương đối rõ giữa các giống, phụ thuộc vào khả năng chịu hạn của chúng.

Trong 5 mẫu giống nghiên cứu, mẫu giống SM2 thu thập tại huyện Sông Mã (huyện nóng nhất của tỉnh Sơn La) có khả năng chịu hạn cao nhất, tiếp đến là các mẫu giống YC, SM1, MS2 và thấp nhất là mẫu giống MS1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E.A. Bray, et al. (2000), "Responses to abiotic stresses, biochemistry and molecular biology of plants", *American Society of Plant Physiologist, Rockville*, pp.1158-1249.
- [2] Hoàng Công Mệnh, Hoàng Tuấn Hiệp, Phạm Tiến Dũng (2013), "So sánh một số giống lúa chất lượng trong vụ xuân tại cánh đồng Mường Thanh, huyện Điện Biên", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **11(2)**, tr.161-167.
- [3] Hoàng Mai Phương, Chu Hoàng Mậu (2001), "Nghiên cứu thành phần di protein dự trữ hạt của một số giống lúa cạn và các dòng lạc đột biến", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, **1(1)**, tr.32-38.
- [4] Nguyễn Văn Khoa, Nguyễn Thị Kim Thanh (2012), "Nghiên cứu khả năng chịu hạn và năng suất của các mẫu giống lúa nương tại huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **10(1)**, tr.58-65.
- [5] IRRI (2002), *Standard Evaluation System for Rice*, International Rice Research Institute.
- [6] Nguyễn Lâm Dũng (1979), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật*, **Tập 3**, Nhà xuất bản Giáo dục.
- [7] Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền, Phùng Gia Tường (1997), *Thực hành hoá sinh học*, Nhà xuất bản Giáo dục.
- [8] Nguyễn Văn Mùi (2001), *Thực hành hoá sinh học*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [9] Đinh Thị Phòng (2001), *Nghiên cứu khả năng chịu hạn và chọn dòng chịu hạn ở lúa bằng công nghệ tế bào thực vật*, Luận án tiến sĩ sinh học, Viện Công nghệ Sinh học.

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể của nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*

Vũ Hoài Nam^{1*}, Ma Thị Trang¹, Trần Văn Phùng¹, Nguyễn Huy Thuận², Dương Văn Cường^{1,3}

¹Viện Khoa học Sự sống, Đại học Thái Nguyên

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao, Trường Đại học Duy Tân

³Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên

Ngày nhận bài 9/7/2019; ngày chuyển phản biện 15/7/2019; ngày nhận phản biện 19/8/2019; ngày chấp nhận đăng 27/8/2019

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là một loại nấm dược liệu có nhiều tác dụng sinh học quý. Sự hình thành quả thể không ổn định là một rào cản đối với sản xuất ở quy mô công nghiệp. Trong nghiên cứu này, các điều kiện nuôi trồng nấm trên môi trường thạch agar được khảo sát để tìm ra môi trường nhân giống cấp 1 tốt nhất. Kết quả cho thấy, môi trường PDA có bổ sung 10 g/l pepton cho khả năng sinh trưởng tốt nhất: tốc độ tăng trưởng đạt 4,8 mm/ngày, đường kính khuẩn lạc đạt 9,74 cm sau 20 ngày nuôi cấy. Nuôi trồng thử nghiệm trên môi trường nhân tạo thể rắn cho thời gian ăn kín cơ chất 9,12 ngày, thời gian xuất hiện mầm quả thể 15,37 ngày, số lượng đạt 36,51 quả thể/bình, chiều dài trung bình quả thể là 68,24 mm, năng suất sinh học đạt 12,43%.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, môi trường nhân giống cấp 1, nấm Đông trùng hạ thảo, PDA.

Chỉ số phân loại: 4.1

Mở đầu

Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) là một loại nấm dược liệu, được sử dụng lâu đời trong y học Trung Hoa. Nhiều hợp chất sinh học đã được tách chiết từ nấm *C. militaris*, như: polysaccharit, cordycepin, adenosine, axit amin, ergosterol, superoxide effutase (SOD), selen hữu cơ và vitamin tổng hợp [1, 2]. Các nghiên cứu cho thấy *C. militaris* có nhiều chức năng dược lý như: chống viêm [3], chống xơ hóa [4], ức chế tăng trưởng của các tế bào ung thư bạch cầu U937 [5], điều hòa miễn dịch [6], cải thiện bài tiết insulin [7], tăng cường chức năng gan [8], thận [9], phổi [10].

Hiện nay, sản lượng khai thác nấm *C. militaris* trong tự nhiên không đủ đáp ứng nhu cầu thị trường. Các phương pháp nuôi trồng nhân tạo để thu sinh khối hay lên men dịch thể nhằm thu hồi hoạt chất được áp dụng mạnh mẽ [11]. Tuy nhiên, sự hình thành quả thể không ổn định đang là rào cản đối với quá trình nuôi trồng nấm *C. militaris*. Thành phần môi trường dinh dưỡng có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất, cung cấp năng lượng cho các hoạt động sống của tế bào, từ đó ảnh hưởng trực tiếp tới chất lượng của giống. Vladimir (2012) khẳng định carbon là thành phần

chủ yếu trong môi trường nhân giống *C. Militaris*, đảm bảo sự sinh trưởng và tổng hợp các hợp chất sinh học cần thiết, còn nitơ có vai trò trong quá trình sinh tổng hợp các enzyme cần thiết cho quá trình chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp của nấm [12]. Tuy nhiên, các nghiên cứu sâu rộng về mối quan hệ giữa điều kiện dinh dưỡng nuôi trồng giống cấp 1 tới năng suất tạo quả thể nấm *C. militaris* còn khiêm tốn. Với mục tiêu phục vụ công tác nghiên cứu, phát triển công nghệ nuôi trồng nấm *C. militaris*, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể của nấm *C. militaris*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Giống gốc *C. militaris* nhập khẩu từ Trung tâm Tài nguyên sinh vật NITE, Nhật Bản, được hoạt hóa trên môi trường thạch PDA và nuôi ở điều kiện 23°C, trong 14 ngày, sau đó bảo quản ở 4°C.

Phương pháp nuôi cấy

Môi trường nhân giống cấp 1: 5 loại môi trường nhân giống cấp 1 được chia ra thành 3 nhóm môi trường: môi

* Tác giả liên hệ: Email: vuhoainam.tuaf@gmail.com

Effect of agar plate method on the formation of *Cordyceps militaris* fruiting body

Hoai Nam Vu^{1*}, Thi Trang Ma¹, Van Phung Tran¹,
Huy Thuan Nguyen², Van Cuong Duong^{1,3}

¹Institute of Life Sciences, Thai Nguyen University

²Institute of Research and Development, Duy Tan University

³Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

Received 9 July 2019; accepted 27 August 2019

Abstract:

Cordyceps militaris is a type of medicinal mushroom with many precious biological effects. However, unstable formation of fruiting bodies is considered a barrier for industrial production. In this study, the mushroom cultivating conditions on agar have been investigated in order to find out the best level 1 propagation medium. The results showed that, the PDA culture medium with supplement of 10 g/l peptone provided the best growth: growth rate achieved 4.8 mm/day, and colony diameter got 9.74 cm after 20 days of cultivation. The trials on solid medium exhibited that the time of mechanical covering substrates was 9.12 days, the duration of appearance of fruiting body germs was 15.37 days, the number reached 36.51 fruiting bodies/bottle, the average length of fruiting bodies was 68.24 mm, and the biological efficiency was 12.43%.

Keywords: *Cordyceps militaris*, level 1 propagation medium, mushroom, PDA.

Classification number: 4.1

trường nghèo dinh dưỡng, môi trường dinh dưỡng trung bình, môi trường giàu dinh dưỡng. Căn chỉnh xác thành phần dinh dưỡng của các môi trường (bảng 1) pha với 1 lít nước và được hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút, dịch dinh dưỡng được chia đều vào các đĩa petri đường kính 10 cm (15 ml/đĩa), làm nguội và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Chúng giống gốc sau khi hoạt hóa, được cắt thành các ô vuông cạnh 0,5 cm chứa hệ sợi nấm và đặt vào đĩa petri. Sau đó, các đĩa môi trường nhân giống cấp 1 được nuôi ở 23°C, trong điều kiện không chiếu sáng.

Bảng 1. Các loại môi trường nhân giống cấp 1.

Phân loại	Môi trường	Thành phần dinh dưỡng	Tác giả
Nghèo dinh dưỡng	Water agar (WA)	Agar 20 g/l	[13]
Dinh dưỡng trung bình	Malt extract - Yeast extract - Peptone Dextrose agar (MYPS)	Dextrose 10 g/l, glucose 4 g/l, pepton 6 g/l, cao nấm men 4 g/l, agar 20 g/l	[13]
	Sabouraud Dextrose agar plus Yeast Extract (SDAY)	Dextrose 10 g/l, peptone 2,5 g/l, cao nấm men 5 g/l, agar 20 g/l	[14]
Giàu dinh dưỡng	Potato - Dextrose agar (PDA)	Dịch chiết khoai tây 200 g/l, dextrose 20 g/l, agar 20 g/l	[15]
	Sabouraud Maltose agar plus Yeast Extract (SMAY)	Maltose 40 g/l, peptone 10 g/l, cao nấm men 10 g/l, agar 20 g/l	[14]

Chuẩn bị giống dịch thể và cấy giống: để khảo sát ảnh hưởng của các môi trường nhân giống cấp 1 tới sự hình thành quả thể nấm trên môi trường nhân tạo, các đĩa giống cấp 1 sau 15 ngày nuôi được bổ sung 50 ml nước cất đã khử trùng. Dịch huyền phù chứa bào tử nấm được lọc qua băng gạc tiệt trùng trước khi cho vào bình tam giác chứa 200 ml môi trường dinh dưỡng (20 g/l sucrose, 20 g/l peptone, 0,5 g/l $MgSO_4$, 1 g/l K_2HPO_4), và được nuôi ở điều kiện nhiệt độ 20°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 7 ngày.

Môi trường giá thể 20 g gạo lức pha với 32 ml dung dịch dinh dưỡng (20 g/l sucrose, 10 g/l peptone, 0,1 g/l $MgSO_4$, 0,1 g/l KH_2PO_4) đựng trong bình thủy tinh 500 ml, hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút, làm lạnh ở nhiệt độ phòng trước khi được cấy 5 ml dung dịch giống. Nấm sau khi cấy trên các loại môi trường, chuyển vào nuôi trong điều kiện không chiếu sáng để phát sinh sợi nấm. Sau khi các bình nấm có hệ sợi phát triển kín bề mặt, chuyển sang môi trường 12h chiếu sáng - 12h tối ở nhiệt độ 20°C, độ ẩm >80% để tạo quả thể.

Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn toàn với 3 lần nhắc lại.

+ Giai đoạn nhân giống cấp 1: mỗi công thức thí nghiệm được thực hiện với 10 đĩa/lần nhắc lại. Các yếu tố theo dõi bao gồm: tốc độ phát triển hệ sợi (mm/ngày), hình thái hệ sợi và mật độ hệ sợi.

+ Giai đoạn ươm tạo quả thể: mỗi công thức thí nghiệm bố trí 30 lọ cơ chất cho 1 lần nhắc lại. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: thời gian phát triển hệ sợi/ngày, thời gian xuất hiện mầm quả thể/ngày, số lượng quả thể (quả thể/bình), chiều dài quả thể (cm), năng suất sinh học (%).

Chỉ tiêu năng suất sinh học (BE) được tính bằng công thức:

$$BE(\%) = \frac{\text{khối lượng quả thể khô} \times 100}{\text{Khối lượng cơ chất}}$$

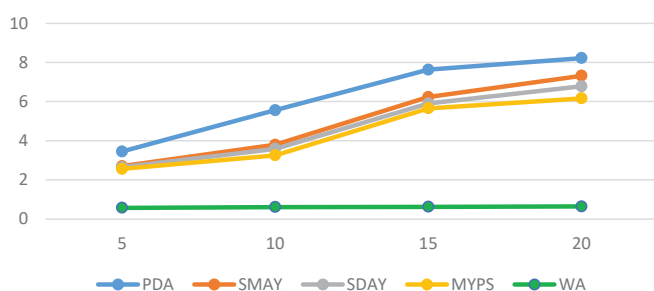
Các thí nghiệm được thống kê, loại bỏ các giá trị bất

thường bằng phương pháp Duncan. Phân tích giá trị ANOVA bằng chương trình IRISTART 4.0 và phần mềm Excel 2013.

Kết quả và thảo luận

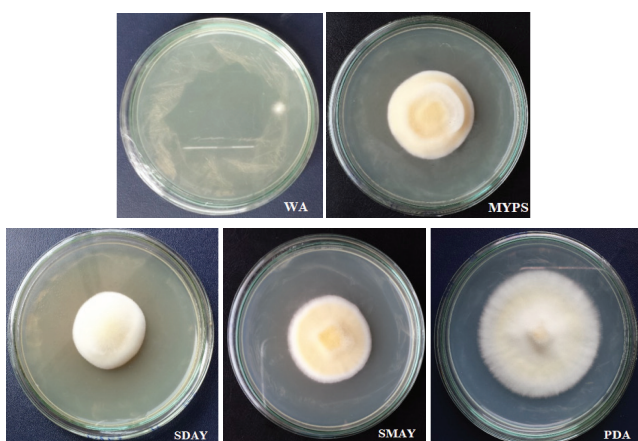
Kết quả khảo sát các môi trường nhân giống cấp 1

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của 5 loại môi trường cấp 1 được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm *C. militaris* trên môi trường nhân giống cấp 1.

Kết quả hình 1 cho thấy, trong giai đoạn nhân giống cấp 1, các loại môi trường dinh dưỡng khác nhau ảnh hưởng khác nhau đến sự sinh trưởng hệ sợi nấm *C. militaris*. Nhìn chung trên các loại môi trường đều có sự thích nghi của hệ sợi nấm. Trên môi trường nghèo dinh dưỡng, hệ sợi phát triển kém và gần như không có sự gia tăng về kích thước khuẩn lạc. Trên 2 nhóm môi trường dinh dưỡng trung bình và giàu, hệ sợi phát triển mạnh, mọc dài, thẳng, tròn đều về các phía và bông xốp (hình 2). Tốc độ sinh trưởng tốt nhất ở môi trường PDA, đường kính khuẩn lạc đạt 8,22 cm sau 20 ngày nuôi cấy (tốc độ tăng trưởng đường kính trung bình 4,11 mm/ngày).



Hình 2. Hệ sợi nấm *C. militaris* trên các môi trường nhân giống cấp 1 sau 10 ngày nuôi cấy.

Về mật độ hệ sợi, mặc dù có thể nhận thấy ở các nhóm môi trường giàu dinh dưỡng nấm đều có sự phát triển tốt, nhưng cũng có sự khác biệt giữa các loại môi trường. Mật độ hệ sợi

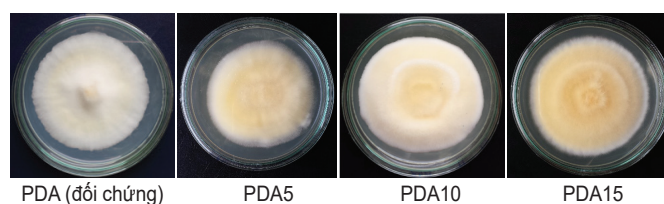
phát triển dày đặc trên môi trường SDAY, hệ sợi phát triển mạnh, đan xen chặt chẽ vào nhau, rất khó có thể quan sát được các nhánh hệ sợi riêng rẽ. Mật độ hệ sợi bắt đầu giảm dần theo thứ tự từ môi trường SDAY>MYPS>SMAY>PDA. Một giả thuyết thú vị được đặt ra là mật độ hệ sợi phụ thuộc vào hàm lượng nitơ tổng số của môi trường. Nitơ đóng vai trò trong quá trình chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp của nấm. Cũng trong một nghiên cứu khác, Vladimir nhận thấy, việc bổ sung nguồn nitơ không phù hợp dẫn tới những ức chế về sự phát triển của hệ sợi nấm [12]. Do đó, để kiểm định giả thuyết này đối với chủng nấm của Trung tâm Tài nguyên sinh vật NITE (Nhật Bản), chúng tôi lựa chọn môi trường PDA có tốc độ phát triển tốt nhất và bổ sung thêm các hàm lượng nitơ khác nhau.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng pepton đến sự phát triển của hệ sợi nấm *C. militaris* trên môi trường nhân giống cấp 1

Để xác định sự ảnh hưởng của pepton đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *C. militaris*, chúng tôi tiến hành bổ sung pepton với các tỷ lệ khác nhau, gồm: 5, 10 và 15 g/l trên nền môi trường PDA tương ứng với các công thức PDA5, PDA10, PDA15. Kết quả thử nghiệm được thể hiện ở bảng 2 và hình 3.

Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến sự phát triển của hệ sợi nấm *C. militaris*.

Môi trường	Đường kính khuẩn lạc của hệ sợi sau các ngày nuôi (cm)			
	5 ngày	10 ngày	15 ngày	20 ngày
PDA	3,5	5,8	7,5	8,9
PDA5	3,7	6,01	8,2	9,15
PDA10	3,8	6,25	8,65	9,74
PDA15	3,8	6,15	8,26	9,31



Hình 3. Hệ sợi nấm *C. militaris* ở môi trường PDA có bổ sung các nồng độ pepton khác nhau sau 15 ngày.

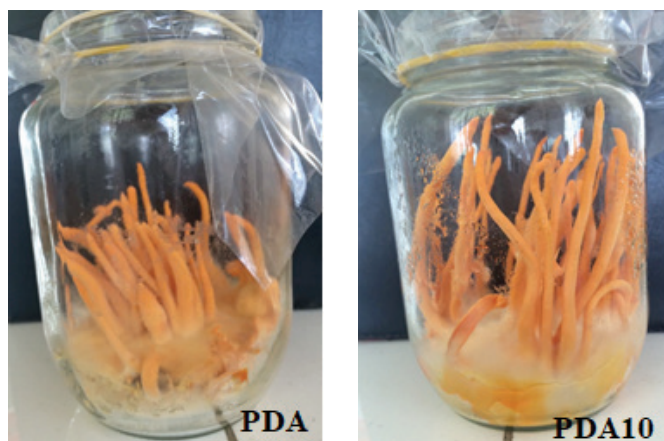
Từ kết quả trên cho thấy, môi trường nhân giống PDA bổ sung pepton có ảnh hưởng tới màu sắc, mật độ và tốc độ phát triển của hệ sợi. Mật độ hệ sợi và khả năng sinh sắc tố càng tăng khi tăng nồng độ pepton. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ pepton lên ngưỡng 15 g/l, tốc độ phát triển hệ sợi nấm có xu hướng giảm so với mức tối ưu là 10 g/l. Do đó, chúng tôi lựa chọn môi trường PDA có bổ sung 10 g/l pepton làm môi trường nhân giống cấp 1 nấm *C. militaris*.

Kết quả khảo sát mối liên hệ giữa môi trường nhân giống cấp 1 tới năng suất tạo quả thể nấm *C. militaris* trên môi trường nhân tạo thể rắn

Để khảo sát mối liên hệ giữa môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể nấm trên môi trường nhân tạo thể rắn, chúng tôi lựa chọn hai loại môi trường: môi trường PDA10 (cho chất lượng giống cấp 1 tốt nhất) và môi trường PDA (đối chứng). Kết quả được thể hiện ở bảng 3, hình 4.

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể nấm *C. militaris*.

CT	Môi trường	Thời gian phát triển hệ sợi (ngày)	Thời gian hình thành mầm (ngày)	Số lượng quả thể (quả thể/bình)	Chiều dài quả thể (mm)	BE (%)
1	PDA	10,71	16,47	35,23	45,66	5,76
2	PDA10	9,12	15,37	36,51	68,24	12,43



Hình 4. Năng suất tạo quả thể nấm *C. militaris* trên môi trường nhân tạo khi sử dụng 2 loại môi trường nhân giống cấp 1 khác nhau.

Từ kết quả trên cho thấy có sự khác biệt về khả năng thích nghi và sinh trưởng của nấm *C. militaris* trên môi trường nhân tạo thể rắn. Khả năng thích nghi, thời gian mọc kín cơ chất và nảy mầm quả thể của nấm *C. militaris* khi sử dụng môi trường giống cấp 1 PDA10 nhanh hơn so với môi trường PDA cơ bản. Về năng suất nhận thấy cũng có sự khác biệt khi sử dụng hai loại môi trường nhân giống này. Mặc dù không có sự khác biệt về số lượng quả thể/bình nuôi trồng, nhưng chiều dài quả thể khi sử dụng giống trên môi trường PDA10 cao hơn vượt trội so với môi trường PDA thông thường. Do đó, năng suất sinh học cũng cao hơn hẳn.

Kết luận

Từ các nghiên cứu trên cho thấy, môi trường nhân giống cấp I có ảnh hưởng tới năng suất tạo quả thể trên môi trường nhân tạo thể rắn. Trong các loại môi trường được khảo sát, môi trường PDA có bổ sung 10 g/l pepton cho tốc độ sinh

trưởng tốt nhất. Kết quả khảo sát mối tương quan chất lượng giống cấp 1 và khả năng tạo quả thể cũng cho thấy môi trường PDA10 cho năng suất cao hơn hẳn so với môi trường PDA thông thường: thời gian mọc kín cơ chất 9,12 ngày, thời gian xuất hiện mầm quả thể 15,37 ngày, số lượng quả thể/bình đạt 36,51 quả thể, chiều dài trung bình quả thể là 68,24 mm, năng suất sinh học đạt 12,43%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E.J. Buenz, et al. (2005), "The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis", *J. Ethnopharmacol.*, **96**(1), pp.19-29.
- [2] T.C. Wen, et al. (2009), "Enhanced production of mycelial and cordycepin by submerged culture using additives in *Cordyceps militaris*", *Food Ferment. Ind.*, **35**(8), pp.49-53.
- [3] E.S. Hana, et al. (2011), "*Cordyceps militaris* extract suppresses dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and production of inflammatory mediators from macrophages and mast cells", *J. Ethnopharm.*, **134**, pp.703-710.
- [4] J.X. Nan, et al. (2001), "Antibiotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats", *Arch. Pharm. Res.*, **24**(4), pp.327-332.
- [5] C. Park, et al. (2005), "Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through induction of apoptosis", *Oncol. Rep.*, **13**, pp.1211-1216.
- [6] C.H.S. Hsu, et al. (2008), "Effects of the immunomodulatory agent *Cordyceps militaris* on airway inflammation in a mouse asthma model", *Pediatr. Neonatol.*, **49**(5), pp.171-178.
- [7] S.B. Choi, et al. (2004), "Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats Bioscience", *Biotechnology and Biochemistry*, **68**, pp.2257-2264.
- [8] J.X. Nan, et al. (2001), "Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats", *Arch. Pharm. Res.*, **24**(4), pp.327-332.
- [9] S.K.M. Das, M. Sakurai, A. Sakakibara (2010), "Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects", *Fitoterapia*, **81**(8), pp.961-968.
- [10] R.S. Yu, et al. (2004), "Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*", *Fitoterapia*, **75**(5), pp.465-472.
- [11] Peter E. Mortimer, et al. (2012), "Prized edible Asian mushrooms: ecology, conservation and sustainability", *Fungal Diversity*, **56**(1), pp.31-37.
- [12] E. Vladimir (2012), "Submerged cultivation of medicinal mushroom: Bioprocesses and products (review)", *Int. J. Med. Mushrooms*, **14**(3), pp.211-239.
- [13] R.B. Stevens (1981), *Mycology guidebook*, University of Washington Press, Seattle.
- [14] P.M. Stockdale (1971), *Fungi pathogenic for man and animals: I. Diseases of the keratinized tissues*, Academic Press, London.
- [15] A.B. Johnston (1983), *Plant pathologist's pocketbook 2nd*, Commonwealth Agricultural Bureaux, The Commonwealth Mycological Institute, Kew.

Hàm lượng dinh dưỡng trong đất trồng cây ăn quả và cây dược liệu vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An

Hoàng Thị Huyền Ngọc*, Nguyễn Mạnh Hà, Vũ Thị Thu Hường

Viện Địa lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 17/6/2019; ngày gửi phản biện 20/6/2019; ngày nhận phản biện 22/7/2019; ngày chấp nhận đăng 30/7/2019

Tóm tắt:

Hình thành và ổn định vùng chuyên canh cây ăn quả đặc sản chất lượng cao và cây dược liệu bản địa là định hướng quan trọng trong phát triển kinh tế - xã hội vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An. Nghiên cứu đã sử dụng kết quả phân tích tính chất lý, hóa học của 14 mẫu đất để đánh giá chất lượng của đất trồng cây ăn quả và cây dược liệu. Kết quả nghiên cứu cho thấy: đối với đất trồng cây ăn quả, hàm lượng chất hữu cơ ở mức thấp (0,28-1,26% OM), đạm (N) tổng số, lân (P) tổng số và kali (K) tổng số chủ yếu ở mức nghèo. Đất trồng cây dược liệu có các chỉ tiêu dinh dưỡng đất cao hơn so với đất trồng cây ăn quả nhưng giá trị không cao. Vì vậy, để cải thiện chất lượng đất trong canh tác cây ăn quả và cây dược liệu vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An cần tiến hành các biện pháp cải tạo phù hợp.

Từ khóa: dinh dưỡng đất, đất trồng cây ăn quả, đất trồng cây dược liệu, tây Thanh Hóa - Nghệ An.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Tây Thanh Hóa - Nghệ An là một trong những vùng sinh thái miền núi đặc trưng, có nhiều tiềm năng để trồng các loại cây ăn quả và dược liệu có giá trị kinh tế cao. Do đó, việc hình thành và ổn định vùng chuyên canh cây ăn quả và cây dược liệu đóng vai trò quan trọng trong định hướng phát triển kinh tế - xã hội của vùng [1, 2]. Từ đó, tạo ra các sản phẩm hàng hóa có tính đặc thù và cạnh tranh. Nếu như các loại cây ăn quả như cam, bưởi, dứa, chuối... từ lâu được biết đến là đặc sản nổi tiếng của tây Thanh Hóa - Nghệ An, thì trồng cây dược liệu được xác định là mô hình giảm nghèo bền vững, thân thiện và phù hợp với điều kiện chăm sóc của đồng bào dân tộc thiểu số những năm gần đây. Lợi ích của việc trồng xen cây dược liệu ưa bóng dưới tán rừng đã được khẳng định, đó là: gắn chặt mối quan hệ giữa hoạt động kinh tế của người dân miền núi với hoạt động sản xuất lâm nghiệp; phát triển và bảo vệ được rừng gỗ lớn, gỗ quý có chu kỳ kinh doanh dài; tận dụng nguồn năng lượng ánh sáng dồi dào do cấu trúc nhiều tầng tán khi trồng xen cây dược liệu dưới tán rừng; tăng khả năng thấm nước, giữ nước và chống xói mòn đất rừng [3].

Nghiên cứu phát triển sản xuất nông, lâm nghiệp, đặc biệt là ở miền núi, ngoài yếu tố kinh tế còn phải dựa trên nền tảng của khí hậu, đất đai và địa hình. Trong đó, đất và

hệ thống cây trồng có mối quan hệ chặt chẽ, vì đất vừa là yếu tố hình thành, có vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng của cây trồng, đồng thời chịu ảnh hưởng trực tiếp của hệ thống cây trồng thông qua đặc điểm dinh dưỡng của đất như: hàm lượng chất hữu cơ, độ chua đất, hàm lượng N, P, K...

Do đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục đích: (i) Đánh giá một số tính chất dinh dưỡng của đất trồng cây ăn quả và cây dược liệu vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An; (ii) Cơ sở khoa học để đề xuất cải thiện và nâng cao chất lượng đất trồng cây ăn quả và cây dược liệu; (iii) Cơ sở dữ liệu để đánh giá diễn biến tính chất đất trong quá trình sản xuất.

Phương pháp và phạm vi nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp điều tra, khảo sát thu thập mẫu: các mẫu đất được lựa chọn đại diện cho đất trồng cây ăn quả (cây có múi, chuối, chanh leo) và đất trồng cây dược liệu (ba kích, sa nhân tím, hương bài, nghệ, quế) điển hình của vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An. Nghiên cứu đã thu thập 14 mẫu đất tầng mặt (0-20 cm). Quy trình lấy mẫu theo "Sổ tay điều tra, phân loại đánh giá đất" do Lê Thái Bạt và cs công bố năm 2015 [4]. Các điểm lấy mẫu được thống kê trong bảng 1.

* Tác giả liên hệ: Email: ngoc.hoanghuyen@gmail.com

Soil nutrient status for the cultivation of fruit trees and medicinal plants in the western of Thanh Hoa and Nghe An provinces

Thi Huyen Ngoc Hoang*, Manh Ha Nguyen,
Thi Thu Huong Vu

Institute of Geography, Vietnam Academy of Science and Technology

Received 17 June 2019; accepted 30 July 2019

Abstract:

Forming and stabilizing the region of high quality speciality fruit trees and indigenous medicinal plants is an important orientation in the socio-economic development of the western of Thanh Hoa and Nghe An provinces. The study used the analyses of the physical and chemical properties of 14 soil samples to assess the quality of soils for planting fruit trees and medicinal plants. The results showed that: for fruit tree soils, organic matter (OM) was low (0.28-1.26% OM), total nitrogen was average, and total phosphorus and potassium were poor. These indicators of medicinal plant soils were higher than that of fruit tree soils though the values were not considerable. Therefore, in order to improve the quality of soils for cultivating fruit and medicinal crops in the western of Thanh Hoa and Nghe An provinces, it is necessary to implement appropriate rehabilitation measures.

Keywords: fruit tree soil, medicinal plant soil, soil nutrition, western of Thanh Hoa and Nghe An provinces.

Classification number: 4.1

Phương pháp phân tích trong phòng thí nghiệm: các mẫu đất được xử lý và phân tích tại Phòng phân tích thí nghiệm tổng hợp địa lý, Viện Địa lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các chỉ tiêu và phương pháp phân tích bao gồm:

- + Thành phần cơ giới phân tích theo TCVN 8567:2010.
- + Độ chua đất (pH) phân tích theo TCVN 5979:2007.
- + Hàm lượng chất hữu cơ (OM): được tính bằng các bon hữu cơ (OC) x 1,724.
- + Phương pháp xác định OC: TCVN 8941-2011.

Bảng 1. Vị trí các điểm lấy mẫu.

Ký hiệu	Hiện trạng	Loại đất	Địa điểm lấy mẫu
Đất trồng cây ăn quả			
NA1	Cam V2 năm thứ 4	Đất đỏ vàng biến đổi do trồng lúa (Fl)	Yên Khê, Con Cuông
NA2	Cam Xã Đoài, 3 tháng	Đất đỏ vàng trên đá vôi (Fv)	Yên Khê, Con Cuông
NA3	Cam năm thứ 2	Đất phù sa ngòi suối (Py)	Yên Khê, Con Cuông
NA6	Chuối tiêu hồng	Đất phù sa ngòi suối (Py)	Tam Thái, Tương Dương
NA8	Chanh leo đang thu hoạch	Đất đỏ vàng biến đổi do trồng lúa (Fl)	Tri Lễ, Quế Phong
NA10	Bưởi năm thứ 3	Đất nâu đỏ trên đá bazan (Fk)	Nghĩa Tiến, Thái Hòa
TH4	Chuối tiêu hồng năm thứ 3	Đất vàng nhạt trên đá cát (Fq)	Kỳ Tân, Bá Thước
TH7	Thanh Long vừa thu hoạch	Đất đỏ vàng trên đá phiến sét (Fs)	Kỳ Tân, Bá Thước
Đất trồng cây dược liệu			
NA4	Ba kích dưới tán rừng	Đất vàng nhạt trên đá cát (Fq)	Yên Khê, Con Cuông
NA7	Hương bài	Đất vàng nhạt trên đá cát (Fq)	Tân Lạc, Quỳnh Châu
NA9	Sa nhân tím dưới tán rừng	Đất vàng đỏ trên đá mácma axit (Fa)	Nậm Nhoóng, Quế Phong
TH2	Ba kích dưới tán keo	Đất vàng đỏ trên đá mácma axit (Fa)	Ngọc Phụng, Thường Xuân
TH3	Quế bắt đầu thu hoạch	Đất vàng đỏ trên đá mácma axit (Fa)	Ngọc Phụng, Thường Xuân
TH9	Nghệ vàng	Đất đỏ vàng trên đá phiến sét (Fs)	Thạch Quảng, Thạch Thành

+ Hàm lượng N tổng số (N%) phân tích theo TCVN 8498:1999.

+ Hàm lượng P tổng số ($P_2O_5\%$) phân tích theo TCVN 8940:2011.

+ Hàm lượng K tổng số ($K_2O\%$) phân tích theo TCVN 8660:2011.

+ Hàm lượng P dễ tiêu phân tích theo TCVN 5256:2009.

+ Hàm lượng K dễ tiêu phân tích theo TCVN 8662:2011.

+ Tổng cation trao đổi (CEC) phân tích theo TCVN 8568:2010.

Đánh giá chất lượng đất: chất lượng đất của khu vực nghiên cứu được đánh giá bằng cách so sánh số liệu phân tích của 14 mẫu đất tầng mặt với thang đánh giá về hàm lượng N tổng số và dễ tiêu, P tổng số và dễ tiêu, K tổng số và dễ tiêu của Hội Khoa học đất Việt Nam [5]. Hàm lượng chất hữu cơ (OM) được so sánh với Thang đánh giá của Siderius đề xuất năm 1992 áp dụng cho đất đồi núi [6].

Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trong phạm vi hành chính gồm 22 huyện/thị xã phía tây của các tỉnh Thanh Hóa - Nghệ An. Về phạm vi khoa học, nghiên cứu tập trung vào việc phân tích, đánh giá chất lượng đất tầng mặt (tầng canh tác) của 2 loại hình sử dụng đất điển hình của vùng. Thứ nhất là đất trồng cây ăn quả bao gồm cây có múi (cam, bưởi) và một số cây ăn quả đang được phát triển

trong vùng như: chuối tiêu hồng, chanh leo, thanh long. Thứ hai là đất trồng cây dược liệu gồm: ba kích, sa nhân tím, quế, nghệ vàng. Ngoài ra, trong quá trình điều tra khảo sát thấy rằng: cây hương bài - một loài cây thảo mộc dùng để làm hương thấp, không phải là cây dược liệu được trồng khá phổ biến, vì vậy trong nghiên cứu này gộp hương bài vào nhóm cây dược liệu để đánh giá thêm.

Kết quả và thảo luận

Tính chất vật lý của đất

Tính chất vật lý của đất nói chung và thành phần cơ giới nói riêng gắn liền với tính chất của đá mẹ, mẫu chất. Trong mối quan hệ phát sinh học đất (pedology), mỗi loại đá mẹ, mẫu chất có thành phần thạch học, cấu trúc khác nhau sẽ quyết định sự khác nhau về thành phần cơ giới của loại đất hình thành. Có thể thấy, các mẫu đất được lấy đại diện cho các vùng trồng cây ăn quả ở tây Thanh Hóa - Nghệ An chủ yếu là đất phát triển trên mẫu chất phù sa, dọc theo các thung lũng sông nhỏ hẹp, tương đối bằng phẳng, thoát nước. Một số diện tích cây ăn quả được trồng trên đất đỏ vàng phong hóa từ đá phiến sét, đá cát, đá bazan, có tầng đất dày (trên 100 cm), địa hình dốc thoải. Trong khi đó, các loài cây dược liệu được trồng ở vùng núi cao và dốc hơn, dưới tán rừng sản xuất, chủ yếu trên đất vàng nhạt của đá cát (Fq) hoặc đất vàng đỏ của đá mácma axit (Fa). Do đó, thành phần cơ giới của lớp đất tầng mặt trong các mẫu đất có sự khác nhau đáng kể, thể hiện ở bảng 2 và hình 1.

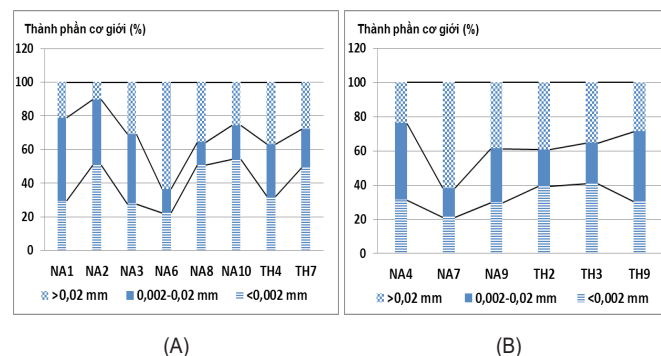
Bảng 2. Thành phần cơ giới đất tầng mặt.

Ký hiệu	Loại đất	% cấp hạt đường kính		
		<0,002 mm	0,002-0,02 mm	>0,02 mm
Đất trồng cây ăn quả				
NA1	Đất đỏ vàng biến đổi do trồng lúa (Fl), dốc 3-8°	29,43	49,55	21,02
NA2	Đất đỏ vàng trên đá vôi (Fv), dốc 8-15°	50,83	38,97	10,20
NA3	Đất phù sa ngòi suối (Py), dốc dưới 3°	27,91	41,33	30,76
NA6	Đất phù sa ngòi suối (Py), dốc dưới 3°	22,19	14,39	63,42
NA8	Đất đỏ vàng biến đổi do trồng lúa (Fl), dốc 3-8°	51,07	13,37	35,56
NA10	Đất nâu đỏ trên đá bazan (Fk), dốc dưới 3°	54,33	19,97	25,70
TH4	Đất vàng nhạt trên đá cát (Fq), dốc 8-15°	32,09	31,17	36,74
TH7	Đất đỏ vàng trên đá phiến sét (Fs), dốc 8-15°	49,33	22,81	27,86
Đất trồng cây dược liệu				
NA4	Đất vàng nhạt trên đá cát (Fq), dốc trên 25°	31,23	44,89	23,88
NA7	Đất vàng nhạt trên đá cát (Fq), dốc 20-25°	21,29	16,83	61,88
NA9	Đất vàng đỏ trên đá mácma axit (Fa), dốc trên 25°	29,87	31,47	38,66
TH2	Đất vàng đỏ trên đá mácma axit (Fa), dốc trên 25°	39,37	21,41	39,22
TH3	Đất vàng đỏ trên đá mácma axit (Fa), dốc trên 25°	40,93	23,69	35,38
TH9	Đất đỏ vàng trên đá phiến sét (Fs), dốc 8-15°	30,67	40,71	28,62

Đất trồng cây ăn quả trên mẫu chất phù sa hoặc đá cát có thành phần cơ giới chủ yếu là thịt nhẹ, với tỷ lệ cấp hạt cát (>0,02 mm) khá cao, tỷ lệ cấp hạt sét (<0,002 mm) thấp. Trong khi vùng trồng cây ăn quả trên đất đỏ vàng điển hình phong hóa từ đá bazan, đá

phiến sét có thành phần cơ giới từ thịt trung bình đến thịt nặng với tỷ lệ cấp hạt sét trên 40% (bảng 2). Cây ăn quả nói chung nhạy cảm với sự thay đổi độ ẩm trong đất, đồng thời đòi hỏi đất phải thoát nước, thoáng khí [7]. Để đáp ứng được điều này, đất cần có kết cấu tốt với thành phần cấp hạt hợp lý, đất quá nhiều sét sẽ gây bí chặt, đất nhiều cát lại dễ thấm nước và thoát nước nhanh. Do đó, các loại cây ăn quả thích hợp canh tác trên đất thịt nhẹ đến thịt trung bình, có thể thấy thành phần cơ giới của nhóm đất phù sa hoặc đất đỏ vàng đều đáp ứng được điều kiện này.

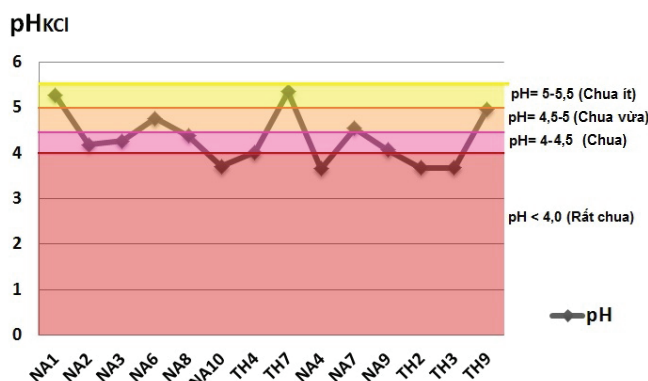
Trong khi đó, các loài cây dược liệu chủ yếu có nguồn gốc tự nhiên, ngưỡng sinh thái rộng, có thể sinh trưởng và phát triển trên nhiều loại đất đồi núi, kể cả đất nghèo kiệt. Ở tây Thanh Hóa - Nghệ An, cây dược liệu trồng dưới tán rừng sản xuất trên đất dốc (20-25°), đất có thành phần cơ giới chủ yếu là thịt nhẹ (bảng 2). Đất có thành phần cơ giới là thịt nhẹ do 2 nguyên nhân: 1) Ở độ dốc trên 20°, quá trình rửa trôi các hạt sét mịn trên bề mặt và theo chiều sâu tầng đất xảy ra mạnh, để lại trong đất tầng mặt phần lớn hạt cát, thô; 2) Bản thân đá mẹ (đá cát và đá mácma axit) hình thành đất cũng đã chứa tỷ lệ cấp hạt cát cao. Theo nhiều nghiên cứu, nhóm cây dược liệu thân thảo (ba kích, nghệ, sa nhân...) không ưa đất thịt nặng vì sẽ dư ẩm và quá chặt khi khô, rễ cây không phát triển được. Thành phần cơ giới đất thích hợp là thịt nhẹ.



Hình 1. Thành phần cơ giới tầng đất mặt của đất trồng cây ăn quả (A) và đất trồng cây dược liệu (B).

Hàm lượng dinh dưỡng trong đất

Dinh dưỡng trong đất trồng cây ăn quả: quá trình feralit điển hình ở vùng đồi núi tây Thanh Hóa - Nghệ An trên sản phẩm của các đá mẹ phong hóa triệt để khiến đất đều có phản ứng chua. Ngoài ra, giá trị pH thấp trong đất trồng cây ăn quả còn do các nguyên nhân sau: bón nhiều phân hóa học mà chủ yếu là N và K chứa các gốc axit, quá trình rửa trôi cation kiềm và kiềm thổ, phân giải chất hữu cơ trong đất và sự hô hấp của hệ thống rễ cây. Kết quả phân tích cho thấy: đất tầng mặt của 5/8 điểm khảo sát trồng cây ăn quả ở ngưỡng chua ($pH_{KCl}=4,0-4,5$), 3/8 mẫu đất ở ngưỡng chua vừa đến chua ít (hình 2). Đây chính là một trong những yếu tố hạn chế quan trọng đối với canh tác cây ăn quả, đặc biệt là cây có múi. Bởi vì, độ chua đất được cho là lý tưởng để trồng cây có múi trong khoảng $pH=6-7$ [7]. Như vậy, đất trồng cây ăn quả vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An cần điều chỉnh, cải thiện độ chua đất cho phù hợp với yêu cầu sinh thái của các loại cây ăn quả.



Hình 2. Độ chua (pH_{KCl}) trong đất trồng cây ăn quả và cây dược liệu.

Hàm lượng chất hữu cơ biến động rất lớn giữa các loại đất, nhìn chung các loại đất nông nghiệp ở nước ta có hàm lượng chất hữu cơ không cao. Hơn nữa, đất đồi núi thường có hàm lượng chất hữu cơ nghèo. Hàm lượng OM trong đất, bao gồm cả các mẫu đất trồng cây ăn quả, ở mức thấp đến rất thấp, dao động từ 0,28-1,26% OM, trung bình là 0,72% OM (bảng 3). Điều này có thể lý giải do việc thâm canh liên tục trong nhiều năm và bón phân hữu cơ không cân đối đã làm cho đất phần nào bị thoái hóa, suy giảm độ phì. Mặt khác, đất có thành phần cơ giới thịt nhẹ cũng hạn chế quá trình hình thành và tích lũy hữu cơ trong đất, bởi vì hàm lượng chất hữu cơ có quan hệ chặt chẽ với khả năng trao đổi cation CEC và tỷ lệ cấp hạt sét trong đất.

Bảng 3. Đánh giá dinh dưỡng đất trong các tầng đất mặt trồng cây ăn quả.

Chỉ tiêu	Cấp đánh giá	Thang giá trị	NA1	NA2	NA3	NA6	NA8	NA10	TH4	TH7
OM (%)	Rất giàu	>8								
	Giàu	4-8								
	Trung bình	2-4								
	Thấp	1-2					1,26		1,2	1,06
	Rất thấp	<1	0,43	0,28	0,49	0,56		0,46		
Tổng N (%)	Giàu	>0,2							0,217	
	Trung bình	0,1-0,2	0,109		0,105	0,109	0,175	0,116		0,186
	Nghèo	<0,1		0,067						
Tổng P (%)	Giàu	>0,1		0,11						0,13
	Trung bình	0,06-0,1	0,07		0,07					
	Nghèo	<0,06				0,02	0,05	0,03	0,05	
Tổng K (%)	Giàu	>2				3,11			7,76	3,58
	Trung bình	1-2						1,81		
	Nghèo	<1	0,78	0,34	0,99		0,3			
P dễ tiêu (mg P ₂ O ₅ /100 g đất)	Giàu	>10				24,94				11,74
	Trung bình	5-10	8,9	6,58		5,55		9,85		
	Nghèo	<5					1,6		2,12	
K dễ tiêu (mg K ₂ O/100 g đất)	Giàu	>20			31,72					20,45
	Trung bình	10-20					10,45			
	Nghèo	<10	4,39	2,14		5,45		2,32	7,71	
CEC (me/100 g đất)	Cao	>16								
	Trung bình	12-16							13,45	14,15
	Thấp	8-12	9,05	9,25		8,15	11,05	11,35		
	Rất thấp	<8			7,8					

CEC chịu ảnh hưởng rất lớn bởi bản chất, hàm lượng khoáng sét và keo hữu cơ hiện diện trong đất. Các loại đất có hàm lượng sét và chất hữu cơ cao sẽ có khả năng trao đổi CEC cao hơn đất cát và đất có hàm lượng chất hữu cơ thấp. Đồng thời, CEC càng cao thì càng có lợi cho sinh trưởng, phát triển của cây trồng do tăng khả năng hấp thụ hóa lý các chất dinh dưỡng của đất. Kết quả phân tích cho thấy, 5/8 mẫu đất trồng cây ăn quả có CEC thấp (8-12 me/100 g đất) và điều này cũng phù hợp với đất có thành phần cơ giới nhẹ hoặc trung bình và nghèo hữu cơ. Do đó, trong quá trình canh tác cây ăn quả ngoài việc chú trọng cung cấp chất dinh dưỡng, cần phải cải thiện khả năng trao đổi cation và độ phì xốp của đất.

N đặc biệt quan trọng với cây ăn quả trong giai đoạn phát triển bộ rễ, đâm chồi và quyết định năng suất khi ra quả. N từ đất cũng dễ dàng bị mất đi và khá tốn kém để cung ứng. Hàm lượng N tổng số trong các mẫu đất hầu hết đều ở mức trung bình, dao động từ 0,105-0,186% N, các giá trị không chênh lệch nhau quá nhiều. Có 1 mẫu NA2 nghèo N tổng số (0,067% N), mẫu đất TH4 trồng chuối tiêu hồng năm thứ 3 có N tổng số cao nhất (0,217% N).

Tác động của P đối với đất và cây trồng được thể hiện qua hàm lượng P tổng số và dễ tiêu. Hàm lượng P tổng số trong các mẫu đất dao động từ nghèo đến giàu (dao động từ 0,02-0,13% P₂O₅); có 4/8 mẫu hàm lượng P tổng số ở mức nghèo; 2/8 mẫu ở mức giàu >0,1% P₂O₅, các mẫu còn lại đều ở mức trung bình. Hàm lượng P dễ tiêu là chỉ tiêu phản ánh trực tiếp khả năng cung cấp P của đất cho cây trồng vì P dễ tiêu ở dạng cây trồng trực tiếp hấp thụ được. Trong 8 mẫu đất trồng cây ăn quả khảo sát, có 4/8 mẫu đất có P dễ tiêu ở mức trung bình, 2 mẫu ở mức nghèo. Cá biệt có mẫu NA3 - đất trồng cam năm thứ 2 có mức P dễ tiêu cao 24,94 mg P₂O₅/100 g đất.

Giống như hàm lượng P tổng số, hàm lượng K tổng số trong các mẫu đất trồng cây ăn quả chủ yếu ở mức nghèo. Hàm lượng K dễ tiêu trong đất ở các loại hình cây ăn quả khác nhau có sự dao động khá lớn từ 2,14-31,72 mg K₂O/100 g đất ở tầng 0-20 cm. Đáng chú ý, ở mẫu NA3 - trồng cam năm thứ 2 và TH7 - trồng thanh long mới thu hoạch đều có hàm lượng P và K dễ tiêu cao gấp nhiều lần so với các mẫu còn lại. Có thể do đất vừa được bón bổ sung P và K theo chu kỳ sinh trưởng của cây trồng.

Dinh dưỡng trong đất trồng cây dược liệu: đất trồng cây dược liệu trong khu vực nghiên cứu chủ yếu có phản ứng rất chua (pH_{KCl} <4,0) đến chua (pH_{KCl} =4,0-4,5), cảnh báo suy thoái hóa học đất (hình 2). Kết quả phân tích ở bảng 4 cho thấy: các mẫu đất trồng cây dược liệu dưới tán rừng đều có hàm lượng chất hữu cơ thấp đến rất thấp, dao động từ 0,52-1,35% OM. Tuy mức trung bình là 1,01%, cao hơn trong đất trồng cây ăn quả, nhưng cũng cho thấy sự tích lũy hữu cơ tầng mặt ở rừng sản xuất có trồng xen cây dược liệu không cao. Một mặt, do tầng mặt của đất rừng nhận được lượng lớn các vật liệu rơi rụng (thân, cành, lá cây) trong điều kiện nhiều tầng tán, độ che phủ tương đối kín, nên hàm lượng chất hữu cơ tầng mặt được tích lũy cao hơn đất sản xuất nông nghiệp. Mặt khác, do thành phần cơ giới của đất nhiều cấp hạt cát ảnh hưởng đến khả năng tích lũy chất dinh dưỡng, một phần cũng bị rửa trôi

theo bề mặt do độ dốc lớn của địa hình nên hàm lượng chất hữu cơ chỉ đạt mức thấp. Ứng với các mẫu đất TH2, TH9 có hàm lượng OM cao hơn các mẫu còn lại, khả năng trao đổi cation CEC cũng đạt mức cao (16,45-18,55 me/100 g đất).

Bảng 4. Đánh giá dinh dưỡng đất trong các tầng đất mặt trồng cây dược liệu.

Chỉ tiêu	Cấp đánh giá	Thang giá trị	NA4	NA7	NA9	TH2	TH3	TH9
OM (%)	Rất giàu	>8						
	Giàu	4-8						
	Trung bình	2-4						
	Thấp	1-2	1,35			1,01		1,26
Tổng N (%)	Rất thấp	<1		0,52	0,98		0,94	
	Giàu	>0,2						
	Trung bình	0,1-0,2	0,154	0,105	0,175	0,147	0,14	0,189
	Nghèo	<0,1						
Tổng P (%)	Giàu	>0,1						
	Trung bình	0,06-0,1						0,1
	Nghèo	<0,06	0,04	0,03	0,03	0,04	0,02	
Tổng K (%)	Giàu	>2				3,65	4,15	4,18
	Trung bình	1-2	1,54	1,74	1,92			
	Nghèo	<1						
P dễ tiêu (mg P ₂ O ₅ /100 g đất)	Giàu	>10						12,54
	Trung bình	5-10		8,64				
	Nghèo	<5	2,49		2,23	4,58	2,83	
K dễ tiêu (mg K ₂ O/100 g đất)	Giàu	>20						
	Trung bình	10-20						10,18
	Nghèo	<10	4,46	3,28	9,34	4,94	4,13	
CEC (me/100 g đất)	Cao	>16				16,45		18,55
	Trung bình	12-16			13,55		15,75	
	Thấp	8-12	9,1					
	Rất thấp	<8		6,9				

Nhìn chung, hàm lượng N tổng số và K tổng số trong đất trồng cây dược liệu có giá trị cao hơn trong đất trồng cây ăn quả. Trong tất cả các mẫu, đất trồng nghệ (TH9) có hàm lượng dinh dưỡng cao nhất, còn đất trồng hương bài (NA7) có hàm lượng thấp nhất. Theo kết quả điều tra khảo sát, cây hương bài là cây thân thảo nhưng hấp thụ nhiều dinh dưỡng từ đất, vì vậy chất lượng đất sẽ bị giảm nhanh sau vài chu kỳ canh tác nếu không bổ sung phân bón. N tổng số trong tất cả các mẫu đều ở ngưỡng trung bình, K tổng số đạt mức trung bình đến giàu (bảng 4). Hàm lượng K dễ tiêu gồm K hoà tan trong nước và K trao đổi của đất. Đây là những dạng K cây trồng sử dụng được nhưng cũng dễ bị rửa trôi, dẫn đến vấn đề thường thiếu hụt K trong đất so với nhu cầu của cây. Với các mẫu đất trồng cây dược liệu đã thu thập cũng vậy, hàm lượng K dễ tiêu chủ yếu ở mức nghèo dưới 10 mg/100g (5/6 mẫu).

Hàm lượng P tổng số cũng như P dễ tiêu trong đất trồng cây dược liệu đều không cao, chủ yếu là nghèo, một số ít mẫu đạt mức trung bình. Hơn nữa, do tất cả các mẫu đất đều rất chua nên P dễ bị cố định lại, làm hàm lượng P dễ tiêu thấp, phần nào không đáp ứng đủ nhu cầu thiết yếu của cây dược liệu.

Kết luận

Đất trồng cây ăn quả vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An có thành phần cơ giới tầng đất mặt chủ yếu là thịt nhẹ đến thịt trung bình,

tỷ lệ các cấp hạt cát, sét, limon thay đổi tương ứng do mẫu chất hình thành đất khác nhau: phù sa, phiến sét, bazan... Trong khi đó, thành phần cơ giới của đất trồng cây dược liệu là đất thịt nhẹ, hàm lượng sét thấp. Đất thịt nhẹ được cho là thích hợp với cây ăn quả và cây dược liệu do tính chất tơi xốp và thoát nước, tuy nhiên cũng hạn chế quá trình hình thành mùn và tích lũy hữu cơ trong đất.

Dinh dưỡng của đất trồng cây ăn quả được đánh giá như sau: hàm lượng mùn OM ở mức thấp đến rất thấp, khiến cho CEC ở mức thấp đến trung bình, N tổng số hầu hết ở mức trung bình, P tổng số chủ yếu ở mức nghèo, P dễ tiêu ở mức trung bình. Đất nghèo hàm lượng K tổng số trong khi K dễ tiêu có sự dao động lớn giữa các loại hình cây ăn quả khác nhau.

Đất trồng cây dược liệu, đặc biệt là dưới tán rừng, có hàm lượng mùn, N tổng số, K tổng số trung bình cao hơn trong đất trồng cây ăn quả. N tổng số đạt ngưỡng trung bình, K tổng số ở ngưỡng trung bình đến giàu. Hàm lượng P tổng số cũng như P dễ tiêu trong đất trồng cây dược liệu đều không cao.

Đáng chú ý, đất trồng cây ăn quả và cây dược liệu vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An đều có giá trị pH thấp, đây là một trong những dấu hiệu của suy thoái đất. Vì vậy, dựa trên kết quả phân tích và đánh giá dinh dưỡng đất, để nâng cao và duy trì chất lượng đất trồng cây ăn quả và cây dược liệu vùng này cần: (1) áp dụng quy trình bón phân hợp lý theo nhu cầu của từng loại cây trồng và tính chất đất đai; (2) cải thiện độ chua của đất; (3) tăng cường che phủ đất để hạn chế quá trình rửa trôi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần kết quả của đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số VAST05.01/16-17 do Viện Địa lý chủ trì. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Thủ tướng Chính phủ (2013), *Quyết định số 2355/QĐ-TTg ngày 04/12/2013 phê duyệt Đề án phát triển kinh tế - xã hội miền tây tỉnh Nghệ An đến năm 2020*.
- [2] UBND tỉnh Thanh Hóa (2014), *Quyết định số 4438/QĐ-UBND ngày 11/12/2014 phê duyệt Đề án phát triển cây trồng, vật nuôi có lợi thế phát triển trên địa bàn các huyện miền núi tỉnh Thanh Hóa đến năm 2020*.
- [3] Nguyễn Ngọc Bình, Phạm Đức Tuấn (2002), *Trồng cây nông nghiệp, dược liệu và đặc sản dưới tán rừng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- [4] Lê Thái Bạt và cs (2015), *Sổ tay Điều tra phân loại, đánh giá đất*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- [5] Hội Khoa học đất Việt Nam (2000), *Đất Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- [6] W. Siderius (1992), *Soil derived land qualities*, International Institute for Aerospace Survey and Earth Sciences, SOL.48, Wageningen, the Netherlands, pp.37-84.
- [7] Vũ Công Hậu (1996), *Trồng cây ăn quả ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Phân lập, định danh chủng vi khuẩn chịu mặn, có hoạt tính phân giải lân vô cơ cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long

Nguyễn Đức Thành^{1*}, Nguyễn Thế Quyết¹, Hà Viết Cường², Phạm Xuân Hội¹

¹Viện Di truyền Nông nghiệp

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 16/9/2019; ngày chuyển phản biện 19/9/2019; ngày nhận phản biện 28/11/2019; ngày chấp nhận đăng 9/12/2019

Tóm tắt:

Vi khuẩn phân giải lân có vai trò quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Mục đích của nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn có hoạt tính phân giải lân vô cơ trên môi trường PVK có bổ sung muối NaCl $\geq 1\%$ từ các mẫu đất trồng cây bưởi bị nhiễm mặn ở tỉnh Bến Tre. Kết quả đã xác định được mẫu T2917 và T3602 có hoạt tính phân giải lân vô cơ cao nhất trên môi trường PVK. Khuẩn lạc mẫu T2917 có hình tròn, lồi, sinh tiết sắc tố màu vàng nhạt, tế bào dạng hình que ngắn, có khả năng di động, nhuộm gram âm, chịu NaCl 5%. Mẫu phân lập T3602 không sinh tiết sắc tố, màu trắng đục, tế bào có dạng hình cầu, hình ovan, có khả năng di động, nhuộm gram âm và có khả năng chịu NaCl 3%. Phản ứng PCR đã nhận được đoạn gen 16S ARN ribosome của vi khuẩn có kích thước khoảng 1.500 bp. Phân tích hệ gen 16S ARN ribosome đã định danh được mẫu T2917 gần nhất với loài *Pseudomonas oryzae*, chi *Pseudomonas* và mẫu T3602 gần nhất với loài *Burkholderia* sp., chi *Burkholderia*.

Từ khóa: bưởi Da xanh, chịu mặn, vi khuẩn phân giải lân.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Khô hạn, xâm nhập mặn tại nhiều tỉnh ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long, trong đó có tỉnh Bến Tre đã gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của nhiều loại cây ăn quả như bưởi, sầu riêng. Bên cạnh đó, việc lạm dụng quá nhiều phân bón vô cơ diễn ra liên tục trong nhiều năm đã góp phần làm cho đất bị nhiễm mặn. Đất bị nhiễm mặn có hàm lượng muối tan cao, dẫn đến áp suất thẩm thấu của dung dịch đất tăng cao, natri trao đổi ở mức độ cao, dẫn đến tính chất vật lý của đất rất xấu, hàm lượng dễ tiêu của một số chất dinh dưỡng cần thiết rất thấp. Vi sinh vật phân giải lân là các vi sinh vật có khả năng chuyển hóa lân khó tan thành dạng dễ tiêu cho cây trồng sử dụng [1, 2]. Ngoài ra, vi sinh vật phân giải lân cũng đóng vai trò kích thích sinh trưởng thực vật như tổng hợp indole acetic acid (IAA), gibberellic axit (GA), cytokinin, ethylene, hydro cyanide (HCN), cố định nitơ và đối kháng nấm gây bệnh cây có nguồn gốc từ đất [3]. Trong tự nhiên, lượng lân khó tan thông thường chiếm 95-99% lân tổng số [4]. Các axit hữu cơ được vi sinh vật tiết ra trên môi trường là tác nhân chủ yếu phân giải lân khó tan, khoáng hóa các hợp chất lân hữu cơ tạo nguồn lân dễ tiêu cung cấp cho đất

và cây trồng, giúp cho quá trình photphorin hóa, tổng hợp protein, lipid, phytohormon diễn ra liên tục trong cây, giúp cây có thể trao đổi nước, chất khoáng trong điều kiện đất bị nhiễm mặn [5, 6].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, xác định được các chủng vi khuẩn chịu NaCl, có hoạt tính sinh học phân giải lân vô cơ nhằm sản xuất được chế phẩm vi sinh vật, giúp phục hồi cây bưởi Da xanh sinh trưởng phát triển trong điều kiện đất đã bị nhiễm mặn tại tỉnh Bến Tre nói riêng, Đồng bằng sông Cửu Long nói chung.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu đất trồng cây bưởi Da xanh bị nhiễm mặn ở tỉnh Bến Tre.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Mẫu đất được thu thập vào tháng 10/2017. Các thí nghiệm phân lập, định danh, đánh giá hoạt tính sinh học của chủng vi khuẩn phân lập được thực hiện trong năm 2018 tại Bộ môn Công nghệ vi sinh, Viện Di truyền Nông nghiệp.

* Tác giả liên hệ: Email: thanhnguyen.at@gmail.com

Isolation and characterisation of salt tolerant and inorganic phosphate solubilising bacteria from the Mekong River Delta

Duc Thanh Nguyen^{1*}, The Quyet Nguyen¹,
Viet Cuong Ha², Xuan Hoi Pham¹

¹Agricultural Genetics Institute

²Department of Agronomy, Vietnam National University of Agriculture

Received 16 September 2019; accepted 9 December 2019

Abstract:

Phosphorus solubilising bacteria play an important role in agricultural production. The purpose of this study was conducted to isolate, select, and identify bacteria with inorganic phosphorus solubilising activity on Pikovskaya (PVK) medium containing sodium chloride $\geq 1\%$ from pomelo cultivated soil samples under salt stress condition in Ben Tre province. The results showed that the T2917 and T3602 isolates exhibited the highest inorganic phosphorus solubilising activity on the PVK medium. The colony of T2917 isolate was round, pale yellow pigmented on the PVK medium, and the cell of this isolate was short rod-shaped, motile, gram-negative staining, and resistant to NaCl 5% level. Meanwhile, the colony of T3602 isolate did not produce pigments, milky colour on the PVK medium, and its cells was spherical, oval, motile, gram-negative staining, and resistant to NaCl 3% level. The PCR reaction amplified the 16S ribosomal RNA gene of the bacteria with approximately 1,500 base pairs. Phylogenetic analysis of the 16S ribosomal RNA gene indicated that T2917 isolate belongs to *Pseudomonas* genus and the closest related species is *Pseudomonas oryzae*; and T3602 isolate was closely related to *Burkholderia* sp., *Burkholderia* genus.

Keywords: Daxanh pomelo, phosphate solubilising bacteria, salt tolerance.

Classification number: 4.1

Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy: môi trường PVK (Pikovskaya medium) dùng để phân lập, xác định đặc điểm hình thái vi khuẩn có khả năng phân giải lân khó tan chứa nguồn lân vô cơ là $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, gồm: glucose 10,0 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5,0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g, KCl 0,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, MnSO_4 0,002 g, FeSO_4 0,002 g, cao nấm men 0,5 g, agar 20,0 g và nước cất 1.000 ml.

Phương pháp thu thập mẫu: thu thập mẫu đất trồng cây bưởi Da xanh tại 2 huyện Chợ Lách và Châu Thành của tỉnh Bến Tre, mỗi huyện lấy 6 mẫu đã bị nhiễm mặn. Mẫu đất được lấy ở độ sâu tầng đất 0-30 cm, 0,5 kg đất/mẫu, cho vào lọ nhựa sạch, ghi thông tin mẫu thu thập.

Phương pháp phân lập: cân 10 g mẫu đất thu thập, nghiền nhỏ rồi cho vào bình tam giác loại 250 ml có chứa 100 ml nước cất vô trùng, lắc trên máy lắc (100 vòng/phút trong thời gian 20 phút). Tiếp tục pha loãng mẫu theo dãy thập phân liên tiếp cho đến khi dung dịch mẫu có nồng độ pha loãng 10^{-6} . Ở mỗi một nồng độ pha loãng, dùng pipet hút lấy 0,1 ml dung dịch sang đĩa petri chứa môi trường đặc hiệu PVK có bổ sung thêm NaCl 1%. Dùng que cấy vô trùng chằng đều, sau đó đặt đĩa nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 30°C trong 4-7 ngày. Trên mỗi mẫu phân lập, chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải lân hình thành vòng phân giải (hay vòng tròn trong suốt) bao quanh khuẩn lạc trên môi trường PVK, sau đó chủng vi khuẩn được cấy chuyển sang các đĩa petri chứa môi trường PVK khác để làm thuần.

Phương pháp xác định một số đặc điểm hình thái: hình thái khuẩn lạc và tế bào, nhuộm gram, khả năng di động của vi khuẩn được tiến hành phân tích theo các phương pháp của Nguyễn Xuân Thành và cs (2007) [7].

Đường kính vòng phân giải lân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ được xác định theo công thức:

$$k = D - d \text{ (cm)}$$

Trong đó: k là hệ số phân giải; D là đường kính vòng phân giải (cm); d là đường kính lỗ đục (cm).

Phương pháp xác định danh tính vi khuẩn bằng PCR và giải trình tự:

Tách chiết ADN tổng số: ADN tổng số của vi khuẩn được chiết bằng NaOH có cải tiến theo phương pháp của Wang và cs (1993) [8]. Khuẩn lạc thuần (30 mg) trên môi trường PVK được cho vào ống eppendorf loại 2,0 ml có chứa 50 μl NaOH 0,5 M, nghiền mẫu bằng đầu tip xanh. ADN tổng số được hòa trong 50 μl đệm Tris 0,1 M, pH 8,0 và được bảo quản ở điều kiện -20°C cho đến khi sử dụng.

Phản ứng PCR và giải trình tự: sử dụng cặp mồi 27F

(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') [9] để nhân vùng gen 16S ARN ribosome của vi khuẩn. Cho vào mỗi tuýp PCR loại 0,5 ml với tổng thể tích phản ứng là 25 µl, trong đó có chứa 2,5 µl đệm PCR, 0,5 µl dNTPs, 1 µl mỗi loại mồi, 1 µl ADN tổng số và 18,8 µl nước cất vô trùng, khử ion. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X với thời gian 20 phút.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Giải trình tự trực tiếp 2 chiều với bộ mồi dùng trong phản ứng PCR.

Phân tích phả hệ: dựa vào trình tự nucleotide thu được, tìm kiếm các trình tự gần gũi bằng chương trình trực tuyến BLAST search tại NCBI (National Center for Biotechnology Information, Hoa Kỳ) (bảng 1 và 2). Phương pháp phân tích trình tự và phả hệ được thực hiện với các phần mềm ClustalW2 [10] và MEGA 6.0 [11].

Bảng 1. Các loài vi khuẩn *Pseudomonas* spp. dùng trong phân tích phả hệ vùng gen 16S ARN ribosome.

Loài vi khuẩn	Mã truy cập Ngân hàng gen	Nguồn gốc phân lập	Quốc gia
<i>P. oryzae</i>	MG571765	Đất	Ấn Độ
<i>P. oryzae</i> *	NR_117269	Không rõ	Bi
<i>P. lutea</i> *	NR_029103	Rễ cây	Tây Ban Nha
<i>P. lutea</i>	KJ997740	Đất	Ấn Độ
<i>P. rhizosphaerae</i> *	NR_029063	Đất	Tây Ban Nha
<i>P. graminis</i> *	NR_026395	Rễ cây	Pháp
<i>P. putida</i> *	NR_043424	Không rõ	Nhật Bản
<i>P. entomophila</i> *	NR_102854	Đất	Pháp
<i>P. entomophila</i> *	NR_115336	Không rõ	Pháp
<i>P. fragi</i> *	NR_024946	Không rõ	Nhật Bản

Ghi chú: *: mẫu chuẩn của loài (type species).

Bảng 2. Các loài vi khuẩn *Burkholderia* spp. dùng trong phân tích phả hệ vùng gen 16S ARN ribosome.

Loài vi khuẩn	Mã truy cập Ngân hàng gen	Nguồn gốc phân lập	Quốc gia
<i>Burkholderia</i> sp.	KF761524	Đất canh tác	Côlômbia
<i>Burkholderia</i> sp.	EF114423	Không rõ	Ôttrâyli
<i>Burkholderia</i> sp.	EF114419	Không rõ	Ôttrâyli
<i>Burkholderia</i> sp.	EF114409	Không rõ	Ôttrâyli
<i>Burkholderia</i> sp.	EF114418	Không rõ	Ôttrâyli
<i>Burkholderia</i> sp.	MH211376	Rễ cây lạc	Việt Nam

<i>Burkholderia cepacia</i> *	NR_029209	Không rõ	Pháp
<i>Burkholderia cepacia</i>	EU742139	Rễ cây bông	Ấn Độ
<i>Burkholderia lata</i> *	NR_102890	Đất	Ấn Độ
<i>Burkholderia lata</i>	AM905038	Hoa	Braxin
<i>Burkholderia ubonensis</i> *	NR_040830	Không rõ	Nhật Bản
<i>Burkholderia ubonensis</i> *	NR_116153	Không rõ	Pháp
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> *	NR_041720	Rễ lúa	Việt Nam
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	AB568311	Rễ cây cọ	Malaysia
<i>Paraburkholderia kurur-</i> <i>riensis</i> *	NR_024721	Nước ngọt	Nhật Bản

Ghi chú: *: mẫu chuẩn của loài (type species).

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Một số đặc điểm hình thái

Từ 6 mẫu đất thu thập đã phân lập, tuyển chọn được 2 mẫu phân lập có hoạt tính tốt nhất như chịu NaCl, có hoạt tính phân giải lân vô cơ được bảo quản trong ống thạch nghiêng để xác định đặc điểm hình thái và định danh đến mức loài. Một số đặc điểm hình thái của 2 mẫu phân lập được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm hình thái của 2 mẫu phân lập tuyển chọn trên môi trường PVK.

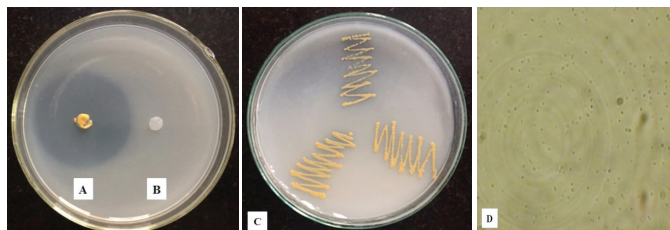
Chỉ tiêu theo dõi	Mẫu T2917	Mẫu T3602
Hình thái khuẩn lạc	Hình tròn, lồi, sinh tiết sắc tố màu vàng nhạt	Hình tròn, lồi, trơn bóng, không sinh tiết sắc tố, màu trắng đục
Hình thái tế bào	Hình que ngắn	Hình cầu, hình ovan
Nhuộm gram	Âm tính (-)	Âm tính (-)
Khả năng di động	Có	Có
Đường kính vòng phân giải lân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	3,7±0,16 cm	2,2±0,44 cm
Chịu NaCl	5%	3%

Ghi chú: đo kích thước sau 7 ngày nuôi cấy, nhiệt độ 30°C.

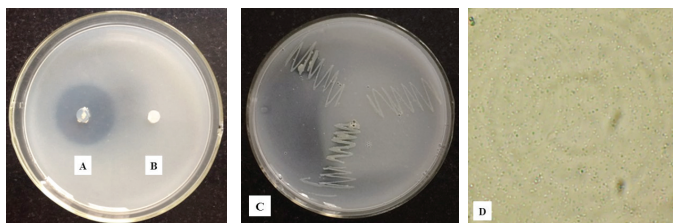
Khuẩn lạc mẫu phân lập T2917 có hình tròn, lồi, sinh tiết sắc tố màu vàng nhạt, còn mẫu T3602 không sinh tiết sắc tố, màu trắng đục.

Quan sát dưới kính hiển vi (80X), tế bào mẫu phân lập T2917 có dạng hình que ngắn, có khả năng di động, nhuộm gram âm, hình thành đường kính vòng phân giải lân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lớn (3,7±0,16 cm) và vẫn có thể sinh trưởng phát triển bình thường trên môi trường PVK có bổ sung NaCl 5% (hình 1). Một số đặc điểm hình thái của mẫu T2917 cũng tương tự như các báo cáo đã công bố [12, 13] thuộc chi *Pseudomonas*.

Còn mẫu phân lập T3602 có dạng hình cầu, hình ovan, có khả năng di động, nhuộm gram âm và chịu được NaCl 3% (hình 2). Một số báo cáo [14, 15] cũng đã mô tả đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* có hoạt tính phân giải lân vô cơ giống với mẫu T3602 trong nghiên cứu này.



Hình 1. Vòng phân giải lân của mẫu T2917 (A) và đối chứng (B) trên môi trường PVK; hình thái khuẩn lạc (C) và hình thái tế bào (D) của mẫu T2917.



Hình 2. Vòng phân giải lân của mẫu T3602 (A) và đối chứng (B) trên môi trường PVK; hình thái khuẩn lạc (C) và hình thái tế bào (D) của mẫu T3602.

Định danh vi khuẩn bằng PCR và giải trình tự

Các mẫu phân lập trong nghiên cứu này đều có khả năng chịu NaCl 1%, có hoạt tính phân giải lân vô cơ trên môi trường PVK được xác định sơ bộ thuộc chi *Pseudomonas* và *Burkholderia*. Nhằm định danh đến tên loài, cặp mồi 27F/1525R [9] đã được sử dụng trong phản ứng PCR để nhân đoạn gen 16S ARN ribosome của vi khuẩn.

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, các mẫu T2917 và T3602 tạo băng sản phẩm với kích thước khoảng 1.500 bp tương ứng với kích thước cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR (hình không đưa ra). Tiếp theo, sản phẩm PCR từ các mẫu này được tinh sạch bằng kit tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được giải trình tự 2 chiều dùng cặp mồi giống như trong phản ứng PCR. Sau khi cắt bỏ các đoạn nhiễu, thu được trình tự nucleotide của mẫu T2917 là 1.426 bp và mẫu T3602 là 1.429 bp. Các trình tự này đã được đăng ký lên Ngân hàng gen với mã truy cập MN272346 (mẫu T2917) và MN270338 (mẫu T3602).

Dựa trên trình tự nucleotide thu được, tiến hành tìm kiếm các chuỗi nucleotide gần gũi với trình tự của các mẫu phân tích bằng công cụ trực tuyến (BLAST search) trên Ngân hàng gen (bảng 4 và 5).

Bảng 4. Các trình tự gần gũi trên Ngân hàng gen của mẫu phân tích T2917.

STT	Tên loài gần gũi nhất*	Mã truy cập	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)
1	<i>P. oryzae</i> 16S ribosomal RNA gene	MG571765	100	99,93
2	<i>Pseudomonas</i> sp. Os24 16S ribosomal RNA gene	HQ728558	100	99,86
3	<i>P. oryzae</i> 16S ribosomal RNA gene	NR_117269	100	99,79

Ghi chú: *: chỉ trình bày 3 trình tự nucleotide.

Kết quả phân tích cho thấy, các trình tự nucleotide tìm được đều là các chuỗi mã hóa gen 16S ARN ribosome của vi khuẩn, trong đó mẫu T2917 (100% đoạn so sánh có mức đồng nhất trình tự 99,79-99,93%) gần gũi nhất với các mẫu phân lập thuộc loài *P. oryzae* đã được công bố có hoạt tính phân giải lân vô cơ, phân giải hydrocacbon. Vi khuẩn *P. oryzae* lần đầu được phát hiện trên rễ cây lúa tại Nhật Bản [12].

Các chuỗi nucleotide gần gũi với trình tự của mẫu phân tích T3602 được trình bày ở bảng 5.

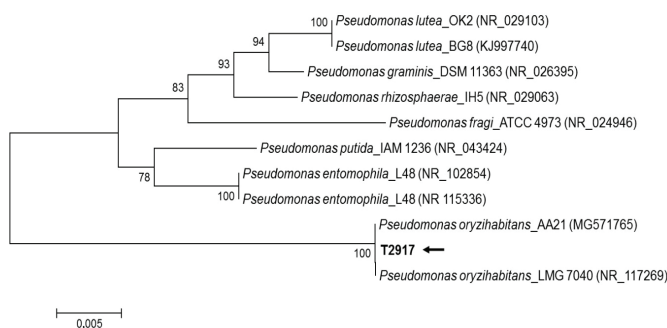
Bảng 5. Các trình tự gần gũi trên Ngân hàng gen của mẫu phân tích T3602.

STT	Tên loài gần gũi nhất*	Mã truy cập	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)
1	<i>Burkholderia</i> sp. 2 PSB-69 16S ribosomal RNA gene	KF761524	100	99,93
2	<i>Burkholderia</i> sp. MSMB33 16S ribosomal RNA gene	EF114423	100	98,39
3	<i>Burkholderia</i> sp. MSMB13 16S ribosomal RNA gene	EF114419	100	98,39

Ghi chú: *: chỉ trình bày 3 trình tự nucleotide.

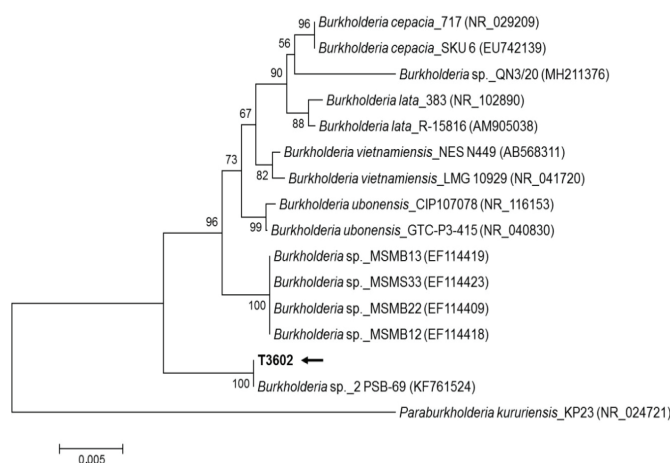
Kết quả tìm kiếm các chuỗi tương đồng trên Ngân hàng gen cho thấy, 100% trình tự của mẫu T3602 có mức đồng nhất cao nhất (99,93%) với loài vi khuẩn *Burkholderia* sp. 2 PSB-69 (mã truy cập KF761524) thuộc chi *Burkholderia*.

Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining và độ tin cậy của các mối quan hệ phả hệ được tính toán bằng kỹ thuật “bootstrap” với 1.000 lần lặp. Quan hệ của mẫu T2917 được so sánh với đại diện các mẫu chuẩn của loài. Kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Cây phả hệ dựa trên vùng 5' của gen 16S ARN ribosome của các mẫu vi khuẩn *Pseudomonas*.

Kết quả phân tích phả hệ cho thấy, mẫu T2917 nằm cùng nhánh với các mẫu phân lập đã được công bố là loài *P. oryzihabitans*. Dựa vào tài liệu đã công bố, vi khuẩn *P. oryzihabitans* có mức độ an toàn sinh học thuộc nhóm 2 [16]. Quan hệ phả hệ của mẫu T3602 được phân tích với đại diện của các mẫu chuẩn của loài thuộc chi *Burkholderia*. Kết quả được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Cây phả hệ dựa trên vùng 5' của gen 16S ARN ribosome của các mẫu vi khuẩn *Burkholderia*.

Kết quả phân tích phả hệ cho thấy rằng, mẫu T3602 nằm cùng nhánh với mẫu phân lập đã được công bố là loài *Burkholderia* sp. 2 PSB-69. Đây là loài vi khuẩn đã được công bố có hoạt tính phân giải lân vô cơ khó tan phân lập từ rễ cây cọ dầu tại Côlômbia [15]. Dựa vào tài liệu đã công bố, vi khuẩn *Burkholderia* sp. có mức độ an toàn sinh học thuộc nhóm 1 [16].

Nghiên cứu này đã xác định được chủng *P. oryzihabitans* T2917 và *Burkholderia* sp. T3602 có khả năng chịu NaCl $\geq 1\%$, có hoạt tính phân giải lân vô cơ, đảm bảo an toàn sinh học, đều có tiềm năng sản xuất chế phẩm vi sinh vật sử dụng cho cây ăn quả tại các vùng đất bị nhiễm mặn.

Kết luận

Đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn *P. oryzihabitans* T2917 và *Burkholderia* sp. T3602 từ vùng đất trồng bưởi Da xanh ở tỉnh Bến Tre có khả năng chịu nồng độ muối NaCl $\geq 3\%$, có hoạt tính phân giải lân vô cơ ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) với đường kính vòng phân giải $3,7 \pm 0,16$ và $2,2 \pm 0,44$ cm). Hai chủng này có tiềm năng trong sản xuất chế phẩm vi sinh sử dụng trong nông nghiệp, đặc biệt ở vùng đất bị nhiễm mặn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí do Bộ Khoa học và Công nghệ cấp thông qua đề tài mã số ĐTDL. CN-29/17. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.B. Sharma, R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi, T.A. Gobi (2013), "Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils", *SpringerPlus*, **2**(1), pp.587-591.
- [2] A. Atekan, Y. Nuraini, E. Handayanto, S. Syekhfani (2014), "The potential of phosphate solubilizing bacteria isolated from sugarcane wastes for solubilizing phosphate", *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, **1**(4), pp.175-182.
- [3] M. Tahir, M.A. Sarwar (2013), "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production", *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, **11**(1), pp.1-7.
- [4] D.S. Hayman (1975), *Phosphorus cycling by soil microorganisms and plant roots*, Soil Microbiology, Butterworths, London, pp.67-91.
- [5] A.C. Gaur (1990), *Phosphate solubilizing micro-organisms as biofertilizer*, Omega Scientific Publishers, New Dehli, 176 pp.
- [6] D. Paul, H. Lade (2014), "Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review", *Agronomy for Sustainable Development*, **34**(4), pp.737-752.
- [7] Nguyễn Xuân Thành, Vũ Thị Hoàn, Nguyễn Thế Bình, Đinh Hồng Duyên (2007), *Thực tập vi sinh vật chuyên ngành*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, 101tr.
- [8] H. Wang, M. Qi, A.J. Cutler (1993), "A simple method of preparing plant samples for PCR", *Nucleic Acids Research*, **21**(17), pp.41-53.
- [9] W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**(2), pp.697-703.
- [10] H.W. McWilliam, M. Li, S. Uludag, Y.M. Squizzato, N. Park, A.P. Buso, T. Cowley, R. Lopez (2013), "Analysis tool web services from the EMBL-EBI", *Nucleic Acids Research*, **41**, pp.597-600.
- [11] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar (2013), "MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729.
- [12] K. Kodama, N. Kimura and K. Komagata (1985), "Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **35**(4), pp.467-474.
- [13] E. Wahdi, N.R. Mubarak, R. Widyastuti (2016), "Characterization of phosphate solubilising bacteria from limestone quarry in Cirebon Indonesia", *Journal of International Environmental Application and Science*, **11**(4), pp.312-317.
- [14] Nguyễn Khởi Nghĩa, Nguyễn Thị Kiều Oanh (2017), "Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng hòa tan lân từ nền đất lúa trong mô hình canh tác lúa - tôm tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, **15**(1), tr.121-131.
- [15] E. Acevedo, T. Galindo-Castañeda, F. Prada, M. Navia, H.M. Romero (2014), "Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia", *Applied Soil Ecology*, **80**, pp.26-33.
- [16] L.C. Reimer, et al. (2018), "Bac Dive in 2019: bacterial phenotypic data for high-throughput biodiversity analysis", *Nucleic Acids Research*, **47**(D1), pp.631-636.

Nghiên cứu chọn dòng lúa Nàng Tét mùa đột biến theo hướng ngắn ngày, chất lượng và chống chịu mặn bằng phương pháp sốc nhiệt

Trần Thị Thanh Thúy^{1*}, Võ Công Thành², Phạm Thị Thanh²

¹Trung tâm Khuyến nông và Dịch vụ Nông nghiệp Tiền Giang

²Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 1/7/2019; ngày chuyển phản biện 5/7/2019; ngày nhận phản biện 23/8/2019; ngày chấp nhận đăng 30/8/2019

Tóm tắt:

Việc chủ động trong chọn tạo giống lúa ngắn ngày, chất lượng cao, có khả năng thích ứng tốt với điều kiện nhiễm mặn dưới tác động của biến đổi khí hậu ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long là rất cần thiết trong bối cảnh hiện nay. Giống lúa mùa Nàng Tét ven biển đã được thu thập tại huyện Thạnh Phú (Bến Tre) để làm nguồn vật liệu nghiên cứu, gây đột biến trên 100 hạt đang nảy mầm ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 5 phút. Các cá thể được chọn lọc từ thế hệ M₁-M₃ theo hướng ngắn ngày (<110 ngày), chất lượng (amylose <20%) và chịu mặn (12-14%). Kết quả cho thấy, có 20 dòng/cá thể được chọn lọc bằng phương pháp xử lý đột biến sốc nhiệt ở 50°C trong thời gian 5 phút ở giai đoạn hạt đang nảy mầm trên giống lúa Nàng Tét mùa qua các thế hệ M₁-M₃ với thời gian sinh trưởng ngắn (95-100 ngày), chống chịu mặn khá (cấp 3) ở độ mặn 12‰, trung bình (cấp 5) ở độ mặn 14‰ và chất lượng gạo được cải thiện (amylose 9,65-14,54%, độ trở hồ cấp 3, độ bền thể gel cấp 1) so với đối chứng Nàng Tét mùa không qua xử lý đột biến (thời gian sinh trưởng 180 ngày, chịu mặn trung bình cấp 5 ở độ mặn 12‰, nhiễm cấp 7 ở độ mặn 14‰, amylose 20-25%, độ trở hồ cấp 1, độ bền thể gel cấp 3). Trong đó, có 8 dòng/cá thể có triển vọng cho năng suất cao nhất (35,35-65,08 g/cây) so với đối chứng 33,69 g/cây.

Từ khóa: chịu mặn, giống lúa đột biến, thời gian sinh trưởng ngắn.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) trong các năm gần đây đã và đang phải đối mặt với nhiều tác động tiêu cực của biến đổi khí hậu, đó là tình trạng hạn, mặn diễn ra ngày càng nghiêm trọng trên diện rộng. Riêng về xâm nhập mặn, từ cuối năm 2015 đến cuối năm 2016, mặn đã ảnh hưởng đến 10/13 tỉnh ở ĐBSCL với tổng diện tích lúa bị thiệt hại 139.000 ha, trong đó 86.000 ha bị thiệt hại trên 70% năng suất và 43.000 ha thiệt hại từ 30-70% năng suất. Đồng thời, theo dự báo xu hướng nhiễm mặn ở ĐBSCL sẽ còn tiếp tục diễn ra khốc liệt hơn trong các năm tới. Chính vì thế, việc chọn tạo giống lúa có khả năng chống chịu mặn cao để chủ động trong việc ứng phó với biến đổi khí hậu đang diễn ra ngày càng phức tạp ở vùng ĐBSCL là rất cần thiết. Hơn nữa, tính chống chịu mặn do đa gen kiểm soát (9 trong 12 gen đồng kiểm soát) nên việc chọn tạo là mất thời gian và tốn kém.

Xuất phát từ những lý do trên, việc nghiên cứu chọn dòng lúa Nàng Tét mùa đột biến theo hướng ngắn ngày, chất lượng và chống chịu mặn bằng phương pháp sốc nhiệt được thực hiện nhằm góp phần trong công tác chọn lọc các dòng/giống lúa ưu tú, có khả năng thích nghi điều kiện biến đổi khí hậu, đặc biệt là tình trạng nhiễm mặn để giúp ổn định năng suất, sản lượng và an ninh lương thực.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Giống: giống lúa Nàng Tét mùa ven biển thu thập ở huyện

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

Thạnh Phú, tỉnh Bến Tre, được cung cấp bởi Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Giống lúa Nàng Tét mùa có một số đặc tính như trong bảng 1.

Bảng 1. Một số đặc tính của giống lúa Nàng Tét mùa [1].

Đặc tính giống	Lúa Nàng Tét mùa
Thời gian sinh trưởng	Lúa mùa, chịu ảnh hưởng quang kỳ, 180 ngày
Chống chịu mặn	20 dS/m (12,8‰)
Hàm lượng amylose	20-25%
Hàm lượng protein	7,17%
Độ bền thể gel	Cấp 3
Độ trở hồ	Cấp 1
Chiều dài và hình dạng hạt	Trung bình (6,3 mm)

Thiết bị: cân điện tử, máy đo độ ẩm hạt, tủ sấy, cân phân tích, Water Bath, Microwave, máy đo độ mặn Maxtini instruments Mi 306, bộ nguồn điện di protein SDS-PAGE và một số dụng cụ khác.

Hóa chất: dung dịch Iod, HCl 30%, Ethanol 95%, NaOH 0,1N, NaOH 1N, KOH 1,7%, Folin 1N và một số dung dịch khác có liên quan.

Thời gian và địa điểm: thí nghiệm được thực hiện tại nhà lưới, phòng thí nghiệm, Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ từ tháng 12/2016 đến tháng 2/2018.

Phương pháp nghiên cứu

Các bước tiến hành: thực hiện theo sơ đồ ở hình 1.

Rice breeding for salt tolerance, short maturity duration, and with high grain quality after treating with high temperature for seeds of Nang Tet variety

Thi Thanh Thuy Tran^{1*}, Cong Thanh Vo², Thi Thanh Pham²

¹Tien Giang Agricultural Extension and Service Center

²College of Agriculture, Can Tho University

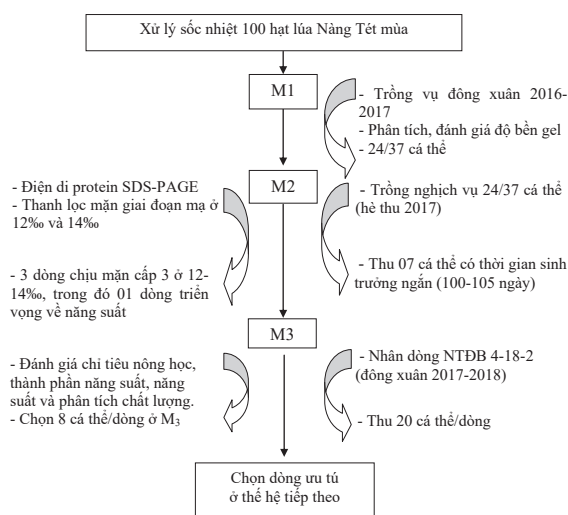
Received 1 July 2019; accepted 30 August 2019

Abstract:

Breeding rice for salt tolerance, short maturity duration, high grain quality, and good adaption to climate change is the most important problem in the Mekong Delta. Nang Tet rice variety collected in Thanh Phu district, Ben Tre province was used as a source of research materials. 100 seeds at germination stage was treated at 50°C for 5 minutes. Subsequently, the treated seeds together with the control were propagated from M₁ to M₃ generations in the green house condition; critical selection was based on short-maturity individuals (<110 days), amylose content <20% and salt tolerance in Yoshida media 12-14%. Results showed that 20 induced useful dominant mutation individuals had good traits such as short-maturity duration (95-100 days), salt tolerance at 12‰ (level 3), and 14‰ (level 5); low amylose content (9.65-14.54%), gelatinisation at level 3, gel consistency at level 1; those were better than that of the control (180 days, salt tolerance at 12‰ (level 3), and 14‰ (level 5), amylose content of 20-25%, gelatinisation at level 1, gel consistency at level 3). Among them, eight individuals that gave the highest potential yield (35.35-65.08 g/plant) compared with the control (33.69 g/plant) was selected as good candidates to develop salt tolerant and good quality rice varieties.

Keywords: mutation rice variety, salt tolerance, short-maturity duration.

Classification number: 4.6



Hình 1. Sơ đồ trình tự các nội dung nghiên cứu.

Phương pháp thu thập, đánh giá các chỉ tiêu và xử lý số liệu:

Thu thập các chỉ tiêu nông học, thành phần năng suất và năng suất lý thuyết.

Phân tích một số chỉ tiêu về phẩm chất gạo như: chiều dài, rộng, dạng hạt gạo; nhiệt trở hồ theo IRRI [2]; hàm lượng amylose theo IRRI [3]; độ bền thể gel theo Tang và ctv [4]; hàm lượng protein theo O.H. Lowry và ctv [5]; đánh giá khả năng chịu mặn

của lúa trong dung dịch Yoshida theo IRRI [6]; điện di protein SDS-PAGE theo phương pháp Laemmli [7]. Xử lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel.

Kết quả và thảo luận

Qua kết quả phân tích, đánh giá về độ bền thể gel thu được 24/37 cá thể Nàng Tét đột biến (NTĐB) ở thế hệ M₁. Giữa các cá thể có biểu hiện sự phân ly thay đổi khá nhiều về độ bền thể gel từ rất mềm đến rất cứng (cấp 1 đến cấp 9) so với đối chứng ban đầu có độ bền thể gel cấp 3 (bảng 2). Theo Nguyễn Ngọc Đề [8], độ bền gel cứng có liên hệ chặt với tính cứng cơm và thường thấy rõ ở những giống có hàm lượng amylose cao. Dựa vào kết quả bảng 2 chọn ra 19/24 cá thể có độ bền thể gel từ mềm đến rất mềm (cấp 1-3) để tiếp tục theo dõi.

Chỉ tiêu nông học và thành phần năng suất của các cá thể lúa NTĐB ở thế hệ M₂

Sau khi trồng 19 cá thể có độ bền thể gel (cấp 1-3) ở thế hệ M₁ trong mùa nghịch, có 7/19 cá thể trổ sớm hơn so với đối chứng (không trổ), thời gian sinh trưởng (TGST) dao động từ 100-105 ngày, trung bình 103 ngày. Chiều cao cây của các cá thể dao động từ 91-162 cm, trung bình 120 cm. Số bông/bụi của các cá thể cũng có sự dao động lớn, từ 2-17 bông. Số hạt chắc/bông giữa các cá thể biến thiên từ 39-119 hạt. Tỷ lệ hạt chắc dao động từ 42,37-73,10% (bảng 3).

Bảng 2. Chiều dài thể gel và năng suất của các cá thể sau xử lý đột biến ở M_1 .

TT	Cá thể	Chiều dài thể gel (mm)	Cấp	Đánh giá	Năng suất (g/bụi)
1	NTĐB 4-1	33	9	Rất cứng	14
2	NTĐB 4-2	66	3	Mềm	20
3	NTĐB 4-3	85	1	Rất mềm	40
4	NTĐB 4-4	85	1	Rất mềm	41
5	NTĐB 4-5	85	1	Rất mềm	18
6	NTĐB 4-6	83	1	Rất mềm	37
7	NTĐB 4-8	78	3	Mềm	14
8	NTĐB 4-9	73	3	Mềm	17
9	NTĐB 4-12	85	1	Rất mềm	21
10	NTĐB 4-13	60	5	Trung bình	18
11	NTĐB 4-14	58	5	Trung bình	43
12	NTĐB 4-17	80	1	Rất mềm	19
13	NTĐB 4-18	66	3	Mềm	12
14	NTĐB 4-19	63	3	Mềm	13
15	NTĐB 4-20	61	3	Mềm	25
16	NTĐB 4-23	53	5	Trung bình	14
17	NTĐB 4-25	66	3	Mềm	39
18	NTĐB 4-28	81	1	Rất mềm	17
19	NTĐB 4-29	61	3	Mềm	20
20	NTĐB 4-30	61	3	Mềm	20
21	NTĐB 4-34	70	3	Mềm	15
22	NTĐB 4-35	35	7	Cứng	14
23	NTĐB 4-36	63	3	Mềm	16
24	NTĐB 4-37	65	3	Mềm	20
25	NT mùa (ĐC)	65	3	Mềm	14

Ghi chú: NTĐB 4-1 - NTĐB 4-37: các cá thể hạt M_1 ; ĐC: đối chứng - giống lúa Nàng Tét mùa.

Bảng 3. Một số chỉ tiêu nông học của 7 cá thể NTĐB trở sớm chọn ở thế hệ M_2 .

TT	Cá thể	TGST (ngày)	Cao cây (cm)	Số bông/bụi	Hạt chắc/bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)
1	NTĐB 4-9-1	105	98	4	39	48,75
2	NTĐB 4-18-1	103	107	2	68	42,37
3	NTĐB 4-18-2	103	110	12	118	64,48
4	NTĐB 4-19-1	103	162	17	106	73,10
5	NTĐB 4-20-1	103	150	11	100	65,83
6	NTĐB 4-20-2	100	121	5	119	73,01
7	NTĐB 4-30-1	103	91	3	40	50,63
Trung bình±SD		103±1,46	120±26,58	7,71±5,64	84,29±34,97	59,74±12,38
Đối chứng		Không trồng	-	-	-	-

Ghi chú: đối chứng là giống lúa Nàng Tét mùa.

Theo Yoshida và ctv [9], những giống lúa có TGST ở khoảng này là tương đối phù hợp để cây có đủ thời gian tích lũy chất khô và cho năng suất cao. Các cá thể NTĐB có thời gian sinh trưởng ngắn sẽ thuận lợi hơn so với các giống có TGST dài trong điều kiện canh tác ở ĐBSCL, tạo điều kiện tăng vụ trong năm, có thời gian cho đất nghỉ, đồng thời có thể điều chỉnh được lịch gieo trồng để tránh ảnh hưởng của xâm nhập mặn. Chiều cao cây là yếu tố quan trọng đối với một số giống lúa, quyết định phần lớn lượng đổ ngã và góp phần tăng năng suất [10]. Chiều cao cây lúa từ 90-100 cm được xem là lý tưởng về mặt năng suất [11] và trung bình cao từ 80-110 cm là yêu cầu lý tưởng cho giống lúa năng suất cao ở Việt Nam [12]. Đẻ nhánh có ý nghĩa quan trọng đối với năng suất lúa khi thu hoạch vì trực tiếp ảnh hưởng đến số bông trên đơn vị diện tích [13]. Đối với lúa cây có số hạt chắc/bông từ 100-120 hạt là tốt nhất trong điều kiện canh tác ở ĐBSCL. Bên cạnh số hạt chắc/bông thì phần trăm hạt chắc cũng là một trong những thành phần giữ vai trò quan trọng trong giới hạn năng suất lúa, nhất là trong những điều kiện bất lợi [10]. Lúa trổ vào khoảng tháng 5

đương lịch, ngay thời điểm đầu mùa mưa, ảnh hưởng lớn đến sự thụ phấn, là nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ hạt chắc thấp trong thí nghiệm này. Với sự chênh lệch lớn về số bông/bụi (15 bông/bụi), số hạt chắc/bông (80 hạt/bông) giữa các cá thể cho thấy NTĐB còn chưa ổn định về mặt di truyền, cần theo dõi thêm ở các thế hệ sau.

Thử nghiệm tính chống chịu mặn giai đoạn mạ của các dòng lúa NTĐB ở thế hệ M_2

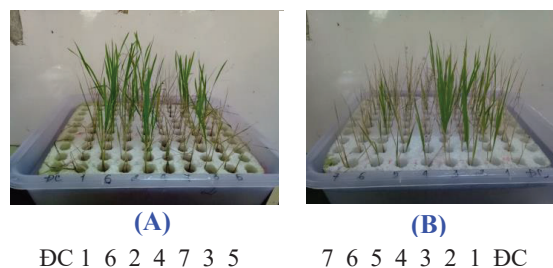
Theo tiêu chuẩn đánh giá tính chống chịu mặn của IRRI [14] cho thấy, có 3 dòng lúa đột biến (NTĐB 4-9-1, NTĐB 4-18-1 và NTĐB 4-18-2) được đánh giá thể hiện tính chống chịu mặn khá (cấp 3) so với giống đối chứng chống chịu trung bình (cấp 5) ở nồng độ muối 12‰ và nhiễm (cấp 7) ở nồng độ muối 14‰ giai đoạn mạ sau 12 ngày thử mặn (bảng 4 và hình 2). Có rất nhiều báo cáo khác nhau về ảnh hưởng của mặn đến sinh trưởng của cây lúa. Tuy nhiên, hầu hết các giống lúa đều bị ảnh hưởng rõ rệt trong giai đoạn mạ [15].

Bảng 4. Khả năng chịu mặn ở nồng độ 12‰ và 14‰ của các dòng lúa NTĐB ở thế hệ M_2 .

TT	Cá thể	12‰		14‰	
		Cấp	Đánh giá	Cấp	Đánh giá
1	NTĐB 4-9-1	3	Chống chịu khá	5	Chống chịu trung bình
2	NTĐB 4-18-1	3	Chống chịu khá	5	Chống chịu trung bình
3	NTĐB 4-18-2	3	Chống chịu khá	5	Chống chịu trung bình
4	NTĐB 4-19-1	5	Chống chịu trung bình	9	Rất nhiễm
5	NTĐB 4-20-1	7	Nhiễm	9	Rất nhiễm
6	NTĐB 4-20-2	5	Chống chịu trung bình	7	Nhiễm
7	NTĐB 4-29-1	9	Rất nhiễm	9	Rất nhiễm
8	ĐC 1 (NTM)	5	Chống chịu trung bình	7	Nhiễm
9	ĐC 2 (IR28)	9	Rất nhiễm	9	Rất nhiễm

Ghi chú: ĐC 1: đối chứng 1 (Nàng Tét mùa); ĐC2: đối chứng 2 (IR28 chuẩn nhiễm).

Hình 2. Kết quả đánh giá lúa sau 12 ngày thanh lọc mặn ở giai

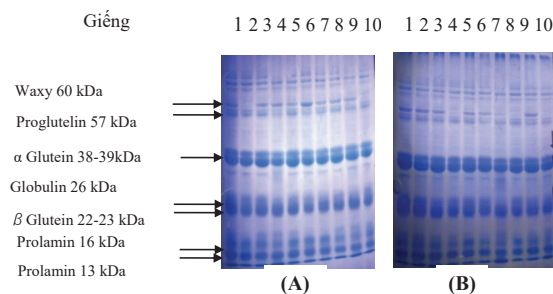


đoạn mạ. (A): nồng độ muối 12‰; (B): nồng độ muối 14‰.

(ĐC: IR28; 1: NTĐB 4-9-1; 2: NTĐB 4-18-1; 3: NTĐB 4-18-2; 4: NTĐB 4-19-1; 5: NTĐB 4-20-1; 6: NTĐB 4-20-2; 7: NTĐB 4-29-1).

Đánh giá dự đoán sớm chất lượng mềm cơm các dòng lúa NTĐB thế hệ M_2 bằng kỹ thuật điện di Protein SDS-PAGE

Kết quả phân tích protein tổng số của các dòng lúa NTĐB ở thế hệ M_2 cho thấy, băng protein waxy 60 kDa ở các cá thể đa số đều ăn màu thuốc nhuộm, tuy nhiên độ đậm nhạt là khác nhau giữa các cá thể và giữa các hạt trong cùng một cá thể (hình 3). Theo Võ Công Thành [16], protein waxy có tương quan thuận với hàm lượng amylose nên việc phân tích bán định lượng waxy cũng góp phần dự đoán hàm lượng amylose. Từ kết quả trên cho thấy, các cá thể ở thế hệ M_2 còn chưa ổn định về mặt di truyền. Do đó cần tiếp tục theo dõi ở thế hệ sau.



Hình 3. Kết quả chạy SDS-PAGE của cá thể ở thể hệ M_2 (A) NTĐB 4-18-1 và (B) NTĐB 4-18-2.

Chỉ tiêu nông học, thành phần năng suất và năng suất của các cá thể lúa NTĐB ở thể hệ M_3

Ở thể hệ M_3 , 20 cá thể/dòng được thu thập theo hướng có TGST ngắn và phân tích chất lượng để chọn dòng ưu tú. Kết quả cho thấy, TGST của 20 cá thể/dòng dao động từ 95 đến 100 ngày, trung bình 97 ngày, thuộc nhóm A_1 (bảng 5). TGST của các cá thể ở thể hệ M_3 đã rút ngắn hơn rất nhiều, khoảng 80-85 ngày so với đối chứng Nàng Tét mùa (180 ngày). Với TGST ngắn, các cá thể NTĐB sẽ thuận lợi hơn so với các giống có TGST dài trong điều kiện canh tác ở ĐBSCL, tạo điều kiện tăng vụ trong năm, có thời gian cho đất nghỉ, đồng thời có thể điều chỉnh được lịch gieo trồng để tránh ảnh hưởng của xâm nhập mặn.

Chiều cao các cá thể dao động trong khoảng 115-126 cm, cho thấy có sự phân ly di truyền giữa các thể hệ. Theo Bùi Chí Bửu và ctv [17], có ít nhất 5 nhóm gen điều khiển tính trạng chiều cao cây lúa. Chiều dài bông của các cá thể dao động từ 21,2-24,8 cm, trung bình 22,9 cm, không thay đổi nhiều so với đối chứng (23 cm). Số bông/bụi của các cá thể ở thể hệ M_3 có sự thay đổi từ 5-21 bông, cao nhất là NTĐB 4-18-2-14 (21 bông), thấp nhất là NTĐB 4-18-2-9 và NTĐB 4-18-2-19 (5 bông). Số hạt chắc của các cá thể biến động từ 87-132 hạt. Khối lượng (KL) 1.000 hạt giữa các cá thể thay đổi từ 25,2-28,9 g, trung bình 27,0 g so với đối chứng 26,0 g. Năng suất (NS) của 20 cá thể biến thiên từ 13,30 g/bụi (NTĐB 4-18-2-9) đến 65,08 g/bụi (NTĐB 4-18-2-12), trung bình đạt 33,03 g/bụi so với đối chứng 33,69 g/bụi. Trong đó có 8 cá thể/dòng có triển vọng cho năng suất cao (35,35-65,08 g/bụi) (bảng 5).

Bảng 5. Đặc tính nông học của các cá thể NTĐB ở thể hệ M_3 .

TT	Cá thể/dòng	TGST (ngày)	Cao cây (cm)	Dài bông (cm)	Bông/bụi	Hạt chắc/bông	KL 1.000 hạt (g)	NS (g/bụi)
1	NTĐB 4-18-2-1	95	121	23,5	12	110	27,6	36,46
2	NTĐB 4-18-2-2	95	115	24,0	13	94	28,9	35,35
3	NTĐB 4-18-2-3	96	124	22,5	15	123	26,5	48,83
4	NTĐB 4-18-2-4	95	122	23,8	15	125	26,7	50,11
5	NTĐB 4-18-2-5	98	126	24,8	10	117	26,7	31,20
6	NTĐB 4-18-2-6	95	121	23,2	9	98	27,2	23,93
7	NTĐB 4-18-2-7	95	120	21,3	8	108	26,8	23,18
8	NTĐB 4-18-2-8	100	118	22,8	6	99	27,9	16,55
9	NTĐB 4-18-2-9	98	116	21,2	5	98	27,2	13,30
10	NTĐB 4-18-2-10	96	121	23,0	7	99	25,6	17,73
11	NTĐB 4-18-2-11	95	126	21,5	6	87	28,3	14,75
12	NTĐB 4-18-2-12	98	120	23,0	19	128	26,8	65,08
13	NTĐB 4-18-2-13	96	121	24,7	11	100	26,5	29,19

14	NTĐB 4-18-2-14	98	125	22,4	21	106	27,4	61,07
15	NTĐB 4-18-2-15	100	121	23,7	13	132	26,6	45,71
16	NTĐB 4-18-2-16	96	116	23,5	18	115	25,2	52,13
17	NTĐB 4-18-2-17	100	119	22,6	10	103	28,8	29,61
18	NTĐB 4-18-2-18	96	122	22,2	9	93	26,4	22,10
19	NTĐB 4-18-2-19	96	126	23,2	5	101	28,2	14,22
20	NTĐB 4-18-2-20	100	123	21,8	12	98	25,6	30,06
Trung bình±SD		97±2,5	121±5,0	22,9±1,0	11,2±4,7	107±12,7	27,0±1,0	33,0±15,9
Đối chứng		180	120	23,0	12	108	26,0	33,69

Ghi chú: đối chứng là giống lúa Nàng Tét mùa.

Chỉ tiêu chất lượng gạo của các cá thể lúa NTĐB thể hệ M_3

Kết quả bảng 6 cho thấy, cả 20 cá thể đột biến thể hệ M_3 có chiều dài hạt biến thiên từ 6,1-6,3 mm, tỷ lệ dài/rộng (2,4-2,6), thuộc dạng hạt trung bình. Độ bền thể gel trong khoảng 86-95 mm, được đánh giá rất mềm (cấp 1) so với đối chứng (cấp 3). Nhiệt trở hồ của 20 cá thể đột biến ở cấp 3 và có thay đổi so với đối chứng (cấp 1) (bảng 6). Từ kết quả thí nghiệm thấy rằng, hình dạng và kích thước hạt của các cá thể sau xử lý đột biến bằng sốc nhiệt không bị ảnh hưởng. Đây là tính trạng được cho là ổn định và ít chịu ảnh hưởng nhất bởi yếu tố môi trường. Theo Tang và ctv [4], các giống lúa có hàm lượng amylose như nhau có thể khác biệt về độ bền thể gel, giống có độ bền thể gel mềm hơn được ưa chuộng hơn. Chất lượng nấu nướng được xác định bởi hàm lượng amylose và nhiệt trở hồ (độ trở hồ), ít phụ thuộc vào hàm lượng protein. Gạo có nhiệt trở hồ cao ít nở, cần nhiều nước và thời gian nấu chín lâu hơn.

Bảng 6. Dạng hạt, độ bền thể gel và nhiệt trở hồ của các cá thể đột biến ở thể hệ M_3 .

TT	Cá thể	Dài hạt (mm)	Dài/Rộng hạt	Dạng hạt	Chiều dài thể gel (mm)	Độ bền thể gel (cấp)	Nhiệt trở hồ (cấp)
1	NTĐB 4-18-2-1	6,2	2,5	Trung bình	90	1	3
2	NTĐB 4-18-2-2	6,2	2,4	Trung bình	90	1	3
3	NTĐB 4-18-2-3	6,3	2,6	Trung bình	90	1	3
4	NTĐB 4-18-2-4	6,2	2,5	Trung bình	87	1	3
5	NTĐB 4-18-2-5	6,1	2,4	Trung bình	88	1	3
6	NTĐB 4-18-2-6	6,3	2,5	Trung bình	95	1	3
7	NTĐB 4-18-2-7	6,2	2,6	Trung bình	90	1	3
8	NTĐB 4-18-2-8	6,3	2,5	Trung bình	86	1	3
9	NTĐB 4-18-2-9	6,3	2,5	Trung bình	95	1	3
10	NTĐB 4-18-2-10	6,2	2,5	Trung bình	90	1	3
11	NTĐB 4-18-2-11	6,2	2,6	Trung bình	95	1	3
12	NTĐB 4-18-2-12	6,2	2,5	Trung bình	90	1	3
13	NTĐB 4-18-2-13	6,2	2,6	Trung bình	90	1	3
14	NTĐB 4-18-2-14	6,2	2,5	Trung bình	90	1	3
15	NTĐB 4-18-2-15	6,2	2,5	Trung bình	90	1	3
16	NTĐB 4-18-2-16	6,1	2,5	Trung bình	90	1	3
17	NTĐB 4-18-2-17	6,1	2,4	Trung bình	90	1	3
18	NTĐB 4-18-2-18	6,2	2,5	Trung bình	90	1	3
19	NTĐB 4-18-2-19	6,3	2,6	Trung bình	95	1	3
20	NTĐB 4-18-2-20	6,2	2,6	Trung bình	90	1	3
Trung bình±S		6,2±0,1	2,5±0,1	-	90,6±4,0	-	-
Đối chứng		6,3	2,5	Trung bình	68	3	1

Hàm lượng amylose của các cá thể đột biến dao động từ 9,65-14,54%, thuộc phân nhóm từ thấp cho đến rất thấp. Hàm lượng protein của các cá thể đột biến biến thiên từ 5,90-9,80% (bảng 7). Theo Nguyễn Ngọc Đề [8], gạo có hàm lượng amylose thấp sẽ cho cơm mềm, dẻo khi nấu chín và không khô khi để nguội, nhưng đối với gạo có hàm lượng amylose cao thì ngược lại. Hàm lượng amylose trong nội nhũ là chỉ số quyết định chất lượng gạo, do đó cải thiện hàm lượng amylose xuống mức thấp hay trung bình là một tiêu chí đặt ra cần quan tâm đối với các nhà chọn giống. Ngoài ra, trong công tác chọn giống, bên cạnh việc chọn ra những giống lúa mềm cơm thì hàm lượng protein trong hạt cao cũng là yếu tố được chú trọng.

Bảng 7. Hàm lượng amylose (%) và protein (%) của 20 cá thể NTĐB ở thể hệ M_3 .

TT	Cá thể	Amylose (%)	Phân nhóm	Phân loại	Protein (%)
1	NTĐB 4-18-2-1	11,36	Thấp	Gạo dẻo	6,00
2	NTĐB 4-18-2-2	11,32	Thấp	Gạo dẻo	5,90
3	NTĐB 4-18-2-3	11,30	Thấp	Gạo dẻo	6,10
4	NTĐB 4-18-2-4	10,05	Thấp	Gạo dẻo	6,70
5	NTĐB 4-18-2-5	11,47	Thấp	Gạo dẻo	9,10
6	NTĐB 4-18-2-6	10,30	Thấp	Gạo dẻo	8,10
7	NTĐB 4-18-2-7	11,93	Thấp	Gạo dẻo	8,20
8	NTĐB 4-18-2-8	12,48	Thấp	Gạo dẻo	7,90
9	NTĐB 4-18-2-9	11,72	Thấp	Gạo dẻo	8,00
10	NTĐB 4-18-2-10	10,86	Thấp	Gạo dẻo	8,40
11	NTĐB 4-18-2-11	11,94	Thấp	Gạo dẻo	8,50
12	NTĐB 4-18-2-12	9,65	Rất thấp	Gạo dẻo	9,60
13	NTĐB 4-18-2-13	10,90	Thấp	Gạo dẻo	9,60
14	NTĐB 4-18-2-14	10,86	Thấp	Gạo dẻo	7,80
15	NTĐB 4-18-2-15	11,23	Thấp	Gạo dẻo	9,00
16	NTĐB 4-18-2-16	14,54	Thấp	Gạo dẻo	8,90
17	NTĐB 4-18-2-17	11,64	Thấp	Gạo dẻo	6,80
18	NTĐB 4-18-2-18	10,49	Thấp	Gạo dẻo	6,80
19	NTĐB 4-18-2-19	13,33	Thấp	Gạo dẻo	9,80
20	NTĐB 4-18-2-20	13,90	Thấp	Gạo dẻo	9,80
	Trung bình $\pm$ Sd	11,56 $\pm$ 2,45	-	-	8,05 $\pm$ 1,08
	Đối chứng	20,86	Trung bình	Mềm	8,01

Như vậy, qua nghiên cứu cho thấy phương pháp đột biến bằng sốc nhiệt ở giai đoạn hạt đang nảy mầm trên giống lúa Nàng Tét mùa đã tạo ra các cá thể/dòng đột biến theo hướng cải thiện một số đặc tính về TGST ngắn, tính chống chịu mặn và chất lượng gạo đặc biệt, như hàm lượng amylose, độ trở hồ, độ bền thể gel theo hướng chất lượng hơn so với đối chứng không qua xử lý (bảng 8). Kết quả này cũng đã được tìm thấy trong nghiên cứu về xử lý đột biến bằng phương pháp sốc nhiệt trên giống lúa Sỏi mùa [18].

Bảng 8: Một số đặc tính giống lúa được cải thiện sau xử lý đột biến so với giống đối chứng.

Đặc tính giống/dòng	Lúa mùa Nàng Tét lùn (ĐC)	Dòng sau xử lý đột biến
Thời gian sinh trưởng	Lúa mùa (180 ngày)	Ngắn ngày (93-96 ngày)
Chống chịu mặn	Cấp 5 ở 18,75 dS/m (12%) Cấp 7 ở 21,86 dS/m (14%)	Cấp 3 ở 18,75 dS/m (12%) Cấp 5 ở 21,86 dS/m (14%)
Hàm lượng amylose	Trung bình (20-25%)	Rất thấp - Thấp (9,65-14,54%)
Hàm lượng protein	7,17%	5,90-9,80%
Độ bền thể gel	Cấp 3	Cấp 1
Độ trở hồ	Cấp 1	Cấp 3
Dài hạt, dạng hạt	Trung bình (6,3 mm)	Trung bình (6,2 mm)

Kết luận và kiến nghị

Bằng phương pháp xử lý đột biến sốc nhiệt ở 50°C trong thời gian 5 phút ở giai đoạn hạt đang nảy mầm trên giống lúa Nàng Tét mùa đã cho kết quả trong việc tạo ra các cá thể đột biến qua các thế hệ M_1 - M_3 theo hướng cải thiện một số đặc tính như thời gian sinh trưởng ngắn (100-105 ngày), chống chịu mặn cao hơn đối chứng (cấp 3 ở 12‰, cấp 5 ở 14‰) và chất lượng gạo như hàm lượng amylose (9,65-14,54%), độ trở hồ (cấp 3), độ bền thể gel (cấp 1) so với đối chứng không qua xử lý đột biến.

Cần tiếp tục thanh lọc mặn ở các thế hệ tiếp theo và phân tích để đánh giá gen liên quan đến tính chống chịu mặn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Đức Vinh (2016), *Chọn dòng lúa mùa Nàng Tét lùn theo hướng chất lượng tốt và chịu mặn*, Luận văn tốt nghiệp kỹ sư khoa học cây trồng, chuyên ngành công nghệ giống cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ.
- [2] IRRI (2013), *Standard evaluation and utilization system for rice*, International Rice Research Institute, Philippines.
- [3] IRRI (1988), *Standard evaluation system for rice*, International Rice Research Institute, Philippines.
- [4] S.X. Tang, G.S. Khush and B.O. Juliano (1989), "Diallel analysis of gel consistency in rice (*Oryza saliva* L.)", *Sabara J.*, **21**, pp.135-142.
- [5] O.H. Lowry, N.J. Rosebroug, A.L. Farr and R.J. Raldall (1951), "Protein measurement with the Folin phenol reagen", *Bio. Chem.*, **193**, pp.265-275.
- [6] IRRI (1997), *Screening rice for salinity tolerance*, International Rice Research Institute, Philippines.
- [7] U.K. Laemmli (1970), "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, **227**, pp.680-685.
- [8] Nguyễn Ngọc Đề (2008), *Giáo trình cây lúa*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh.
- [9] S. Yoshida, D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomer (1976), *Laboratory manual for physiological studies of rice*, International Rice Research Institute, Philippines.
- [10] Yoshida (1981), *Cơ sở khoa học cây lúa*, Nhà xuất bản Trường Đại học Cần Thơ.
- [11] S. Akita (1989), *Improving yield potential in tropical rice*, International Rice Research Institute, Philippines.
- [12] Võ Tổng Xuân (1979), *Cải tiến giống lúa*, Nhà xuất bản Trường Đại học Cần Thơ.
- [13] Trương Dịch (2000), *Kỹ thuật trồng các giống lúa mới*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [14] P. Deepa Sankar, M.A. Arabi Mohamed Saleh and C. Immanuel Selvaraj (2011), "Review Article: Rice breeding for salt tolerance", *Research in Biotechnology*, **2(2)**, pp.1-10.
- [15] S. Akita (1986), *Physiological basis of differential response to salinity in rice cultivars*, International Rice Research Institute, Philippines.
- [16] Võ Công Thành (2003), *Bài giảng kỹ thuật di truyền*, Bộ môn Khoa học cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ.
- [17] Bùi Chí Bửu, Lê Cẩm Loan, Nguyễn Duy Bảy và Nguyễn Văn Tạo (1992), "Thu thập và đánh giá quỹ gen lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long", *Tạp chí Khoa học kỹ thuật nông nghiệp và quản lý kinh tế*, Trường Đại học Cần Thơ, **357**, tr.90-97.
- [18] Quan Thị Ái Liên, Võ Công Thành và Nguyễn Văn Cường (2013), "Đánh giá năng suất của năm giống/dòng lúa trồng ở vùng đất nhiễm mặn huyện Hồng Dân, tỉnh Bạc Liêu", *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại học Cần Thơ, **27**, tr.88-96.

Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) thông qua *Agrobacterium rhizogenes* K599

Phí Thị Cẩm Miện^{1*}, Nguyễn Minh Đức¹, Kim Anh Tuấn¹, Nguyễn Đức Bách¹, Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Lê Thị Vân Anh³, Dương Phương Thảo⁴

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

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Trường THPT chuyên Lê Hồng Phong, Nam Định

Ngày nhận bài 23/9/2019; ngày chuyển phản biện 26/9/2019; ngày nhận phản biện 28/10/2019; ngày chấp nhận đăng 31/10/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm cảm ứng tạo rễ tơ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* K599 và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng sinh khối rễ tơ. Ba loại vật liệu khác nhau là mô sẹo, lá mầm và rễ cây con *in vivo* được sử dụng làm nguồn lây nhiễm cảm ứng tạo rễ tơ. Kết quả cho thấy, rễ cây con *in vivo* là loại vật liệu thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ cây xáo tam phân. Mật độ vi khuẩn cho tỷ lệ mô rễ cảm ứng tạo rễ cao nhất (42,7%) tương ứng với giá trị mật độ quang OD₆₀₀=0,6 trong thời gian lây nhiễm là 30 phút. Các dòng rễ tơ có khả năng tăng trưởng nhanh, ổn định và hiệu quả hình thành rễ tơ cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường WPM/2 không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng ở điều kiện tối trong 6 ngày. Chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang ức chế sự hình thành rễ tơ giai đoạn ủ cảm ứng nhưng thúc đẩy quá trình này khi áp dụng ở bước loại bỏ vi khuẩn. Các dòng rễ tơ chuyển gen đã được kiểm chứng nhờ kỹ thuật PCR với cặp mồi chuyên rolC.

Từ khóa: *Agrobacterium rhizogenes*, nhân nhanh, phytohormon, rễ tơ.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) là một loài dược liệu quý ở Việt Nam, chứa hàm lượng hoạt chất sinh học chống ung thư cao như coumarin, otruthin, saponin. Những hợp chất này đã được chứng minh có tác dụng điều trị nhiều bệnh ung thư, đặc biệt là ung thư gan [1]. Ngoài tự nhiên, xáo tam phân phân bố chủ yếu ở bán đảo Hòn Hèo, thị xã Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa. Tuy nhiên, việc nhân giống và bảo tồn xáo tam phân còn nhiều hạn chế do đặc tính khó nhân giống của loài dược liệu này. Thêm vào đó, rễ xáo tam phân thường chỉ có giá trị dược liệu cao sau 5 năm trồng. Vì vậy, việc áp dụng công nghệ sinh học vào sản xuất nhằm tăng sinh khối rễ là cần thiết. Trên thế giới, biến nạp gen sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* chứa gen rol mã hóa auxin nội sinh [2] để thay đổi thông tin di truyền đã được ghi nhận là công cụ có tiềm năng cải thiện sản xuất những hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học [3]. Rễ tơ được tạo ra do sự chuyển gen từ hệ thống vector tự nhiên của tác nhân “gây bệnh” hay “cộng sinh” là *A. rhizogenes* vào tế bào thực vật [4]. Nuôi cấy rễ tơ có ưu điểm là sinh trưởng mạnh, không hướng đất, không phụ thuộc vào chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh, bền vững về mặt di truyền và có khả năng tổng hợp các hoạt chất thứ cấp với hàm lượng cao hơn hoặc bằng cây mẹ [4]. Do vậy, trong nghiên cứu này, các điều kiện cảm ứng tạo rễ được khảo sát nhằm góp phần hoàn thiện quy trình

thu nhận rễ tơ từ cây xáo tam phân để phục vụ cho nghiên cứu và sản xuất nguồn nguyên liệu thứ cấp, đáp ứng nhu cầu chữa bệnh hiện nay.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Hạt và cây con xáo tam phân được cung cấp bởi Công ty TNHH Bá Ninh, Ninh Hòa, Khánh Hòa, Việt Nam.

Dòng vi khuẩn *Agrobacterium* K599 dùng cho việc chuyển gen vào cây xáo tam phân được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Mồi được thiết kế theo trình tự gen rolC của vi khuẩn *A. rhizogenes* K599 vector Ri plasmid rolCF (5'- CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC-3') và rolCR (5'-TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA-3') (GenBank accession number is EF433766).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị vật liệu chuyển gen: vật liệu được sử dụng để chuyển gen là lá mầm, rễ cây con *in vitro* và *in vivo* xáo tam phân. Quả xáo tam phân được rửa sạch, lắc trong javel 7 phút, sau đó rửa sạch bằng nước lọc và ngâm cồn 70° trong 30 s rồi đưa vào buồng

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

Study on the transgenic technique to produce hairy roots of *Paramignya trimera* through *Agrobacterium rhizogenes* K599

Thi Cam Mien Phi^{*}, Minh Duc Nguyen¹,
Anh Tuan Kim¹, Duc Bach Nguyen¹, Bich Ngoc Pham²,
Hoang Ha Chu², Thi Van Anh Le³, Phuong Thao Duong⁴

¹Biotechnology Faculty, Vietnam National University of Agriculture
²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology
³University of Science and Technology of Hanoi,
Vietnam Academy of Science and Technology
⁴Le Hong Phong Specialized Upper Secondary School, Nam Dinh

Received 23 September 2019; accepted 31 October 2019

Abstract:

The study was conducted to induce the hairy roots of *Paramignya trimera* by using *Agrobacterium rhizogenes* K599 and investigate some factors affecting the growth of hairy roots. Three types of materials (calluses, cotyledons and *in vivo* roots) have been used as sources for hairy roots induction. The study results showed that, the *in vivo* roots was the most suitable material to induce the hairy roots. It was suggested that roots of the seedlings soaked in *A. rhizogenes* K599 suspension at the cell density of $OD_{600}=0.6$ for 30 minutes yielded the highest rate of root induction (42.7%). The hairy roots grew rapidly and stably when cultured in WPM/2 medium without phytohormones supplement in dark conditions for 6 days. Illumination with white fluorescent light was found to inhibit hairy root formation during co-cultivation period but promote it during the bacterial elimination step. The transgenic hairy root lines were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) using rolC specific primers.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, micropropagation, phytohormone.

Classification number: 4.6

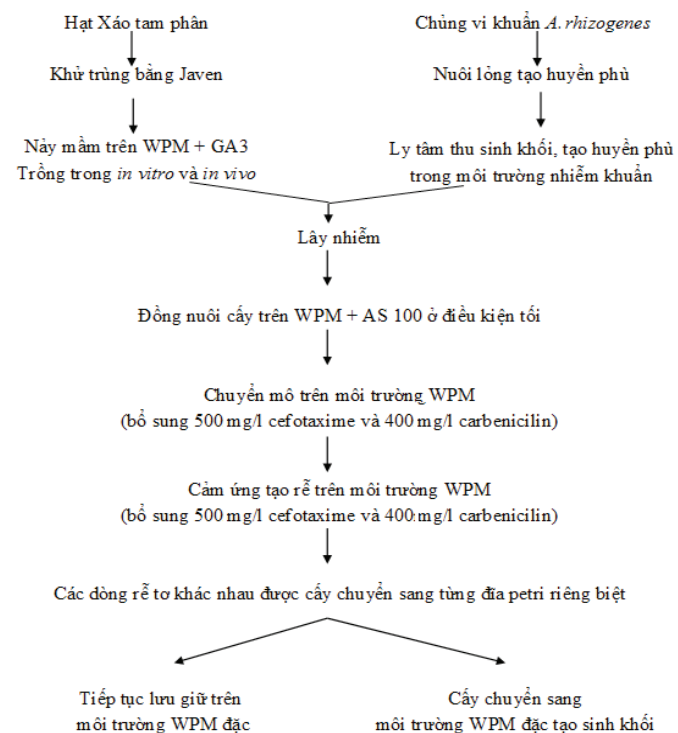
cây vô trùng. Hạt xáo tam phân được lấy ra khỏi quả và được lãc trong jonhson 0,5% 3 phút, cấy vào môi trường WPM, bổ sung Gibberellin (GA3) từ 0,1-0,6 mg/l, pH=5,7. Sau 2 tuần, các hạt bắt đầu nảy mầm, các lá mầm sẽ được cắt nhỏ và chuyển vào môi trường có bổ sung (IAA, 2,4D) với các nồng độ khác nhau để đánh giá khả năng tạo mô sẹo. Ba loại vật liệu lá mầm, mô sẹo và rễ cây con *in vivo* sẽ được nghiên cứu tiếp để tạo vật liệu chuyển gen tạo rễ tơ xáo tam phân.

Chuẩn bị vi khuẩn *A. rhizogenes*: chủng vi khuẩn K599 được chọn lọc và nuôi trong môi trường YMB, chỉnh pH đến 7,0 và khử

trùng môi trường ở 121°C trong 15 phút. Sau đó chia thành 2 ống, ống 20 ml chứa môi trường nuôi khuẩn đặc trên đĩa petri và ống 50 ml chứa môi trường nuôi khuẩn lỏng trong các ống falcon.

Chuẩn bị dung dịch để tạo huyền phù khuẩn: chủng vi khuẩn K599 được lấy từ ống giữ chủng, cấy vạch trên môi trường nuôi khuẩn đặc, đặt đĩa khuẩn trong tủ ổn nhiệt 28°C trong 48 h. Sau 48 h, lấy một đĩa khuẩn lãc cấy trên môi trường nuôi khuẩn lỏng. Bình nuôi lỏng được đặt trong máy lãc tốc độ 200 vòng/phút, nhiệt độ 28°C, nuôi lãc 18-24 h để nhân sinh khối vi khuẩn. Ly tâm 5000 vòng/phút trong thời gian 15 phút để thu tế bào khuẩn, hòa loãng sinh khối thu được trong 50 ml WPM lỏng để tạo huyền phù vi khuẩn và đo mật độ vi khuẩn ở bước sóng 600 nm để tiếp tục hòa loãng về mật độ $OD_{600}=0,2; 0,4; 0,6; 0,8$.

Phương pháp chuyển gen: khi dung dịch vi khuẩn *A. rhizogenes* phát triển đến giữa pha tăng trưởng thì được sử dụng để lây nhiễm [3]. Lấy 30 mẫu mô sẹo, lá mầm hoặc 30 mẫu cây con chứa rễ trong điều kiện *in vivo*, tiến hành gây tổn thương rễ cây con *in vivo*, mô sẹo và lá mầm, sau đó lãc chung với 30 ml dịch vi khuẩn trong khoảng thời gian 30 phút (mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần), trong thời gian này thỉnh thoảng lãc nhẹ. Sau đó mẫu được lấy ra, thấm khô bằng giấy lọc vô trùng rồi nuôi trên môi trường đồng nuôi cây WPM, có bổ sung thêm 100 μ M acetosyringone, đặt trong buồng tối từ 72 đến 144 h ở nhiệt độ 25°C. Các mẫu sau đó được chuyển sang môi trường cảm ứng tạo rễ tơ, khử khuẩn và tái sinh (WPM/2 + 30 g sucrose + 8 g agar + 500 mg/l cefotaxime và 400 mg/l carbenicilin, pH=5,8), các mẫu được đặt trong tối, ở nhiệt độ phòng 26 $\pm$ 2°C. Định kỳ 7-10 ngày cấy chuyển một lần, quan sát mẫu và sự xuất hiện rễ cũng như tốc độ sinh trưởng của



Hình 1. Quy trình tóm tắt tạo rễ tơ cây xáo tam phân.

nó để quyết định thời gian tách rễ và cấy chuyển. Mẫu đối chứng là những mảnh cắt được nuôi cấy không lây nhiễm với vi khuẩn cũng được nuôi cấy trên các môi trường tương tự. Sau một thời gian khử khuẩn và nuôi cấy, rễ tơ được sinh ra từ vết thương của mẫu lây nhiễm. Chi tiêu theo dõi là phần trăm số mẫu cảm ứng tạo rễ tơ và số rễ tơ tạo ra trên mỗi mẫu sau 5-7 tuần. Mẫu đối chứng là các mảnh mẫu được nuôi cấy không cho lây nhiễm với vi khuẩn, cũng được nuôi cấy trên các môi trường tương tự. Quy trình tạo rễ tơ của cây xáo tam phân được thể hiện trên hình 1.

Kiểm tra sự chuyển gen: PCR với các cặp mồi đặc hiệu của gen *rolC* được sử dụng để kiểm tra sự chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào thực vật [5]. ADN của rễ xáo tam phân và tế bào vi khuẩn được tách chiết theo quy trình của QIAGEN. Cặp mồi khuếch đại đoạn gen *rolC* là Ri plasmid *rolCF* (5'-CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC-3') và *rolCR* (5'-TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA-3') (GenBank accession number is EF433766). Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với thể tích hỗn hợp là 25 μ l gồm 1 μ l ADN bộ gen (hay Ri plasmid), 2 μ l dNTPs 2 mM, 1,25 μ l DreamTaq DNA polymerase (1 unit/ μ l), 10 pmol với mỗi mồi, 1,5 μ l DreamTaq buffer và bổ sung nước siêu sạch để đủ thể tích. Điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại gen *rolC* là biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (95°C trong 30 s, 54°C trong 30 s và 72°C trong 60 s) và 5 phút kéo dài ở 72°C. Sản phẩm khuếch đại PCR được phân tích và kiểm tra kích thước bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X. Gel sau đó sẽ được ngâm với dung dịch nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới đèn UV.

Phân tích số liệu

Các số liệu được phân tích bằng Microsoft Excel 2007 và thống kê bằng phần mềm SPSS 16.0, phân hạng theo phương pháp Duncan với độ tin cậy $p=0,05$.

Kết quả và thảo luận

Tạo vật liệu chuyển gen

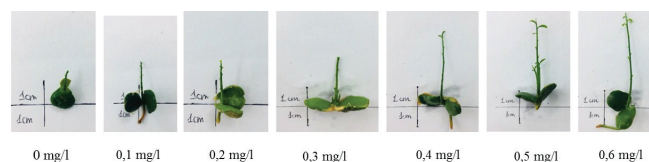
Ảnh hưởng của GA3 đến khả năng phát sinh chồi từ hạt xáo tam phân: các hạt sạch bệnh sau khử trùng được chuyển sang môi trường có bổ sung GA3 ở các nồng độ khác nhau để đánh giá khả năng nảy mầm.

Bảng 1. Ảnh hưởng của GA3 đến khả năng phát sinh chồi từ hạt xáo tam phân.

Nồng độ GA3 (mg/l)	Tỷ lệ mẫu phát sinh chồi (%)	Hình thái chồi
0	36,67 $\pm$ 3,34 ^d	Chồi nhỏ, ngắn
0,1	47,78 $\pm$ 1,92 ^c	Chồi nhỏ, ngắn
0,2	74,44 $\pm$ 1,93 ^b	Chồi mập, ngắn
0,3	76,22 $\pm$ 1,92 ^b	Chồi dài, nhỏ
0,4	92,22 $\pm$ 1,92 ^a	Chồi dài, mập
0,5	96,7 $\pm$ 1,73 ^a	Chồi dài, mập
0,6	94,1 $\pm$ 1,98 ^a	Chồi dài, gầy

GA3 có ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng phát sinh chồi và hình thái chồi từ hạt xáo tam phân sau 2 tuần nuôi cấy (bảng 1). Khi bổ sung GA3 với nồng độ 0,5 mg/l các mẫu hạt

phát sinh chồi đạt tỷ lệ cao nhất là 96,7%, chồi bật lên mập, khỏe, có sức sống cao. Tuy nhiên, khi giảm nồng độ GA3 xuống còn 0,3; 0,2 và 0,1 mg/l thì tỷ lệ bật phát sinh chồi giảm mạnh lần lượt là 76,22; 74,44 và 47,78%. Khi không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng GA3 thì tỷ lệ mẫu phát sinh chồi cũng giảm mạnh chỉ là 36,67% (bảng 1, hình 2).



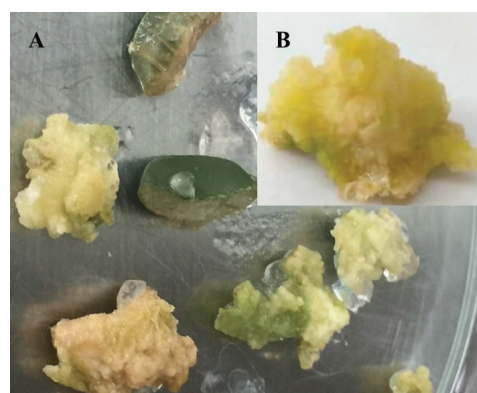
Hình 2. Chồi xáo tam phân phát sinh từ hạt trong môi trường có bổ sung GA3 sau 2 tuần nuôi cấy.

Ảnh hưởng của IAA, 2,4D tới khả năng tạo mô sẹo làm vật liệu chuyển gen tạo rễ tơ xáo tam phân: lá mầm (nội nhũ) được tách từ các chồi in vitro phát sinh từ hạt, có rễ hoàn chỉnh được cắt nhỏ và cấy vào các môi trường có bổ sung auxin (IAA, 2,4D) để tạo mô sẹo.

* Ảnh hưởng của IAA tới việc hình thành mô sẹo từ lá mầm in vitro: mô lá mầm được cắt nhỏ và cấy vào MTN (WPM + 30 g/l saccarozơ + 8,0 g/l agar + 0,3 mg/l GA3) có bổ sung IAA (0-2,0 mg/l). Sau 6 tuần nuôi cấy, các mô sẹo được hình thành, trong đó môi trường MTN bổ sung 2,0 mg/l IAA cho tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất với 68,89% (bảng 2). Mô sẹo xuất hiện có màu trắng xanh, xốp đặc được hình thành trên các vết cắt tạo ra trong quá trình nuôi cấy (hình 3).

Bảng 2. Ảnh hưởng của IAA tới việc hình thành mô sẹo từ lá mầm in vitro.

Nồng độ IAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)
0	63,70 $\pm$ 2,57 ^b	25,93 $\pm$ 2,22 ^c
0,5	68,89 $\pm$ 2,22 ^c	48,15 $\pm$ 2,34 ^a
1,0	75,56 $\pm$ 2,23 ^c	53,33 $\pm$ 3,4 ^b
1,5	83,70 $\pm$ 3,4 ^a	63,70 $\pm$ 3,51 ^b
2,0	88,89 $\pm$ 3,51 ^a	68,89 $\pm$ 3,7 ^a

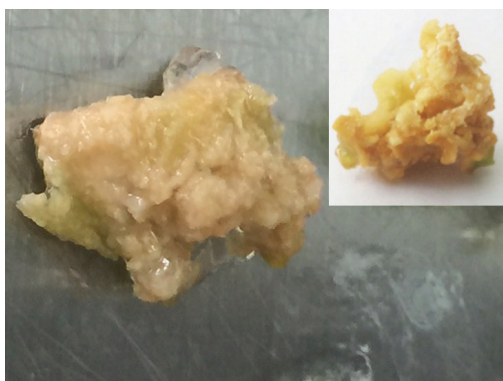


Hình 3. Mô sẹo lá mầm in vitro xáo tam phân trong môi trường MTN có bổ sung 2,0 mg/l IAA sau 6 tuần nuôi cấy. A: đĩa mô sẹo sau 6 tuần nuôi cấy; B: hình ảnh chi tiết một mô sẹo xáo tam phân.

* Ảnh hưởng của 2,4D tới việc hình thành mô sẹo từ lá mầm *in vitro*: mô lá mầm sạch được cắt nhỏ và cấy vào MTN có bổ sung 2,4D với nồng độ từ 0-2,0 mg/l. Sau 6 tuần nuôi cấy, các mẫu xuất hiện mô sẹo trên vết cắt. Ở nồng độ 2,0 mg/l 2,4D cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất (90,37%), tỷ lệ mẫu sống thấp nhất là 73,33% ở nồng độ 0,5 mg/l 2,4D. Trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l 2,4D cho tỷ lệ mô sẹo đạt cao nhất 70,74% (bảng 3). Mẫu mô sẹo tạo ra có màu vàng nhạt, dạng hạt nhỏ, xốp mềm, nằm ở rìa các vết cắt, sau đó phủ trên toàn bộ mẫu (hình 4).

Bảng 3. Ảnh hưởng của 2,4D tới việc hình thành mô sẹo từ lá mầm *in vitro*.

Nồng độ 2,4D (mg/l)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)
0	69,63±2,25 ^d	0
0,5	73,33±3,39 ^c	28,52±3,85 ^c
1,0	79,26±3,39 ^c	46,66±3,39 ^c
1,5	84,44±3,85 ^b	61,85±4,62 ^b
2,0	90,37±4,62 ^a	70,74±5,59 ^a



Hình 4. Mô sẹo lá mầm *in vitro* xáo tam phân trong môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l 2,4D sau 6 tuần nuôi cấy.

Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ xáo tam phân

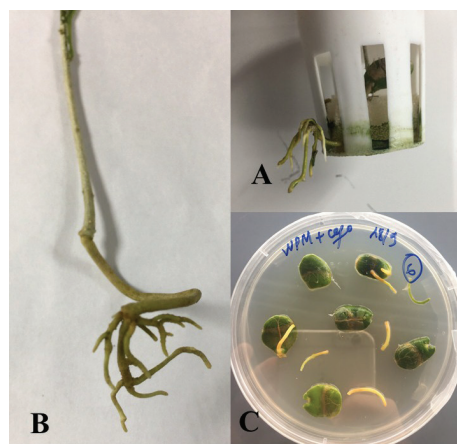
Ảnh hưởng của vật liệu nuôi cấy tới khả năng kích tạo rễ tơ xáo tam phân: nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng nguồn vật liệu dùng cho lây nhiễm với vi khuẩn có khả năng cảm ứng chuyển gen khác nhau [6]. Ba loại mẫu là lá mầm, mô sẹo và rễ cây con *in vivo* được lây nhiễm trong thời gian 30 phút, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ, số rễ tơ tạo ra trên mỗi mẫu cấy được ghi nhận sau 5 và 6 tuần nuôi cấy (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của loại mô lây nhiễm đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ xáo tam phân.

Bộ phận lây nhiễm	Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ (%)	Số rễ tơ tạo ra (rễ/mẫu)
Mô sẹo	0 ^b	0 ^b
Lá mầm	11,2±0,4 ^a	2,8±0,3 ^a
Rễ cây con <i>in vivo</i>	13,2±0,6 ^a	2,1±0,3 ^a

Kết quả nghiên cứu sau 6 tuần cho thấy, chỉ có lá mầm, rễ cây con *in vitro* có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ ở vi khuẩn K599. Đối với mô sẹo hoàn toàn không hình thành rễ tơ. Tỷ lệ cảm ứng

tạo rễ tơ và số rễ từ lá mầm và rễ cây con *in vivo* lần lượt là 11,2; 13,2% và 2,8; 2,1 rễ/mẫu (bảng 4, hình 5). Kim (2008) đã chứng minh rằng chủng *A. rhizogenes* K599 cho tỷ lệ phần trăm số mẫu cảm ứng tạo rễ tơ trên lá lạc là 36,8% và số rễ tơ tạo ra từ vị trí bị thương là 2,3 rễ [7]. Còn trên mẫu từ trụ hạ điệp thì tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ là 75,9% và 6,7 rễ. Trong thí nghiệm này, thời gian cảm ứng của mẫu rễ là 3-4 tuần. Qua kết quả thí nghiệm, có thể nhận xét rằng hiệu suất biến nạp gen phụ thuộc vào loại mô, cơ quan hay vị trí xâm nhiễm, nhận xét này phù hợp với nhận xét của Rahimi và cộng sự (2008) [8]. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ và số rễ tơ tạo ra trên mỗi mẫu đối với xáo tam phân còn thấp hơn nhiều so với một số loài thực vật khác.



Hình 5. Hình ảnh rễ tơ được cảm ứng từ mô rễ *in vivo*. A: mẫu rễ tơ sau chuyển gen 4 tuần trong điều kiện *in vivo* từ rễ *in vivo*; B: mẫu cây con *in vivo* sau chuyển gen được tách ra khỏi bình nuôi cấy; C: mẫu rễ tơ chuyển gen từ lá mầm.

Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn tới khả năng tạo rễ tơ từ mô rễ xáo tam phân: mặc dù lá mầm có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ, nhưng khả năng tăng sinh và sống sót của rễ tơ còn phản ứng chậm. Do đó, trong các thí nghiệm tiếp theo, vật liệu được sử dụng cho nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ là rễ cây con *in vivo*. Mật độ vi khuẩn *A. Rhizogenes* là yếu tố có ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ của thực vật. Kiana và Pirian (2012) khảo sát khả năng cảm ứng tạo rễ tơ từ mô lá cây *Portulaca oleracea* tại bốn mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes* K599 tương ứng với giá trị $OD_{600}=0,2; 0,4; 0,6; 0,8$ và nhận thấy mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600}=0,8$ cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ đạt cao nhất (70%), trong khi mật độ vi khuẩn ở giá trị OD_{600} cao hoặc thấp hơn 0,8 cho tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ chỉ đạt 30-50% [9].

Nghiên cứu cũng cho thấy sự khác nhau về tỷ lệ mẫu tạo rễ và số rễ/mẫu khi lây nhiễm rễ cây con *in vivo* cây xáo tam phân với vi khuẩn ở các mật độ khác nhau tương ứng với các giá trị $OD_{600}=0,2; 0,4; 0,6$ và 0,8 (bảng 5). Tỷ lệ mô rễ cảm ứng tạo rễ (56,25%) và số rễ/mẫu (6,56 rễ) đạt cao nhất khi mật độ vi khuẩn ở giá trị $OD_{600}=0,6$. Ở mật độ vi khuẩn thấp hơn ($OD_{600}=0,8$) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ và số rễ/mẫu thấp hơn. Do vậy, mật độ vi khuẩn tương ứng với giá trị $OD_{600}=0,6$ là thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ xáo tam phân.

Bảng 5. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *A. rhizogenes* đến khả năng tạo rễ tơ.

Giá trị OD	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ/mẫu (rễ)
0,2	16,17±1,8 ^c	0,21±0,02 ^d
0,4	26,51±2,1 ^b	0,88±0,05 ^c
0,6	56,25±3,2 ^a	6,56±0,16 ^a
0,8	23,12±1,8 ^b	2,37±0,06 ^b

Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm tới khả năng kích tạo rễ tơ xáo tam phân: xáo tam phân là loài thực vật thân gỗ nên việc chuyển gen còn gặp nhiều khó khăn do thân mầm hóa gỗ nhanh. Do vậy, ngoài mật độ tế bào trong huyền phù *A. rhizogenes* K599 thì nghiên cứu tối ưu hóa thời gian gây nhiễm mẫu thực vật với huyền phù vi khuẩn cũng như thời gian ủ cảm ứng sau đó cũng là những yếu tố có ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ [2]. Thời gian gây nhiễm là thời gian cần thiết để vi khuẩn có thể tiếp xúc với tế bào thực vật chủ ở vị trí bị tổn thương. Trong nghiên cứu này, mẫu rễ cây con *in vivo* cây xáo tam phân sau khi được tạo vết thương được gây nhiễm bằng cách ngâm trong huyền phù *A. rhizogenes* K599 có OD₆₀₀ mật độ 0,6 với thời gian khác nhau. Kết quả thu được cho thấy, ảnh hưởng của thời gian gây nhiễm có sự tương đồng với ảnh hưởng của mật số tế bào lên sự cảm ứng tạo rễ tơ. Theo đó, khi tăng thời gian gây nhiễm từ 5 đến 30 phút, tỷ lệ mẫu đáp ứng cũng tăng theo. Tuy nhiên, thời gian gây nhiễm hơn 30 phút sẽ gây ra hiện tượng mẫu chết do sự phát triển quá mức của vi khuẩn sau đó (bảng 6).

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian ngâm mẫu với huyền phù chủng *A. rhizogenes* K599 lên tỷ lệ mẫu hình thành rễ.

Thời gian lây nhiễm (phút)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
5	22,6±1,8 ^c
10	26,2±2,0 ^c
15	30,4±2,6 ^b
30	42,7±3,2 ^a
45	36,6±3,0 ^b
60	23,8±2,1 ^c

Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Thời gian gây nhiễm thích hợp phụ thuộc vào chủng vi khuẩn cũng như loài thực vật. Cùng cảm ứng rễ tơ với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834, thời gian gây nhiễm thích hợp trên cây đậu phộng là 5 phút nhưng thời gian gây nhiễm trên cây rau sam là 20 phút [9] hay trên cây *Holostemma adakodien* K. Schum là 30 phút [10]. Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy, thời gian gây nhiễm thích hợp cho cây xáo tam phân với chủng *A. rhizogenes* K599 là 30 phút cho tỷ lệ mẫu chuyển gen đạt 42,7%.

Ảnh hưởng của thời gian ủ cảm ứng tới khả năng hình thành rễ tơ: thời gian ủ cảm ứng là giai đoạn cần thiết trong phương pháp gây nhiễm trực tiếp *A. rhizogene* lên mô thực vật chủ [11]. Trong thời gian này sẽ xảy ra quá trình chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào chủ như chuyển T-ADN vào tế bào chủ và chèn T-ADN vào bộ gen tế bào chủ. Mỗi chủng vi khuẩn và mỗi loài thực vật chủ khác nhau sẽ có thời gian ủ cảm ứng cần thiết khác nhau. Với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834, thời gian ủ cảm ứng thích hợp để thu nhận rễ tơ trên cây lạc và cây *Duboisia myoporoides* là 2 ngày [12], trong khi trên cây giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) thì thời gian này là 2 tuần [13].

Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian ủ cảm ứng đến tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ ở cây xáo tam phân.

Thời gian ủ cảm ứng (ngày)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
1	15,1±1,2 ^d
2	18,7±2,0 ^c
3	20,8±2,1 ^c
4	25,2±2,2 ^b
5	29,6±3,0 ^b
6	37,8±3,2 ^a
7	32,1±3,0 ^a

Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Để xác định thời gian ủ cảm ứng thích hợp tạo rễ tơ chuyển gen từ rễ cây con *in vivo* cây xáo tam phân bằng chủng *A. rhizogenes* K599, thí nghiệm được tiến hành thay đổi thời gian ủ cảm ứng từ 1 đến 7 ngày (bảng 7). Nhìn chung, kết quả thu được cho thấy tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ tăng theo thời gian ủ cảm ứng từ 1 đến 6 ngày. Thời gian ủ cảm ứng dài hơn 6 ngày không những không làm tăng tỷ lệ mẫu hình thành rễ mà mẫu còn có biểu hiện chết do sự phát triển quá mức của vi khuẩn, tương tự như báo cáo của Ho [14]. Ngoài ra, kết quả quan sát cũng cho thấy, một số mẫu rễ tơ cũng trở nên yếu hoặc chết khi kéo dài giai đoạn này. Như vậy, thời gian ủ cảm ứng thích hợp cho việc cảm ứng rễ tơ từ rễ cây con *in vivo* cây xáo tam phân là 6 ngày.

Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng trong giai đoạn ủ cảm ứng: nhiều nghiên cứu cho thấy ánh sáng có ảnh hưởng đến sự hình thành rễ tơ thực vật với chủng *A. rhizogenes*. Với chủng *A. rhizogenes* ATCC15834, sự cảm ứng rễ tơ thích hợp trên cây dưa cạn là khi được ủ trong tối 24 giờ trước khi chiếu sáng 16 giờ/ngày trong 2 ngày [15]. Trong khi đó, chiếu sáng nhẹ lại là điều kiện thích hợp để thu nhận rễ chuyển gen từ mô thân cây dưa bở (*Cucumis melo* L.) bằng chủng *A. rhizogenes* ATCC8196. Qua đó cho thấy, cường độ chiếu sáng thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ có thể thay đổi đối với mỗi loài thực vật chủ và chủng vi khuẩn. Trong thí nghiệm này, cường độ chiếu sáng ở các bước sóng từ 500-2000 lux được bố trí để kích thích sự chuyển gen kích tạo rễ tơ với vi khuẩn *A. rhizogenes* K599.

Bảng 8. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng trong thời gian ủ cảm ứng đến tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ.

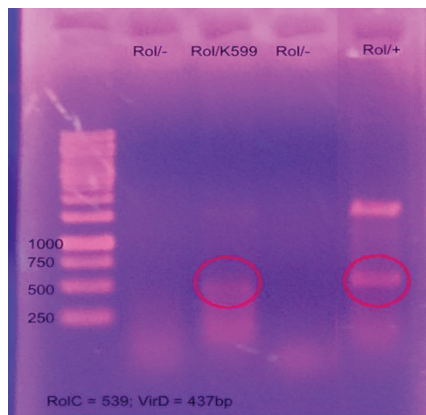
Cường độ chiếu sáng (lux)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
0	36,6±3,8 ^a
500	24,2±2,6 ^b
1000	16,6±1,8 ^c
1500	14,6±1,2 ^c
2000	7,6±0,8 ^d

Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một cột có các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p=0,05$.

Mẫu sau khi gây nhiễm được chiếu sáng ở các cường độ khác nhau với thời gian 16 giờ/ngày trong suốt giai đoạn ủ cảm ứng. Kết quả cho thấy, tỷ lệ mẫu hình thành rễ đã bị giảm xuống ở tất cả các chế độ chiếu sáng từ 500 đến 2000 lux (bảng 8) so với khi được ủ cảm ứng trong tối. Cường độ ánh sáng càng cao thì tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ càng giảm, tỷ lệ tạo rễ tơ giảm từ 36,6 xuống 7,6% khi tăng cường độ ánh sáng từ 0-2000 lux.

Xác nhận rễ tơ bằng phương pháp PCR

Qua phân tích sản phẩm bằng kỹ thuật PCR (hình 6) cho thấy, các dòng rễ tơ được kiểm tra đều có chứa gen *rolC* tương ứng với đoạn ADN được khuếch đại với kích thước 539 bp.



Hình 6. Kết quả PCR xác nhận rễ chuyển gen của rễ xáo tam phân với chủng *A. rhizogenes* K599 xác nhận sự hiện diện của gen *rolC*. Giếng 1: thang chuẩn; giếng 2, 4: đối chứng âm; giếng 3: đối chứng dương; giếng 5: rễ cây chuyển gen.

Kết luận

Quá trình chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, Gibberellin ở nồng độ 0,5 mg/l cho tỷ lệ mẫu nảy chồi cao nhất đạt 96,7%. Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo từ lá mầm *in vitro* xáo tam phân đạt 68,89% trong môi trường có bổ sung 2,0 mg/l IAA, mô sẹo có chất lượng tốt, xanh đậm và khỏe. Sự cảm ứng tạo rễ tơ cây xáo tam phân bằng chủng *A. rhizogenes* K599 chịu ảnh hưởng của các yếu tố: mật độ tế bào trong huyền phù vi khuẩn ($OD_{600\text{ nm}}$), thời gian gây nhiễm, thời gian ủ cảm ứng, chế độ chiếu sáng và môi trường nuôi cấy. Điều kiện gây nhiễm

thích hợp để thu nhận rễ tơ từ cây xáo tam phân bằng chủng *A. rhizogenes* K599 là $OD_{600}=0,6$ với thời gian ngâm mẫu là 30 phút. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ đạt cao nhất khi mẫu được ủ cảm ứng 6 ngày trong tối và loại nhiễm vi khuẩn ở điều kiện tối.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn Công ty Monsanto đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài “Nghiên cứu chuyển gen tạo sinh khối rễ tơ xáo tam phân (*paramignya trimera*) thông qua *Agrobacterium rhizogenes* làm vật liệu cho nuôi cấy Bioreactor”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B.H. McCown, G. Lloyd (1981), “A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species”, *HortScience*, **16**, pp.453.
- [2] L. Brijwal, S. Tamta (2015), “*Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC”, *SpringerPlus*, **4**(443), pp.1-10.
- [3] G.S.H. AL-Yozbaki, J.H. Rasheed, S.M. Salih (2015), “Transformation of soybean (*Glycine Max* L.) via GUS-labeled *Agrobacterium rhizogenes* R1000”, *International Journal of Science and Technology*, **4**(6), pp.267-272.
- [4] M. Chang (2005), “RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex”, *EMBO J.*, **24**(11), pp.2024-2033.
- [5] K. Yoshimatsu, H. Sudo, H. Kamada, F. Kiuchi, Y. Kikuchi, J. Sawada, and K. Shimomura (2004), “Tropane alkaloid production and shoot regeneration in hairy and adventitious root cultures of *Duboisia myoporoides*-D. leichhardtii hybrid”, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(8), pp.1261-1265.
- [6] Y.R. Danesh, G.E. Mohammadi, A. Alizadeh, S.M. Modarres (2006), “Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran”, *Journal of Biological Sciences*, **6**(10), pp.87-91.
- [7] J. Kim, B. Campbell, N. Mahoney, K. Chan, R. Molyneux, G. May (2008), “Chemosensitization prevents tolerance of *Aspergillus fumigatus* to antimycotic drugs”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **372**(1), pp.266-271.
- [8] M. Rahimi, A. Riazzi, S. Saif (2008), “Root canal configuration and the prevalence of C-shaped canals in mandibular second molars”, *Canadian Journal of Applied Linguistics*, **11**, pp.31-60.
- [9] Kiana, Pirian (2012), “Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline’s production”, *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, **3**(3), pp.642-649.
- [10] S.H. Karmarkar, R. Keshavachandran (2001), “Genetic transformation and hairy root induction in *Holostemma adakodien* K. Schum - a vulnerable medicinal plant”, *Indian Journal of Experimental Biology*, **39**, pp.1263-1267.
- [11] K. Wang (2006), *Agrobacterium protocols*, **1**, p.474, Humana Press.
- [12] A. Karthikeyan, S. Palanivel, S. Parvathy, R.R. Bhakya (2007), “Hairy root induction from hypocotyl segments of groundnut (*Arachis hypogaea* L.)”, *African Journal of Biotechnology*, **6**(15), pp.1817-1820.
- [13] C.K. Chang, Y.C. Lin, S.Y. Liu, C.Y. Chen (2005), “Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* Thunb. Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins”, *Biotechnology Letters*, **27**, pp.1165-1169.
- [14] C.H. Ho (1994), *Metabolic studies of Catharanthus roseus hairy root cultures by phosphorus-31 and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Doctoral thesis Rice University, Houston, Texas.
- [15] E.H. Hughes (2003), *Metabolic engineering of Catharanthus roseus hairy roots using an inducible promoter system*, Doctoral thesis Rice University, Houston, Texas.

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 62 - Number 2 - February 2020

Nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào gamma delta T trên bệnh nhân ung thư phổi.

Nguyễn Quý Linh, Tạ Thành Đạt, Lê Văn Toàn, Trần Văn Khánh, Hoàng Thị Mỹ Nhung, Trần Huy Thịnh

Kết quả bước đầu ứng dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy tại Học viện Quân y.

Nguyễn Đình Tảo, Nguyễn Thị Thanh Nga, Trần Văn Khoa, Nguyễn Thị Hồng Vân, Triệu Tiến Sang, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Ngọc Khánh

Phân loại thể bệnh lâm sàng bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase ở bệnh nhi điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương.

Trần Huy Thịnh, Trần Văn Khánh, Ngô Thị Thu Hương, Tạ Thành Văn, Vũ Chí Dũng

Đánh giá kết quả cải thiện các triệu chứng thận âm hư và phục hồi vận động trên bệnh nhân đột quỵ sau 3 tháng của phác đồ phối hợp châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu, Bổ dưỡng hoàn ngũ thang và Lục vị.

Nguyễn Văn Tùng

Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến việc điều chế tiểu phân nano poly-(D,L-lactid-co-glycolid) tải ethambutol.

Nguyễn Thái Dương, Phạm Đình Duy

Đánh giá khả năng đối kháng của một số giống lúa (*Oryza sativa* L.) với 3 loại cây cỏ gây hại chính trong ruộng lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long.

Nguyễn Thị Cẩm Tú, Nguyễn Thị Thùy Trang, Lê Văn Vàng, Hồ Lệ Thi

Đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn nảy mầm của một số mẫu giống lúa cận địa phương thu thập tại tỉnh Sơn La.

Vì Thị Xuân Thùy, Lò Thị Mai Thu, Vũ Việt Dũng

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể của nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*.

Vũ Hoài Nam, Ma Thị Trang, Trần Văn Phùng, Nguyễn Huy Thuần, Dương Văn Cường

Hàm lượng dinh dưỡng trong đất trồng cây ăn quả và cây dược liệu vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An.

Hoàng Thị Huyền Ngọc, Nguyễn Mạnh Hà, Vũ Thị Thu Hương

Phân lập, định danh chủng vi khuẩn chịu mặn, có hoạt tính phân giải lân vô cơ cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thế Quyết, Hà Viết Cường, Phạm Xuân Hội

Nghiên cứu chọn dòng lúa Nàng Tét mùa đột biến theo hướng ngắn ngày, chất lượng và chống chịu mặn bằng phương pháp sốc nhiệt.

Trần Thị Thanh Thúy, Võ Công Thành, Phạm Thị Thanh

Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) thông qua *Agrobacterium rhizogenes* K599.

Phí Thị Cẩm Miên, Nguyễn Minh Đức, Kim Anh Tuấn, Nguyễn Đức Bách, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Lê Thị Văn Anh, Dương Phương Thảo

1 Activation culture and proliferation of $\gamma\delta$ T cells from lung cancer patients.

Quy Linh Nguyen, Thanh Dat Ta, Van Toan Le, Van Khanh Tran, Thi My Nhung Hoang, Huy Thinh Tran

6 Initial result of using preimplantation genetic diagnosis protocol for spinal muscular atrophy disease in the Military Medical University.

Dinh Tao Nguyen, Thi Thanh Nga Nguyen, Van Khoa Tran, Thi Hong Van Nguyen, Tien Sang Trieu, Thanh Tung Nguyen, Ngoc Khanh Nguyen

10 Classification of clinical phenotype of 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia in patients at National Hospital of Pediatrics.

Huy Thinh Tran, Van Khanh Tran, Thi Thu Huong Ngo, Thanh Van Ta, Chi Dung Vu

14 Evaluation on the motor rehabilitation and symptom improvement of kidney yin deficiency syndrome on patients after stroke more than 3 months by combining Liu wei di huang with Bu yang huang wu tang, modified acupuncture and physiotherapy.

Van Tung Nguyen

22 Optimisation of the factors affecting the preparation of ethambutol-loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles.

Thai Duong Nguyen, Dinh Duy Pham

29 Evaluation of direct resistance of some rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to three main invasive weeds in rice production at the Mekong River Delta.

Thi Cam Tu Nguyen, Thi Thuy Trang Nguyen, Van Vang Le, Le Thi Ho

35 Assessment on drought tolerance of some local rice varieties collected in Son La province at the germination stage.

Thi Xuan Thuy Vi, Thi Mai Thu Lo, Viet Dung Vu

40 Effect of agar plate method on the formation of *Cordyceps militaris* fruiting body.

Hoai Nam Vu, Thi Trang Ma, Van Phung Tran, Huy Thuan Nguyen, Van Cuong Duong

44 Soil nutrient status for the cultivation of fruit trees and medicinal plants in the western of Thanh Hoa and Nghe An provinces.

Thi Huyen Ngoc Hoang, Manh Ha Nguyen, Thi Thu Huong Vu

49 Isolation and characterisation of salt tolerant and inorganic phosphate solubilising bacteria from the Mekong River Delta.

Duc Thanh Nguyen, The Quyet Nguyen, Viet Cuong Ha, Xuan Hoi Pham

54 Rice breeding for salt tolerance, short maturity duration, and with high grain quality after treating with high temperature for seeds of Nang Tet variety.

Thi Thanh Thuy Tran, Cong Thanh Vo, Thi Thanh Pham

59 Study on the transgenic technique to produce hairy roots of *Paramignya trimera* through *Agrobacterium rhizogenes* K599.

Thi Cam Mien Phi, Minh Duc Nguyen, Anh Tuan Kim, Duc Bach Nguyen, Bich Ngoc Pham, Hoang Ha Chu, Thi Van Anh Le, Phuong Thao Duong