

TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
NATIONAL CENTRE FOR NATURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY OF VIETNAM

ISSN 0866-7160

tạp chí
SINH HỌC

Journal of Biology

TẬP 24 - SỐ 1

THÁNG 3-2002

HÀ NỘI

CV 27

TẠP CHÍ
SINH HỌC

Tổng biên tập : ĐẶNG NGỌC THANH
Phó tổng biên tập : NGUYỄN TIẾN BÂN
LÊ XUÂN TÚ

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

NGUYỄN TÁC AN, ĐÁI DUY BAN, LÝ KIM BẢNG,
NGUYỄN TIẾN BÂN, ĐOÀN CẢNH, VŨ QUANG CÔN,
PHẠM THỊ TRÂN CHÂU, NGUYỄN LÂN DŨNG, NÔNG VĂN
HẢI, TRƯƠNG NAM HẢI, ĐẶNG HUY HUỠNH, NGUYỄN
ĐẶNG KHÔI, NGUYỄN THỊ LÊ, PHAN KẾ LỘC, NGUYỄN
TÀI LƯƠNG, LÊ THỊ MUỘI, HOÀNG ĐỨC NHUẬN, NGUYỄN
HỮU PHỤNG, TRẦN DUY QUÝ, NGÔ KẾ SƯƠNG, ĐẶNG
NGỌC THANH, DƯƠNG ĐỨC TIẾN, LÊ XUÂN TÚ, NGUYỄN
VĂN UYẾN

Thư ký tòa soạn : **Trần Thanh Nga**

LOÀI CHUỘT MÙ *TYPHLOMYS CINEREUS CHAPENSIS* OSGOOD, 1932 (RODENTIA) Ở VIỆT NAM

NGUYỄN MINH TÂM, CAO VĂN SÙNG

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Loài *Typhlomys cinereus* gồm 4 phân loài [2] phân bố hẹp, chỉ gặp ở phía nam Trung Quốc và phía bắc Việt Nam. Mẫu vật của chuột mù *T. c. chapensis* được thu thập lần đầu tiên bởi Delacour và Lowe vào tháng 11 và 12 năm 1929, ở độ cao 1523 m (5000 feet) tại Sa Pa, Lào Cai. Tất cả mẫu vật (7 mẫu: 5 cá thể cái và 2 cá thể đực) hiện đang lưu giữ tại Bảo tàng Lịch sử tự nhiên Field (Mỹ). Chuột mù phân bố rất hẹp trong rừng nhiệt đới, ở độ cao trên 1500 m thuộc Khu bảo tồn thiên nhiên Hoàng Liên Sơn. Đây là loài quý hiếm và đặc hữu cho Việt Nam và được IUCN đưa vào danh sách những loài đang bị đe dọa tuyệt chủng, cần phải được bảo vệ ở mức độ CR: B1+2cd [1]. Từ đó đến nay, chúng tôi không có thông tin về hiện trạng của loài này. Năm 2000, được sự hỗ trợ tài chính của Tổ chức Quốc tế FFI (Flora and Fauna International) 99/34/6 và Chương trình nghiên cứu cơ bản 6.1.10.98, chúng tôi đã tổ chức 2 đợt khảo sát từ độ cao 1890-m đến 2610 m thuộc Khu Bảo tồn Hoàng Liên Sơn, với mục đích xác định sự tồn tại và đánh giá ý nghĩa bảo tồn loài chuột mù cũng như cung cấp cơ sở khoa học cho các nhà quản lý và ngành lâm nghiệp nâng cao hiệu quả công tác bảo tồn và quản lý bền vững tính đa dạng sinh học ở khu Bảo tồn.

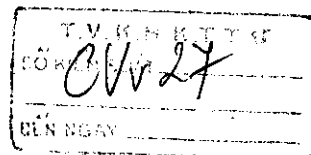
I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Ba địa điểm trong khu Bảo tồn thiên nhiên Hoàng Liên Sơn được lựa chọn để tiến hành khảo sát, bao gồm: Ô Quý Hồ độ cao 1909 m so với mặt biển, với tọa độ 22°21' Bắc và 103°41' Đông; Cát Cát độ cao 1890 m-2026 m, với tọa độ 22°18' Bắc và 103°49' Đông và Sín Chải độ cao 2323 m-2610 m, với tọa độ 22°17' Bắc và 103°48' Đông.

Thảm thực vật ở khu Bảo tồn gồm các kiểu

rừng nhiệt đới núi cao. Tầng tán gồm các cây gỗ cao trên 20 m với một số loài phổ biến thuộc họ Dẻ (Fagaceae) và Mộc Lan (Magnoliaceae). Tầng dưới tán gồm chủ yếu các loài thuộc họ Long não (Lauraceae), Chè (Theaceae), Hoa hồng (Rosaceae) và Sau sau (Hamamelidaceae). Tầng cây bụi với các loài thuộc các họ Rubiaceae, Pittosporaceae và Theaceae. Tre trúc (*Arundinaria* spp. và *Phyllostachys* spp.) phổ biến ở tầng cây bụi. Rất ít dây leo, chỉ gặp một số cây nhỏ thuộc họ Myrsinaceae và Celastraceae. Dương xỉ phổ biến ở mặt đất, đặc biệt với mật độ cao ở kiểu rừng tầng dưới tán bị tác động mạnh. Ở độ cao trên 2500 m, tầng tán xuất hiện các cây thuộc họ Thông (Pinaceae). Cây Pơ mu (*Fokienia hodginsi*) có mặt ở độ cao dưới 2300 m, thường bị khai thác bởi người dân địa phương. Rừng nguyên sinh ở độ cao dưới 2400 m bị tác động bởi các hoạt động của con người, liên quan đến khai thác gỗ, phá rừng mở rộng đất nông nghiệp. Tầng dưới tán, đặc biệt khu vực chân núi gần nguồn nước và một số cây ở tầng tán thường bị chặt trụi để trồng cây kinh tế (*Amomum aromaticum*). Ngoài ra, khu Bảo tồn còn có các kiểu thảm cỏ cây bụi và rừng thứ sinh được hình thành sau khi phá rừng và bỏ hoang. Ba địa điểm nghiên cứu bao gồm các kiểu rừng nguyên sinh ít bị tác động và rừng thứ sinh đặc trưng cho khu Bảo tồn.

Khí hậu ở khu Bảo tồn liên quan đến đặc điểm địa lý của nó. Nhiệt độ trung bình hàng năm khoảng 15-18°C, dao động từ -3,2°C đến 29,7°C với các tháng mùa đông từ tháng 11 đến tháng 2 và các tháng mùa hè từ tháng 6 đến tháng 9. Tuyết thường xuất hiện vài ngày vào mùa đông. Lượng mưa trung bình năm khoảng 2701 mm, với độ ẩm 76% đến 96%, trung bình 87%. Sương mù xuất hiện vào mùa đông, được hình thành theo hướng gió tây sang đông.



Chúng tôi sử dụng 100 bẫy đập, 100 bẫy lồng và 20 bẫy hộp nhôm Sherman để tiến hành khảo sát sự đa dạng gặm nhấm ở khu Bảo tồn Hoàng Liên Sơn. Bẫy đập và bẫy hộp nhôm được đặt tự do trên các tuyến và các thảm thực vật khác nhau để xác định thành phần loài gặm nhấm. Bẫy lồng được sử dụng chủ yếu đánh giá hiện trạng quần thể gặm nhấm. Tuyến bẫy được thiết kế như sau: Mỗi tuyến đặt 19-36 điểm bẫy, khoảng cách giữa 2 điểm liên tiếp 10 m. Thời gian đặt bẫy cho mỗi tuyến 7 ngày và 6 đêm liên tục. Tất cả các bẫy được kiểm tra vào các buổi sáng. Hạt ngô và táo được sử dụng làm mồi bắt. Tất cả gặm nhấm bắt được ở các tuyến bẫy lồng được xác định tuổi (non và trưởng thành), giới tính và trạng thái hoạt động sinh dục, sau

đó được đánh dấu và thả ngay tại vị trí bắt.

Một số cá thể cho mỗi loài cũng được mẩu (da và sọ) và được lưu giữ tại Phòng thái môi trường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ba mẫu chuột mù (số mẫu: 201411, 201 và 201409) được bắt bằng bẫy lồng vào ngày 5 và 6 tháng 3 và 25 tháng 4 năm 2000 khu vực Cát Cát và Sín Chải. Dưới đây, là tài mô tả phân bố và đánh giá hiện trạng chuột mù làm cơ sở cho Ban quản lý khu tồn hiểu biết tốt hơn về chúng và có các pháp bảo vệ hữu hiệu hơn.

Mô tả: (ảnh và bảng).

Thông số hình thái ngoài và hộp sọ của chuột mù ở khu Bảo tồn Hoàng Liên Sơn [4]

Thông số	Mẫu 201411 đực, trưởng thành	Mẫu 201421 đực, trưởng thành	Mẫu 201409 cái, trưởng thành
l	2	3	4
HB	95	85	72
T	125+10	125+15	110+15
HF	23	24	21,0
E	18	17	17,0
W	15	15	12,0
BB	11,5	11,7	11,5
CBL	22,7	21,7	23,5
GLIF	1,8	1,7	1,8
GTL	27,0	26,4	27,0
IC	6,0	5,7	5,0
ML	18,0	17,0	17,5
OH	8,0	7,3	7,5
PWIF	2,0	2,0	2,0
RL	8,0	7,5	7,5
RW	5,0	4,5	4,0
TB	3,7	3,7	4,0
TBW	11,0	11,0	11,0
TMW	6,0	5,7	6,0

1	2	3	4
ZB	14,8	14,8	15,0
IH	5,0	4,0	4,0
IW	2,5	2,3	2,5
MXC	4,5	4,0	4,5
MXCW	1,3	1,2	1,0
MDC	5,0	4,5	5,0

Kích thước cơ thể nhỏ như chuột nhắt. Mất rất nhỏ. Tai trần. Đuôi dài hơn thân. Nửa sau đuôi phủ lông dài khoảng 10 mm, thưa, chóp đuôi có túm lông dài 10-15 mm màu trắng. Bộ lông dày, gồm các lông ngắn và mềm. Mặt lưng màu xám tối, gốc lông xám; mặt bụng nhạt hơn, chóp lông trắng. Bàn chân nâu nhạt. Bàn chân sau rất dài.

Sọ hình tròn. Cung gò má rộng vát về phía trước. Xương trán rộng. Bầu nhĩ nhỏ. Lỗ khẩu cái rất bé, hoảng 1,7 mm, khoảng cách 2 lỗ rộng. Chồi xương hàm dưới nhỏ, cong vào trong. Răng hàm ngắn, răng hẹp và nhỏ. Mặt nhai nghiêng dọc theo trục răng.

Phân bố: Chuột mù *T. c. chapensis* chỉ bắt được ở độ cao trên 1500 m thuộc khu Bảo tồn thiên nhiên Hoàng Liên Sơn. Mẫu 201411 được bắt bằng bẫy lồng trên mặt đất ở độ cao 2000 m, trong hốc cây gỗ lớn, rừng nguyên sinh ít bị tác động. Tre trúc cao 1,5-3 m phổ biến ở tầng cây bụi. Rất ít gặp dây leo ở khu vực này. Mẫu 201421 cũng bắt được bằng bẫy lồng trên mặt đất ở độ cao 1870 m, ven suối trong rừng nguyên sinh ít bị tác động với độ dốc trên 60°. Mẫu 201409 được bắt bằng bẫy lồng trên cây, cách mặt đất 2 m, ở độ cao 2323 m trong rừng nguyên sinh. Tre trúc cao 1,5-2 m phổ biến ở tầng cây bụi. Như vậy, chuột mù chỉ phân bố trong rừng nguyên sinh với nhiều tre trúc ở tầng cây bụi thuộc dãy núi Hoàng Liên Sơn.

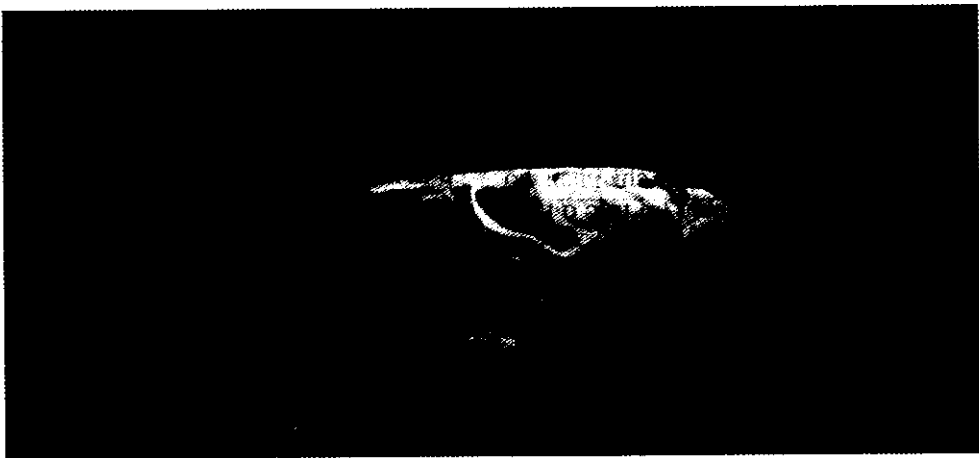
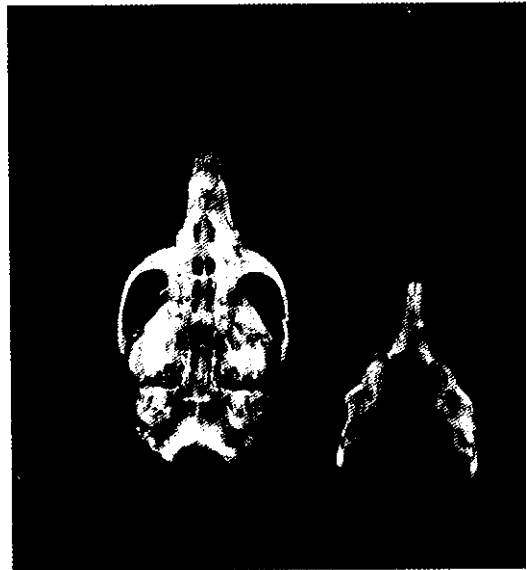
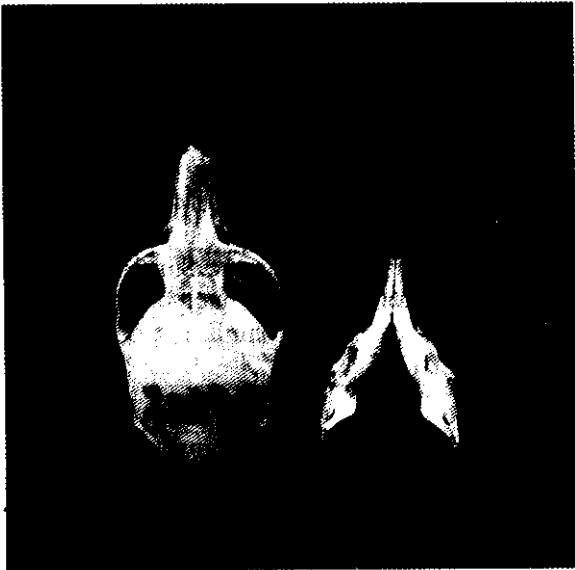
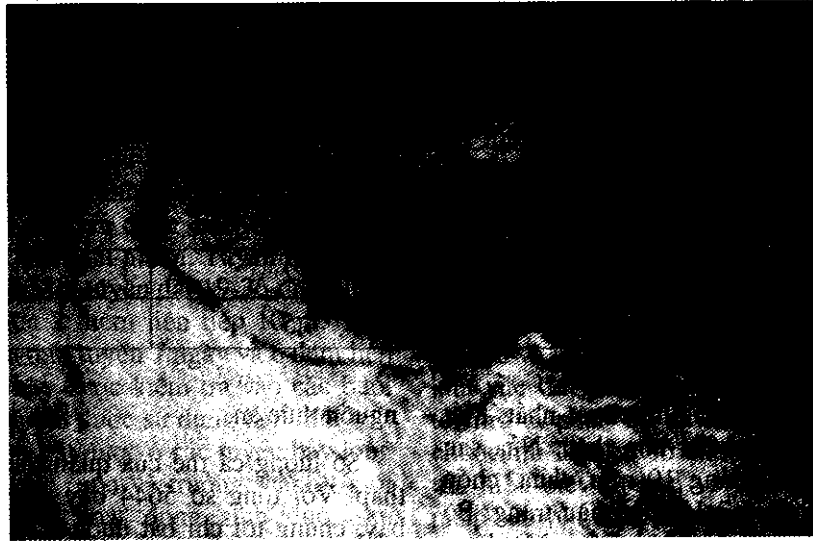
Sinh học và sinh thái: Hai cá thể đực và một cá thể cái được bắt vào tháng 3 và tháng 4 đều ở trạng thái trưởng thành. Hai cá thể đực đang ở trạng thái hoạt động sinh dục, dịch hoàn xa xuống bìu. Tử cung của cá thể cái bắt được phình to và có màu hồng. Kết quả này chỉ ra rằng, chuột mù hoạt động sinh dục vào cuối mùa xuân, có thể liên quan đến sự phong phú về

nguồn thức ăn.

Số lượng cá thể của quần thể chuột mù rất thấp. Với tổng số 5644 bẫy đêm tại 22 tuyến bẫy, chúng tôi chỉ bắt được 2 cá thể chuột mù với chỉ số phong phú 0,05/1 điểm bẫy trên mỗi tuyến ở khu vực rừng nguyên sinh Cát Cát và Sín Chải. Chúng tôi không bắt được chuột mù ở khu vực Ô Quý Hồ. Chỉ số này rất thấp so với các quần thể chuột khổng tử, chuột hươu bé, chuột bukit, chuột Langbian và chuột nhắt cây với chỉ số 0,43; 0,27; 0,38; 0,14 và 0,15 tương ứng ở khu vực Cát Cát (tư liệu bản thân). Kết quả cũng tương tự ở khu vực Sín Chải với các quần thể chuột hươu bé, chuột bukit và chuột Langbian (chỉ số phong phú là 1,0; 0,19 và 0,25 tương ứng).

Yếu tố đe dọa quần thể chuột mù. Sự suy giảm và phân rã nơi sống là nguyên nhân cơ bản dẫn đến loài bị đe dọa tuyệt chủng. Kích thước quần thể bị suy giảm và bị phân rã thành các đơn vị nhỏ. Cấu trúc hữu hiệu đã được thiết lập trong quá trình hình thành quần thể bị phá vỡ.

Mất nơi sống. Trong nhiều năm, hoạt động của con người trong và ngoài khu Bảo tồn có ảnh hưởng rất lớn đến thảm thực vật tự nhiên. Phá rừng làm nương rẫy và hình thành khu dân cư là hình thức phổ biến. Diện tích rừng gần với các khu dân cư và dọc các con đường dẫn đến khu dân cư đều bị chặt trụi và biến thành đất nông nghiệp hoặc thảm cỏ cây bụi. Hiện tượng này vẫn tiếp diễn, tuy nhiên với cường độ giảm so với những năm trước. Phá rừng diễn ra với tốc độ cao ở khu vực Ý Linh Hồ, Sín Chải và Tả Trung Hồ. Hiện nay, phá rừng diễn ra ở nơi có độ dốc lớn hơn. Trồng cây kinh tế (*Amomum aromaticum*) dưới tán rừng sau khi chặt hết cây ở tầng dưới tán và một số cây ở tầng tán có độ



Ảnh. Chuột mù *T. c. chapensis* (bắt ngày 25/4/2000)

che phủ cao đã ảnh hưởng rất lớn đến nơi sống và nguồn thức ăn của chuột.

Hiện tượng khai thác gỗ liên quan đến việc tạo ra các khoảng trống làm biến đổi cấu trúc thảm thực vật ban đầu. Hoạt động này làm thay đổi sự phân bố không gian và cấu trúc tuổi của cây rừng. Mức độ rối loạn thảm thực vật được xác định bởi số cây non thứ sinh và loài cây tiên phong. Sự tồn tại vị trí của cây và sự thích nghi tương ứng sẽ đóng vai trò quan trọng cho sự ổn định cấu trúc quần thể chuột. Khai thác gỗ được xem là hoạt động chính của một số người dân địa phương. Gỗ Pơ mu rất có giá trị để xuất khẩu sang Trung Quốc. Tại chợ Sa Pa, 1 m³ giá khoảng 3 triệu đồng. Gỗ được cưa thành tấm với kích thước 0,2×0,2×2,5 m và được di chuyển ra bìa rừng bằng sức người. Trong những năm trước hoạt động này xảy ra thường xuyên và công khai trong khu Bảo tồn và trong các bản làng như Sẹo Mí Tỉ, Cát Cát và Tả Trung Hồ. Trong thời gian khảo sát thực địa, 5-7 gốc cây Pơ mu còn dấu vết mới trên tuyến bẫy dài khoảng 1 km ở độ cao dưới 2000 m. Một nhóm người ở bản Ý Linh Hồ cùng với cưa và rui đốn cây cũng được quan sát bởi đoàn khảo sát vào tháng 4. Rất nhiều khối gỗ củi cũng được nhìn thấy dọc theo suối gần bản Cát Cát. Rất khó đánh giá mức độ rối loạn thảm thực vật liên quan đến các sản phẩm phi gỗ bị khai thác. Dân địa phương tại các bản Sín Chải, Ô Quý Hồ, Cát Cát thường vào rừng thu thập măng tre và bán tại chợ. Mộc nhĩ, nấm cũng được thu thập. Các cây làm thuốc và nhuộm quần áo được khai thác bởi người dân địa phương. Cường độ khai thác tre trúc làm hàng rào và trụ cột cho cây trồng là cao ở khu vực Ô Quý Hồ, làm tăng mức độ rối loạn thảm thực vật ở đây. Cây phong lan cũng là đối tượng thu thập để làm cảnh và được bán tại chợ.

Ý nghĩa và biện pháp bảo tồn. Khu Bảo tồn thiên nhiên Hoàng Liên Sơn là đơn vị duy nhất được thiết lập để bảo vệ loài chuột mù ở Việt Nam, cũng như tính đa dạng sinh học cao của vùng Tây Bắc, với nhiều loài đặc hữu và quý hiếm cho nước ta và trên thế giới. Tuy nhiên, sự thành công của công việc bảo tồn loài phụ thuộc rất nhiều vào đánh giá hiện trạng loài và nơi ở của nó. Hiện nay, những mảng rừng nguyên

sinh còn sót ở độ cao trên 1800 m thuộc sườn phía đông của dãy núi Fansipan rất có ý nghĩa bảo tồn. Thảm thực vật nguyên sinh này phù hợp cho quần thể chuột mù và nhiều loài sóc, đặc biệt sóc hòng đỏ *Dremomys gularis*, sóc bay trâu *Petaurista petaurista* và sóc bay sao *P. elegans*.

Biện pháp bảo tồn liên quan đến bảo đảm sự an toàn cho quần thể chuột mù trong nơi ở của nó. Do vậy, các biện pháp bảo tồn tập trung vào các yêu cầu kinh tế xã hội của người dân trong khu Bảo tồn. Nếu không quan tâm đến lợi ích của người dân thì việc bảo tồn rất ít có khả năng thành công. Trên cơ sở nghiên cứu về tính đa dạng sinh học và điều kiện kinh tế xã hội tại các bản thuộc khu Bảo tồn sẽ góp phần cho các quyết định phù hợp để quản lý và bảo vệ hữu hiệu tính đa dạng sinh học cao.

Trồng rừng được tiến hành từ năm 1994 trên cơ sở các Chương trình Nhà nước 327 và 135. Các hộ dân được phép trồng rừng ở đất trống với thời gian 50 năm. Họ được sổ đỏ về quyền sử dụng đất lâm nghiệp và được khai thác sau khi cây rừng đã trưởng thành. Như vậy, rừng trồng sẽ đáp ứng nhu cầu của người dân về củi đốt và gỗ xây dựng. Nhưng đất lâm nghiệp trong khu Bảo tồn được quyền quản lý bởi Ban quản lý của khu Bảo tồn. Do vậy, đất lâm nghiệp được quyết định cho sự tái sinh tự nhiên. Hộ dân sẽ không được lợi ích kinh tế khi rừng trưởng thành. Hơn nữa, do áp lực tăng dân số, số hộ mới hình thành và số hộ nghèo tăng. Với lý do này, số hộ dân sẽ có xu hướng phụ thuộc nhiều vào các sản phẩm của rừng. Rõ ràng, sự suy giảm rừng chỉ có thể giải quyết trên cơ sở quản lý thống nhất giữa Ban quản lý khu Bảo tồn và chính quyền địa phương. Khu Bảo tồn có thể được chia thành các tiểu vùng đất canh tác, đất trồng rừng, rừng tái sinh và rừng tự nhiên. Hộ dân có thể được thu thập củi đốt và gỗ cho xây dựng nhà của họ trên diện tích đất lâm nghiệp được phép nhưng phải đảm bảo nhu cầu tương lai của họ tại diện tích đó. Hiện tại, hộ dân có thể nhận được sự giúp đỡ về tài chính và kỹ thuật cần thiết cho việc trồng rừng.

Rừng tự nhiên có thể được bảo vệ trên cơ sở ký kết giữa khu Bảo tồn và chính quyền địa

phương. Nhân viên khu Bảo tồn có thể giúp đỡ người lãnh đạo địa phương quản lý rừng theo luật bảo vệ rừng.

Các điều kiện sinh thái rừng có vai trò quan trọng hướng đến bảo vệ loài bị đe dọa thường bị ảnh hưởng liên quan đến khai thác các sản phẩm rừng, đặc biệt gỗ và trồng cây kinh tế dưới tán rừng. Như vậy, để bảo vệ thành công, phải liên quan đến người dân trong việc quản lý và các biện pháp dự báo.

Ngoài ra, người dân địa phương được phép tham gia các dịch vụ du lịch liên quan đến khu Bảo tồn. Điều này hướng các hoạt động của họ vào công tác bảo vệ rừng. Tăng cường số nhân viên, số trạm gác và các phương tiện cần thiết cho Khu Bảo tồn. Các hoạt động săn bắn và bẫy

thú cần phải được cấm nghiêm ngặt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baillie J. and Groombridge B., 1996: IUCN Red List of Threatened animals. The IUCN species survival commission, Washington
2. Corbet G. and Hill J. E., 1992: Mammals of the Indomalayan Region: Systematic review. Natural History Museum Publications. Oxford Univ. Press. Oxford UK.
3. Osgood W. H., 1932: Pub. Field Mus. Nat. Hist., 18: 193-339.
4. Tam M. N and Sung V. C., 2000: Advances in Natural Sciences, 1(3): 81-100

THE CHINESE PYGMY DORMOUSE *TYPHLOMYS CINEREUS CHAPENSIS* OSGOOD, 1932 (RODENTIA) IN VIETNAM

NGUYEN MINH TAM, CAO VAN SUNG

SUMMARY

With a total of 5644 trapnights in 22 transects, 3 individuals of the chinese pygmy dormouse *Typhlomys cinereus chapensis* Osgood (2 adult males and 1 adult female) were collected on the ground and the tree, on 6 of March and 25 of April, 2000. The chinese pygmy dormouse is very rare in Vietnam. This species distributes narrowly only in the Hoanglienson Nature Reserve and is very restricted at 1800-2400 m altitude. The population size of the chinese pygmy dormouse is very small. Its relative abundance is 0.05 per trap per captured transects. At present, this species is threatened in relation to the deforestation and the degradation in the Reserve. In this paper, factors of the threat of this species and recommendations for the Reserve conservation are also dealt with. They will be useful for the Reserve to protect this threatened species in its habitats.

Ngày nhận bài: 20-3-2000

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU VỀ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA LOÀI BỌ XÍT CỔ NGỔNG ĐỎ ĂN THỊT *SYCANUS FALLENI* STAL (HETEROPTERA, REDUVIIDAE, HARPACTORINAE)

TRƯƠNG XUÂN LAM

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Các loài bọ xít thuộc họ Reduviidae đã được biết đến đều là các loài bọ xít ăn thịt, thức ăn của chúng chủ yếu là các loài sâu hại [3].

Trên thế giới, đã có một số tác giả đã nghiên cứu về thành phần loài, mô tả hình thái, sinh học, sinh thái của một số loài quan trọng trong nhóm các loài bọ xít ăn thịt này (Distant, 1904, 1910; China và Miller, 1959; Li Yongxi, Zhou Zhihong và ctv, 1988; Masaaki Tomokumi và ctv, 1993; Barrion và Listinger, 1994; Livingstone & Murugan, 1995 v.v.).

Ở nước ta, những nghiên cứu chuyên sâu về các loài thuộc phân họ này còn rất ít, chỉ mới dừng lại ở mức độ lên danh sách loài, hoặc được nhắc đến trong danh sách nghiên cứu các loài côn trùng ăn thịt trên các cây trồng (Viện Bảo vệ thực vật, 1977; Mai Phú Quý, Trần Thị Lại, 1981; Phạm Văn Lâm, 1992, 1997; Vũ Quang Côn, Nguyễn Hữu Những, Nguyễn Thị Hai, 1994).

Bên cạnh các loài kể trên thì loài bọ xít cổ ngổng đỏ ăn thịt *Sycanus falleni* là một trong những loài bọ xít ăn thịt rất quan trọng. Chúng ăn thịt rất nhiều sâu non của các loài sâu hại nguy hiểm, thậm chí cả các loài bọ xít hại trên nhiều cây trồng như cây bông, đậu tương, ngô v.v... Cho tới nay, những tài liệu nghiên cứu về loài bọ xít *Sycanus falleni* cũng đã được đề cập tới nhưng mới chỉ là các dẫn liệu về vùng phân bố, hình thái con trưởng thành và xác định một số vật mồi của chúng trên cây bông ở Ninh

Thuận và Đồng Nai [6], cây bông ở Tô Hiệu-Sơn La [2]. Do vậy, những nghiên cứu về loài bọ xít ăn thịt này như: sinh học sinh thái, biến động số lượng, vai trò của nó với con mồi, ảnh hưởng của thuốc hoá học đến số lượng của chúng là rất cần thiết.

Để lợi dụng chúng trong phòng chống tổng hợp sâu hại bảo vệ cây trồng, trong bài báo này chúng tôi muốn đưa ra một số kết quả nghiên cứu về sinh học của loài bọ xít cổ ngổng đỏ *Sycanus falleni* ở trong phòng thí nghiệm nhằm góp phần nhỏ trong việc nghiên cứu toàn diện về loài bọ xít cổ ngổng đỏ ăn thịt này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm được tiến hành chủ yếu tại Phòng Sinh thái côn trùng, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật và Trạm thí nghiệm bông Nông trường Tô Hiệu-Sơn La, trong các tháng 7, 8, 9 và 10 năm 1999.

Bọ xít cổ ngổng đỏ *Sycanus falleni* được nuôi tại phòng thí nghiệm trong các hộp nhựa có đường kính 10 cm và 20 cm ở điều kiện nhiệt độ từ 28,5°C đến 30°C và ẩm độ từ 79% đến 82%. Thức ăn của chúng là ấu trùng tuổi nhỏ của các loài sâu hại như: sâu khoang, sâu đo xanh và sâu xanh (sâu đo xanh và sâu xanh chủ yếu tuổi 2, 3; sâu khoang chủ yếu tuổi 1, 2) được thu trực tiếp từ ngoài ruộng trồng đậu tương ở Mai Dịch (Hà Nội), Quốc Oai (Hà Tây) và các ruộng trồng bông tại Trạm thí nghiệm

bông Tô Hiệu (Sơn La). Ngoài ra thức ăn của chúng còn được lấy từ nguồn sâu khoang nuôi trong phòng thí nghiệm thuộc Phòng Công nghệ côn trùng, Viện ST và TNSV.

Để xác định thời gian phát dục của trứng của bọ xít cổ ngỗng đỏ, chúng tôi tiến hành theo dõi từng ổ trứng trong các hộp thí nghiệm (có đường kính = 10 cm) từ khi trứng mới được đẻ cho đến khi trứng nở ra thiếu trùng tuổi 1. Theo dõi và đếm số lượng quả trứng có trong ổ trứng và số lượng quả trứng nở để xác định tỷ lệ nở của trứng.

Thiếu trùng tuổi 1 (mới nở từ trứng) được nuôi từ 10-15 cá thể (trong 1 hộp thí nghiệm). Hàng ngày thay thức ăn, bông thấm nước, theo dõi thời gian lột xác của thiếu trùng, thu xác đã lột (để xác định tuổi) và ghi lại nhiệt độ, ẩm độ ở trong phòng.

Xác định thời gian phát dục cũng như số lượng ổ trứng, số lượng trứng đẻ được của một con cái, thời gian sống của bọ xít cái và dục trưởng thành trong phòng thí nghiệm bằng cách ghép đôi bọ xít trưởng thành (1 đực + 1 cái) và nuôi trong các hộp (đường kính = 20 cm). Hàng ngày thay thức ăn, bông thấm nước và tiến hành theo dõi thời gian từ khi cá thể cái đẻ ổ trứng

dầu tiên cho đến khi cá thể cái chết. Các nghiệm được lặp lại ít nhất là 3 lần.

Tính toán và xử lý số liệu theo phương pháp thống kê sinh học với $P < 0,05$ (Nguyễn Đ Khoa, 1975; Võ Hưng, 1983) bằng chương trình Excell trong Windows theo các công thức sau

Giá trị trung bình: $X = X_{tb} \pm \delta_x$

$$X_{tb} = \frac{\sum x_i}{n}$$

X_i : Giá trị thu được ở lần thí nghiệm thứ
n: Số lần thí nghiệm

Sai số trung bình δ_x : $\delta_x = \frac{S_x}{\sqrt{n}}$

S_x : Độ lệch chuẩn
n: Số lần thí nghiệm

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong thời gian nghiên cứu (các tháng 9 và 10 năm 1999) tại phòng thí nghiệm (nhiệt độ từ 28,5°C đến 30°C, ẩm độ từ 79% đến 80% với thức ăn của chúng là sâu khoang, sâu xanh và sâu xanh, chúng tôi thu được kết quả như sau:

Bá

Thời gian phát dục, số lượng trứng đẻ được và tuổi thọ của bọ xít cổ ngỗng đỏ *Sycanus falleni* Stal trong phòng thí nghiệm (Nhiệt độ: 28.5°C- 30°C; ẩm độ: 79%-82%)

Stt các cặp thí nghiệm	Thời gian phát dục của 1 con ♀ (ngày)	Số lượng ổ trứng đẻ của 1 con ♀ (ổ)	Số lượng trứng đẻ của 1 con ♀ (quả)	Số lượng quả trứng / 1 ổ trứng	Thời gian sống của 1 con ♀ (ngày)	Thời gian sống của 1 con ♂ (ngày)
1	2	3	4	5	6	7
1	8	1	150	150	28	18
2	10	2	238	119	26	21
3	8	3	406	135,33	34	17
4	10	2	257	128,5	32	15
5	13	1	138	138	23	18
6	11	2	238	119	40	34
7	11	3	316	105,33	48	30
8	12	1	163	163	36	25
9	9	1	171	171	29	23

1	2	3	4	5	6	7
10	8	2	243	121,5	38	34
11	10	3	276	92	52	31
12	12	1	138	138	26	16
13	17	1	104	104	32	19
14	18	1	79	79	28	23
15	17	1	102	102	31	21
16	13	1	97	97	24	17
17	12	2	178	89	36	28
18	13	1	115	115	32	20
19	9	2	172	86	27	18
20	13	1	78	78	25	15
21	15	1	93	93	29	17
22	16	1	71	71	31	16
Trung bình	12,05±0,64	1,55±0,12	173,77±10,75	113,39±5,92	32,14±1,95	22,05±1,35

Thiếu trùng tuổi 5 của bọ xít cổ ngỗng đỏ *Sycanus falleni*, sau khi lột xác thành con trưởng thành (hình g) không giao phối ngay, mà thường giao phối sau từ 3-5 ngày. Con trưởng thành được ghép đôi sau 8-18 ngày (trung bình 12,05±0,64 ngày) thì bắt đầu đẻ trứng. Tuổi thọ của con cái dao động từ 24-52 ngày (trung bình 32,14±1,95 ngày). Trong suốt thời gian sống của mình, một con cái có thể đẻ từ 1-3 ổ trứng (trung bình 1,55±0,12 ổ) và tổng số trứng đẻ được dao động từ 71-406 quả (trung bình 173,77±10,75 quả), số trứng trung bình/1 ổ đẻ được của 1 con cái dao động 71-150 quả (trung bình là 113,39±5,92 quả/1 ổ). Tuổi thọ của 1 con đực thường dao động từ 15-34 ngày (trung bình 22,05 ±1,35 ngày) (bảng 1).

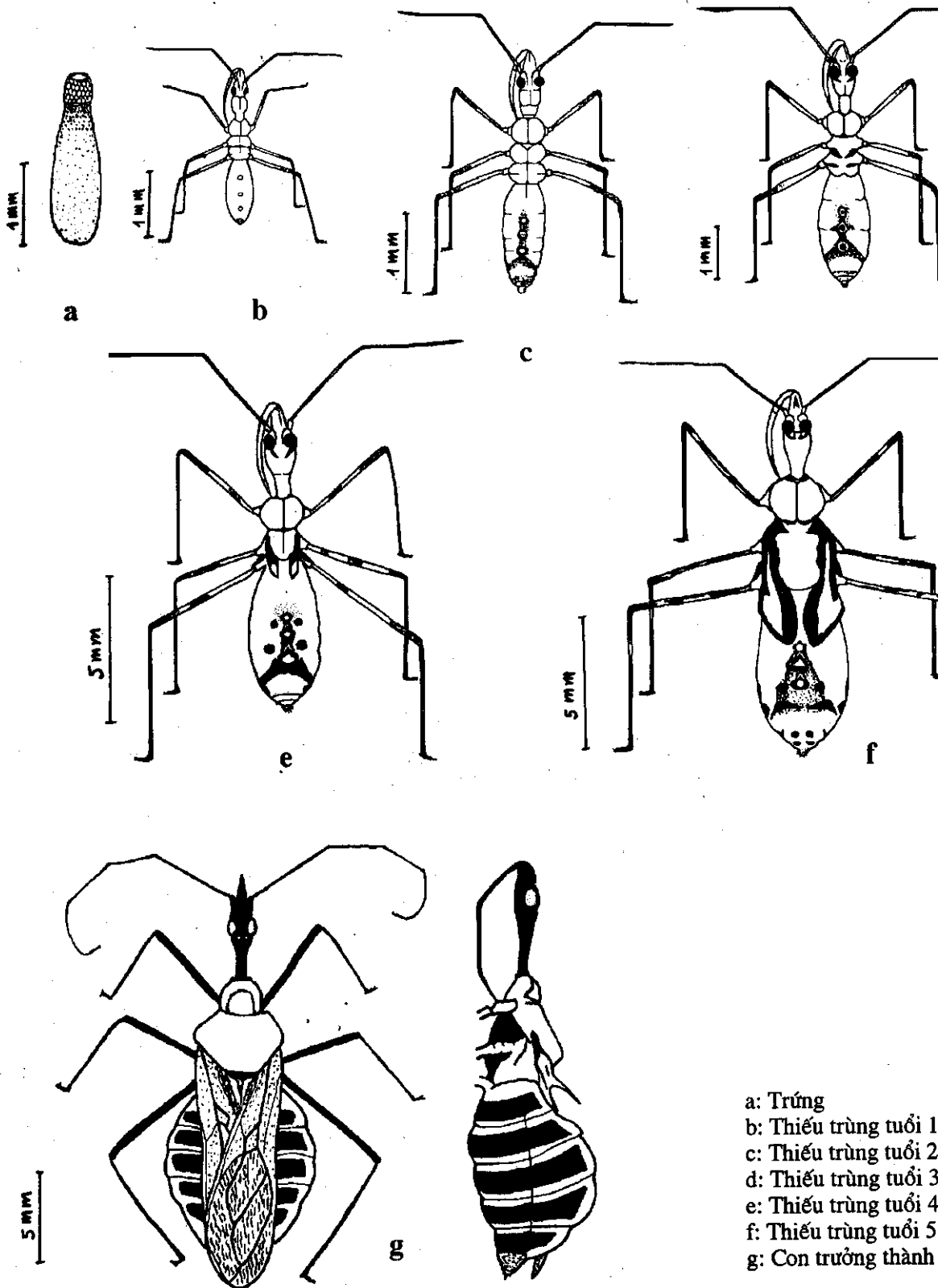
Thiếu trùng của *Sycanus falleni* có 5 tuổi

(hình b, c, d, e, f). Thiếu trùng tuổi nhỏ (tuổi 1 đến tuổi 2) thường tụ tập sống quần tụ bên nhau và chích hút chung một con mồi. Trong phòng thí nghiệm, chúng tôi thấy có rất nhiều thiếu trùng tuổi 2 cùng tấn công 1 con mồi. Bắt đầu từ tuổi 3 trở đi, thiếu trùng của *Sycanus falleni* mới tách lẻ đi kiếm ăn riêng biệt. Tập hợp các số liệu đo xác đã lột của các tuổi thiếu trùng cho thấy: ở các tuổi khác nhau thì kích thước phát triển của thiếu trùng cũng khác nhau. Kích thước trung bình của thiếu trùng tuổi 1 là 2,79±0,02 mm, tuổi 2 là 3,75 ± 0,01 mm, tuổi 3 là 5,81±0,03 mm, tuổi 4 là 10,55±0,06 mm và tuổi 5 là 14,11±0,18 mm. Tuổi thiếu trùng càng lớn thì sự dao động về kích thước càng tăng từ 0,01 mm (tuổi 1, tuổi 2) đến 0,06 mm và 0,18 mm (tuổi 4, tuổi 5). Điều đó chứng tỏ sự đòi hỏi thức ăn nhiều hơn ở thiếu trùng tuổi lớn (bảng 2).

Bảng 2

Kích thước trung bình (mm) của các tuổi thiếu trùng bọ xít cổ ngỗng đỏ *Sycanus falleni* Stal

Số mẫu đo	Thiếu trùng tuổi 1	Thiếu trùng tuổi 2	Thiếu trùng tuổi 3	Thiếu trùng tuổi 4	Thiếu trùng tuổi 5
$\Sigma_n = 100$	2,79 ± 0,02	3,75 ± 0,01	5,81 ± 0,03	10,55 ± 0,06	14,11 ± 0,18



- a: Trứng
- b: Thiếu trùng tuổi 1
- c: Thiếu trùng tuổi 2
- d: Thiếu trùng tuổi 3
- e: Thiếu trùng tuổi 4
- f: Thiếu trùng tuổi 5
- g: Con trưởng thành

Hình 1. Các giai đoạn phát triển của loài *Sycanus falleni* Stal (♀)

Thời gian phát dục và tỷ lệ nở của trứng bọ xít cổ ngỗng đỏ *Sycanus falleni* Stal trong phòng thí nghiệm (nhiệt độ: 28,5°C- 30°C; ẩm độ: 79%-82%)

Số thứ tự ổ trứng thí nghiệm	Số lượng trứng có trong ổ (quả)	Thời gian phát dục của trứng (ngày)	Số lượng trứng nở (quả)	Tỷ lệ nở (%)
1	136	17	93	68,38
2	118	15	95	80,51
3	150	21	115	76,67
4	99	19	68	68,69
5	104	16	76	73,08
6	129	21	93	72,09
7	102	20	71	69,61
8	138	18	107	77,54
9	73	16	50	68,49
10	110	20	84	76,36
11	71	19	55	77,46
12	138	18	99	71,74
13	188	15	132	70,21
14	68	19	52	76,47
15	89	20	64	71,91
n = 15	Σ = 1713	18,27 ± 0,52		73,28 ± 1,01

Từ kết quả bảng 3 cho thấy: Trứng của loài bọ xít *Sycanus falleni* phát triển từ 15-21 ngày (trung bình 18,27±0,52 ngày) thì nở và đạt tỷ lệ nở dao động từ 68,38%-80,51 % (trung bình 73,28±1,01%). Chiều dài của trứng đo được từ 2,4 mm-2,55 mm (trung bình 2,48 ±0,01 mm) (hình a).

Từ kết quả bảng 4 cho thấy: Trong điều kiện nuôi ở phòng thí nghiệm, thời gian phát triển của các tuổi thiếu trùng *Sycanus falleni* không giống nhau. Ở tuổi 4-5, thời gian phát triển của thiếu trùng thường kéo dài ngày hơn so với thời gian phát triển của thiếu trùng tuổi nhỏ. Thời gian phát triển trung bình của thiếu trùng tuổi 1 là 6,39±0,44 ngày, tuổi 2 là 8,01±0,42 ngày,

tuổi 3 là 9,85±0,41 ngày, tuổi 4 là 10,89±0,56 ngày, tuổi 5 là 13,64±0,62 ngày. Tỷ lệ sống sót trong quá trình nuôi trung bình đạt được là 69,11±5,08%.

Từ bảng 5 cho thấy: Thời gian hoàn thành 1 vòng đời của bọ xít cổ ngỗng đỏ *Sycanus falleni* từ khi con cái của thế hệ thứ 1 đẻ trứng đến khi con cái của thế hệ thứ 2 đẻ ổ trứng đầu tiên dao động từ 61-89 ngày (trung bình 79,09±3,05 ngày), trong đó thời gian phát triển trung bình của giai đoạn trứng là 18,27±0,52 ngày, giai đoạn thiếu trùng 48,77±2,35 ngày và giai đoạn từ lần lột xác cuối cùng đến khi đẻ quả trứng đầu tiên là 12,05±0,64 ngày.

Thời gian phát triển của giai đoạn thiếu trùng bọ xít cổ ngỗng đỏ *Sycanus falleni* Stal trong phòng thí nghiệm (nhiệt độ: 28,5°C- 30°C; ẩm độ: 79%-82%)

Số lượng cá thể thí nghiệm (Thiếu trùng tuổi 1)	Thời gian phát triển (ngày)				
	Thiếu trùng tuổi 1	Thiếu trùng tuổi 2	Thiếu trùng tuổi 3	Thiếu trùng tuổi 4	Thiếu trùng tuổi 5
75	6,8	8,75	10,96	11,09	12,47
120	6,49	8,57	9,54	10,28	14,71
120	7,46	9,31	11,21	11,61	15,46
120	5,49	6,57	9,03	9,33	11,67
90	4,74	7,32	8,84	9,29	12,8
75	7,35	7,50	9,50	13,11	14,75
$\Sigma_n = 600$	$6,39 \pm 0,44$	$8,01 \pm 0,42$	$9,85 \pm 0,41$	$10,89 \pm 0,56$	$13,64 \pm 0,62$

Bản

Vòng đời của bọ xít cổ ngỗng đỏ *Sycanus falleni* Stal (nhiệt độ: 28.5°C- 30°C; ẩm độ: 79%-82%)

Số lần thí nghiệm	Thời gian phát triển (ngày)			
	Trứng	Thiếu trùng	Từ lần lột xác cuối cùng đến khi đẻ	Vòng đời
$\Sigma_n = 9$	$18,27 \pm 0,52$	$48,77 \pm 2,35$	$12,05 \pm 0,64$	$79,09 \pm 3,05$

III. KẾT LUẬN

Trong điều kiện phòng thí nghiệm (nhiệt độ: 28,5°C-30°C; ẩm độ: 79%-82%).

+ Thiếu trùng tuổi 5 của bọ xít cổ ngỗng đỏ *Sycanus falleni*, sau khi lột xác thành con trưởng thành, thường giao phối sau từ 3-5 ngày. Con trưởng thành trung bình $12,05 \pm 0,64$ ngày thì bắt đầu đẻ trứng. Tuổi thọ của con cái dao động trung bình $32,14 \pm 1,95$ ngày; trong suốt thời gian sống của mình, một con cái có thể đẻ từ 1-3 ổ (trung bình $1,55 \pm 0,12$ ổ) và tổng số trứng đẻ được dao động từ 71-406 quả (trung bình $173,77 \pm 10,75$ quả), số trứng trung bình/1 ổ đẻ được của 1 con cái dao động 71-150 quả (trung bình là $113,39 \pm 5,92$ quả/1 ổ). Tuổi thọ của 1 con đực trung bình $22,05 \pm 1,35$ ngày.

+ Thiếu trùng của *Sycanus falleni* có 5 t kích thước trung bình của thiếu trùng tuổi 2, $79 \pm 0,02$ mm, tuổi 2 là $3,75 \pm 0,01$ mm, tuổi 3 là $5,81 \pm 0,03$ mm, tuổi 4 là $10,55 \pm 0,06$ mm tuổi 5 là $14,11 \pm 0,18$ mm.

+ Trứng của loài bọ xít *Sycanus falleni*] triển trung bình $18,27 \pm 0,52$ ngày thì nở và tỷ lệ nở trung bình $73,28 \pm 1,01\%$. Chiều dài trứng đo được trung bình $2,48 \pm 0,01$ mm. Kích thước trung bình của thiếu trùng tuổi 1: $2,79 \pm 0,02$ mm, tuổi 2 là $3,75 \pm 0,01$ mm, tuổi 3 là $5,81 \pm 0,03$ mm, tuổi 4 là $10,55 \pm 0,06$ mm tuổi 5 là $14,11 \pm 0,18$ mm.

+ Thời gian phát triển trung bình của t trùng tuổi 1 là $6,39 \pm 0,44$ ngày, tuổi 2: $8,01 \pm 0,42$ ngày, tuổi 3 là $9,85 \pm 0,41$ ngày, t

là $10,89 \pm 0,56$ ngày, tuổi 5 là $13,64 \pm 0,62$ ngày. Tỷ lệ sống sót trung bình đạt được là $69,11 \pm 5,08\%$. Thời gian hoàn thành 1 vòng đời của bọ xít cổ ngỗng đỏ *Sycanus falleni* từ khi con cái của thế hệ thứ 1 đẻ trứng đến khi con cái của thế hệ thứ 2 đẻ ổ trứng đầu tiên trung bình $79,09 \pm 3,05$ ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Quang Côn và cs., 1994: Tạp chí Bảo vệ thực vật, 4: 16-19.
2. Vũ Quang Côn và cs., 1995: Tạp chí Bảo vệ thực vật, 3(141): 21-26.
3. Distant W. L., 1904: The fauna of British India including Ceylon and Burma Rhynchota - Vol II (Heteroptera). Published under the authority of the Secretary of State for India in Council: 196-402.
4. Distant W. L., 1910: The fauna of British India including Ceylon and Burma Rhynchota (Heteroptera). Published under the authority of the Secretary of State for India in Council: 1-202.
5. Phạm Văn Lâm và cs., 1994: Tạp chí bảo vệ thực vật, 2: 1-4.
6. Phạm Văn Lâm, 1993: Tạp chí Bảo vệ thực vật, 5(131): 2-5.
7. Li Yongxi, Zhou Zhihong, 1988: Quảng Tây kinh tế Côn trùng Đồ sách. Quảng Tây Khoa học Xuất bản Xã: 1-153.
8. Miller N. C. E., 1956: The Biology of Heteroptera. London Leonard hill limited: 1-141.
9. Viện Bảo vệ thực vật, 1976: Kết quả điều tra côn trùng 1967-1968, Nxb Nông thôn H.: 1-579.
10. Ủy ban Khoa học Nhà nước, 1981: Kết quả điều tra cơ bản động vật miền Bắc Việt Nam: 99-112.

PRELIMINARY STUDY ON THE BIOLOGY OF *SYCANUS FALLENI* STAL (HETEROPTERA, REDUVIIDAE, HARPACTORINAE)

TRUONG XUAN LAM

SUMMARY

The studies on the biology of *Sycanus falleni* Stal were carried out in Laboratory in Hanoi (temperature: 28.5°C - 30°C ; humidity: 79%-82%).

The results indicated that after the 5th nymph instar, *Sycanus falleni* moulted to become adult then a female of *Sycanus falleni* started to produce eggs after 8 to 18 days. A female of *Sycanus falleni* could oviposit from 71 to 406 eggs (average: 173.77 ± 10.75 eggs) in its life. The duration of the egg stage of *Sycanus falleni* lasted from 15 to 21 days (average: 18.27 ± 0.52 days) with the hatched rate from 68.38% to 80.51% (average: $73.28 \pm 1.01\%$)

The nymph of *Sycanus falleni* had 5 instars. The average measurement of the 1st nymph instar was 2.79 ± 0.02 mm, the 2nd nymph instar was 3.75 ± 0.01 mm, the 3rd nymph instar was 5.81 ± 0.03 mm, the 4th nymph instar was 10.55 ± 0.06 mm and the 5th nymph instar was 14.11 ± 0.18 mm. The average duration of the 1st nymph instar was 6.39 ± 0.44 days, the 2nd instar: 8.01 ± 0.42 days, the 3rd instar: 9.85 ± 0.41 days, the 4th instar: 10.89 ± 0.56 days and the 5th instar: 13.64 ± 0.62 days. The life cycle of *Sycanus falleni* last from 61 to 89 days (average: 79.09 ± 3.05 days).

Ngày nhận bài: 16-11-2001

PHÂN BỐ CỦA LOÀI SÁN LÁ PHỔI *PARAGONIMUS HETEROTREMUS* VÀ VẬT CHỦ TRUNG GIAN CỦA NÓ TẠI VÙNG TÂY BẮC

PHẠM NGỌC DOANH, NGUYỄN THỊ LÊ, ĐẶNG TẮT THẾ

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Những nghiên cứu về sán lá phổi ở nước ta từ năm 1993 trở lại đây cho thấy bệnh sán lá phổi đã trở thành mối lo ngại đáng quan tâm ở các tỉnh miền núi. Nhóm tác giả Cao Văn Viên và cộng sự (1993) phát hiện bệnh nhân nhiễm sán lá phổi ở Sơn Hồ-Lai Châu, những nghiên cứu sau đó cho thấy số bệnh nhân tăng lên rất nhiều: 1994 phát hiện 17 trường hợp, 1995 số bệnh nhân là 44, đến 1996 số bệnh nhân là 65 và 1997 số bệnh nhân đã là 102. Tiếp sau đó, Nguyễn Văn Đê và cs (1998) thông báo bệnh có ở nhiều nơi như Lai Châu, Sơn La, Hoà Bình với tỷ lệ nhiễm tương đối cao. Tuy nhiên, ở một nơi nào đó có bệnh nhân sán lá phổi thì chưa hẳn đã là vùng phân bố thực sự của chúng nếu như thiếu vật chủ trung gian thích hợp. Vì vậy, việc xác định chính xác vùng phân bố của sán lá phổi có ý nghĩa dịch tễ hết sức quan trọng, đồng thời xác định đúng vật chủ trung gian truyền bệnh của chúng là cơ sở khoa học cho việc phòng chống bệnh sán lá phổi nguy hiểm cả ở người và động vật.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Vật chủ trung gian 2 của sán lá phổi là cua để bắt và ấu trùng metacercaria rất đặc trưng, dễ nhận dạng, vì vậy, tại mỗi địa điểm nghiên cứu, tôm, cua được thu thập và xét nghiệm trước để tìm ấu trùng metacercaria của sán lá phổi, nếu có metacercaria thì tiếp tục xác định vật chủ chính và vật chủ trung gian 1.

- Cua, tôm, ốc được bắt ở suối và định loại theo Đặng Ngọc Thanh (1980). Sau đó, ép toàn bộ các bộ phận của cua, tôm, ốc giữa 2 tấm kính. Kiểm tra dưới kính lúp và kính hiển vi, để tìm ấu trùng cercaria ở ốc và metacercaria ở tôm, cua.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Xác định sự phân bố của mầm bệnh sán lá phổi và vật chủ trung gian 2 của chúng

Kết quả xét nghiệm 5.524 cá thể tôm, cua (loài cua suối, 2 loài cua đồng và 2 loài tôm) 57 xã thuộc 24 huyện của 3 tỉnh Lai Châu, Sơn La và Hoà Bình, bao gồm: 1.201 cá thể của cua suối *Potamiscus mieni*, 593 *Potamiscus tannai*, 386 *Potamiscus kimboiensis*, 46 *Orientalia glabra*, 1594 cua đồng *Somanniathelphusa sinensis*, 30 cua đồng *Somanniathelphusa brandi*, 16 tôm *Macrobrachium nipponense*, 30 tôm *Macrobrachium dienbienphuense* cho thấy mầm bệnh sán lá phổi (metacercaria) phân bố ở 6 thuộc 4 huyện của 3 tỉnh là: Sùa Dề Phìn, Ngảo, Noong Héo-Sơn Hồ (Lai Châu); Mường-Mộc Châu (Sơn La); Thượng Tiến-Không Bôi và Tu Lý-Đà Bắc (Hoà Bình) (bảng 1, 2,

Metacercaria của sán lá phổi rất dễ nhận biết, có dạng hình tròn, đường kính 0,17- 0,25 mm, có 3 lớp vỏ, ruột có nhiều gấp khúc, hạt tiết nhiều phủ kín phần giữa nang sán (hình 1). Gây nhiễm cho động vật thí nghiệm thu được loài sán *Paragonimus heterotremus* Chen Hsia, 1964. Tuy nhiên, đối với các nhà khoa học phải là chuyên môn thì dễ bị nhầm với một loài metacercaria của loài sán lá khác thuộc *Plagiorchiidae* (có vỏ mỏng, không rõ ruột, bài tiết ít và tập trung thành một đám phía cơ thể).

Kết quả các bảng 1, 2, 3 cũng chỉ rõ rằng metacercaria của sán lá phổi tìm thấy ở 3 loài cua suối là: *Potamiscus mieni*, *P. tannanti* và *P. kimboiensis*. Các loài cua đồng là *Somanniathelphusa sinensis*, *S. brandi*, tôm *Macrobrachium nipponense*, *Macrobrachium dienbienphuense* và cua suối *Orientalia glabra*.

Tỷ lệ và cường độ nhiễm ấu trùng metacercaria của sán lá phổi tại Lai Châu

Huyện	Xã	P. mieni			S. sinensis			S. brandii			M. dienbienphuense			M. nipponense			
		SM	SN	%	CD	SM	SN	%	CD	SM	SN	%	SM	SN	%	SM	SN
Mường Tè	Mường Mỏ	45	-			25	-								20	-	
	Mường Tùng	30	-			30	-								30	-	
Mường Lay	Huổi Lèng	25	-			23	-								26	-	
	Chân Nứa	21	-			35	-								23	-	
	Nậm Hàng	30	-			26	-								24	-	
	Nà Tấu	40	-			30	-		30						25	-	
Điện Biên	Thanh Xương	33	-			24	-								20	-	
	Noong Luống	27	-			31	-								28	-	
	Thanh Hưng	35	-			35	-								30	-	
	Núa Ngam	32	-			28	-								23	-	
	Keo Lôm	28	-			23	-								25	-	
Tuần Giáo	Mùa Chung	30	-			35	-								30	-	
	Tỏa Tinh	37	-			25	-								23	-	
	Tuần Giáo	41	-			20	-								35	-	
	Chiềng Sinh	25	-			26	-								30	-	
Phong Thổ	Mường Sò	32	-			40	-								40	-	
	Thần Sìn	35	-			34	-								24	-	
	Tam Đường	40	-			32	-								25	-	
	Bản Giang	37	-			23	-								29	-	
	Bản Bò	35	-			25	-								20	-	
	Bình Lư	33	-			20	-								30	-	
Sìn Hồ	Nà Tầm	25	-			30	-								34	-	
	Sùa Dế Phìn	45	30	88,9	1-229	24	-								40	-	
	Tả Ngáo	32	26	81,3	6-327	30	-								35	-	
	Noong Héo	17	8	47,0	2-10	35	-								30	-	
Tổng	Làng Mỏ	18	-			25	-								30	-	
	Tổng	828				734			30						729		

Ghi chú: cho các bảng 1, 2 và 3: SM = số mổ; SN số nhiễm; % = tỷ lệ nhiễm; CD = cường độ nhiễm

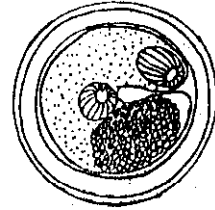
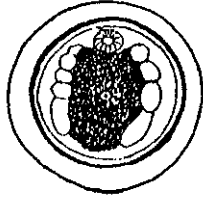
Tỷ lệ và cường độ nhiễm ấu trùng metacercaria của sán lá phổi tại Sơn La

Huyện	Xã	Tỷ lệ và cường độ nhiễm metacercaria ở từng loài vật chủ																			
		P. mieni			P. kimboiensis			P. tannanti			O. glabra			S. sinensis			M. nipponense				
		SM	SN	%	CD	SM	SN	%	CD	SM	SN	%	CD	SM	SN	%	SM	SN	%		
Quỳnh Nhai	Chiêng Ôn					35	-							21	-		30	-		20	-
	Chiêng Bằng					42	-							25	-		20	-		25	-
Thuận Châu	Chiêng Khoang	25	-			40	-									25	-		30	-	
	Phổng Lãng	30	-													30	-		35	-	
Mường La	Mường La	42	-			25	-									25	-		30	-	
	Tạ Bú					25	-									20	-		20	-	
Song Mã	Mường Sai	40	-			30	-									25	-		30	-	
	Chiêng Ve					26	-									30	-		30	-	
Mai Sơn	Nạ Ôr	31	-													20	-		25	-	
	Cò Nòi	25	-													20	-		30	-	
Bắc Yên	Tạ Khoa	25	-			25	-									30	-		30	-	
	Tứ Nang																20	-	30	-	
Yên Châu	Nà Mường					54	23	42,6	1-8							35	-		45	-	
	Quy Hương					25	-									30	-		30	-	
Mộc Châu	Mộc Châu															20	-		30	-	
	Tổng	218				327								46		380			440		

Tỷ lệ và cường độ nhiễm ấu trùng metacercaria của sán lá phổi tại Hoà Bình

		Tỷ lệ và cường độ nhiễm metacercaria ở từng loài vật chủ																		
Huyện	Xã	<i>P. mieni</i>			<i>P. kimboiensis</i>			<i>P. tannanti</i>			<i>O. glabra</i>			<i>S. sinensis</i>			<i>M. nipponense</i>			
		SM	SN	%	CD	SM	SN	%	CD	SM	SN	%	CD	SM	SN	%	SM	SN	%	
Yên Thủy	Bảo Hiệu								20	-						30	-		25	-
	Đông Môn								20	-						35	-		30	-
Lạc Thủy	Quý Hòa								31	-						25	-		35	-
	Mai Hịch	50	-													30	-		40	-
Mai Châu	Xâm Khê	56	-						15	-						40	-		20	-
	Kun Pheo	31	-						30	-						30	-		25	-
Tân Lạc	Tân Mai								30	-						30	-		35	-
	Phong Phú								30	-						35	-		20	-
Tx. Hoà Bình	Yên Mông								30	-						25	-		25	-
	Bình Thanh								30	-						20	-		20	-
Kỳ Sơn	Phúc Tiến								32	-						25	-		30	-
	Yên Quang								30	-						20	-		35	-
Lương Sơn	Tú Sơn								62	-						30	-		30	-
	Thượng Tiến								30	7	23,3	1-9				45	-		40	-
Đà Bắc	Tu Lý	18	7	38,8	1-11	76			61	14	22,9	1-12				40	-		45	-
	Cao Sơn					40										20			20	
	Tổng	155				266			311							480			475	

không bị nhiễm ấu trùng metacercaria của sán lá phổi.



Hình 1. Metacercaria của sán lá phổi *P. heterotremus*

Hình 2. Metacercaria của loài sán lá k

Ba loài cua súi thuộc giống *Potamiscus* rất giống nhau về hình dạng ngoài, dễ gây nhầm lẫn. Chúng có thể phân biệt bởi các đốt bụng và đốt ngọn chân giao cấu. Để biết mô tả chi tiết, xin tham khảo sách Động vật chí Việt Nam, V, 2001 của GS. TSKH Đặng Ngọc Thanh.

Các loài cua súi thường sống ở suối nhỏ, khe núi. Ban ngày ẩn nấp trong hang đất hoặc nấp mình dưới những tảng đá, ban đêm thì đi kiếm ăn, thức ăn của chúng là các động vật nhỏ: tôm, cua, ốc... Loài *P. mieni* phân bố rộng ở cả 3 tỉnh, còn 2 loài *P. tannanti* và *P. kimboiensis* mới tìm thấy ở 2 tỉnh Sơn La và Hoà Bình.

Vật chủ trung gian 2 của sán lá phổi ở Sơn Hồ (Lai Châu) tìm thấy là loài *Potamiscus mieni* (= *Ranguna luangprabansensis* [8]; *Ranguna kimboiensis* [7]); ở Nà Mường - Mộc Châu (Sơn La), có loài *P. kimboiensis*; ở Hoà Bình thấy 3 loài *P. mieni*, *P. tannanti* và *P. kimboiensis* đóng vai trò là vật chủ trung gian của sán lá phổi.

Về tỷ lệ và cường độ nhiễm, cua ở 3 xã thuộc huyện Sơn Hồ (Lai Châu) có tỷ lệ nhiễm cao nhất: ở Sù Đê Phìn là 88,9%, với cường độ nhiễm 1-299 metacercaria/cua; số liệu tương ứng ở Tả Ngảo là 81,3% và 6-327 metacercaria/cua; ở Noong Hẻo là 47,0% và 2-10 metacercaria/cua. Còn tỷ lệ nhiễm ở Nà Mường - Mộc Châu (Sơn La) thấp hơn (42,6% và 1-8 metacercaria/cua). Cua *P. tannanti* ở Thượng Tiến-Kim Bôi (Hoà Bình) bị nhiễm 23,3% với cường độ 1- 9 metacercaria/cua; còn ở Tu Lý - Đà Bắc (Hoà Bình) thấy cả 3 loài cua súi bị nhiễm với tỷ lệ và cường độ nhiễm ở *P. mieni* là 38,8% và 1-11 metacercaria/cua; ở *P.*

kimboiensis là 40,8% và 1-15 metacercari và ở *P. tannanti* là 22,9% và 1-12 metacercaria/cua.

Như vậy, so với các nghiên cứu trước chúng tôi bổ sung 2 loài cua súi vào danh vật chủ trung gian 2 của loài sán lá *Paragonimus heterotremus* là loài *P. tannanti* và *P. kimboiensis*.

2. Kết quả xác định vật chủ trung gian 1

Tại 6 điểm nghiên cứu mà cua súi có metacercaria của sán lá phổi: Sù Đê Phìn Ngảo, Noong Hẻo-Sơn Hồ (Lai Châu) Mường-Mộc Châu (Sơn La); Tu Lý - Đà Bắc Thượng Tiến-Kim Bôi (Hoà Bình), chúng tôi thu thập được 13 loài ốc thuộc 10 giống, 4 sống ở suối.

Kết quả xét nghiệm 19.030 cá thể ốc gồm 430 cá thể *Stenomelania* sp., *Sulcospira proteus*, 960 *Antimelania* sp., 1180 *Melanoides tuberculatus*, 1090 *Trochanares granifera*, 330 *Assiminea francoisi*, *Stenothyra messengeri*, 3840 *Katayama nosophora*, 1600 *Katayama* sp., *Blanfordia formosana*, 270 *Oncomelania* 6100 *Oncomelania* sp.2, 500 *Oncomelania* cho thấy vật chủ trung gian 1 của sán lá phổi 2 loài ốc thuộc giống *Oncomelania*, 1 loài *Oncomelania* sp.1 ở Tả Ngảo - Sơn Hồ (Lai Châu) và *Oncomelania* sp.2 ở Nà Mường - Mộc Châu (Sơn La) và Tu Lý - Đà Bắc (Hoà Bình). Còn ở Sù Đê Phìn, Noong Hẻo-Sơn Hồ (Lai Châu), Thượng Tiến-Kim Bôi (Hoà Bình) tìm thấy vật chủ trung gian 1 của sán lá phổi (bảng 4, 5).

Bảng 4

Vật chủ trung gian 1 của sán lá phổi tại 3 xã thuộc huyện Sìn Hồ - Lai Châu

Loài ốc	Sùa Dê Phìn			Tả Ngào			Noong Hèo		
	SM	SN	%	SM	SN	%	SM	SN	%
Họ Thiaridae									
<i>Stenomelania</i> sp.	150	-		130	-		150	-	
<i>Sulcospira proteus</i>	120	-		150	-		110	-	
<i>Antimelania costula</i>	170	-		190	-		140	-	
<i>Melanoides turberculatus</i>	300	-		210	-		170	-	
<i>Tarebia granifera</i>	150	-		160	-		180	-	
Họ Assimineidae									
<i>Assimineea francoisi</i>	200	-		100	-		230	-	
Họ Hydrobiidae									
<i>Katayama nosophora</i>	1120	-		1720	-		1100	-	
<i>Katayama</i> sp.	450	-		500	-		650	-	
<i>Blanfordia formosana</i>	500	-		1000	-		7000		
<i>Oncomelania</i> sp.1				270	2	0,75			

Bảng 5

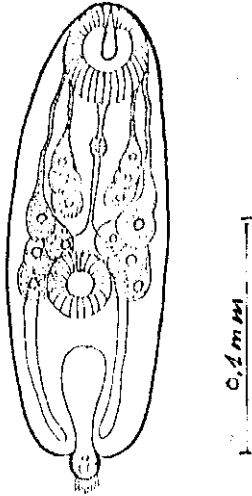
Vật chủ trung gian 1 của sán lá phổi ở Sơn La và Hoà Bình

Loài ốc	Nà Mường - Mộc Châu (SL)			Tu Lý - Đà Bắc (HB)			Thượng Tiến - Kim Bôi (HB)		
	SM	SN	%	SM	SN	%	SM	SN	%
Họ Thiaridae									
<i>Antimelania costula</i>	150	-		160	-		150	-	
<i>Melanoides turberculatus</i>	170	-		200	-		170	-	
<i>Tarebia granifera</i>	250	-		150	-		200	-	
Họ Stenothyridae									
<i>Stenothyra massageri</i>				150	-				
Họ Hydrobiidae									
<i>Oncomelania</i> sp.2	400	1	0,25	5000+500	1/500	0,2	200	-	
<i>Oncomelania</i> sp.3				500	-				

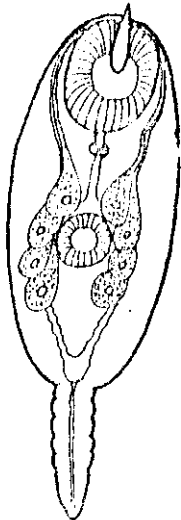
Ghi chú: SM = số mổ; SN = số nhiễm; % = tỷ lệ nhiễm

Trong cơ thể ốc, tìm thấy 2 giai đoạn ấu trùng của sán lá phổi là redia và cercaria. Cercaria của sán lá phổi rất đặc trưng: thuộc nhóm microcerca, kích thước 0,20-0,24 x 0,10-

0,15 mm, mang stylet ở đầu và đuôi hình nấm có chùm lông ở cuối, mỗi bên cơ thể có 2 chùm tế bào xâm nhập, một chùm 3 và một chùm 4 tế bào (hình 3). Tuy nhiên, chúng cũng dễ nhầm với một dạng cercaria khác tìm thấy trong các loài ốc này, đó là cercaria của nhóm Xiphidiocercaria thuộc họ Plagiorchidae, cũng có stylet có mấu ở phần giữa, nhóm này có đuôi dài, mỗi bên cơ thể chỉ có 1 chùm 4 tế bào xâm nhập (hình 4). Điều này đã được xác định qua gây nhiễm thực nghiệm sán lá phổi *Paragonimus heterotremus* cho ốc đến giai đoạn cercaria (sẽ được công bố trong bài báo sau).



Hình 3. Cercaria của loài sán lá phổi *Paragonimus heterotremus*



Hình 4. Cercaria của nhóm Xiphidiocercaria

Như vậy, trong số 13 loài ốc của 4 họ được tại các điểm nghiên cứu, mới chỉ phát 2 loài ốc thuộc giống *Oncomelania* trong Hydrobiidae bị nhiễm ấu trùng của sán lá. Chúng thường sống ở suối nhỏ hoặc khe nước chảy nhẹ, bám vào các lá cây rụng, bám vào đá gần bờ suối, ở giữa dòng và nước chảy mạnh ít hơn. Ốc có kích thước nhỏ (< 4 mm), có 5-8 vòng xoắn và rất gần nhau, gây nhầm lẫn trong công tác định loại.

Trên thế giới, có rất nhiều loài thuộc Hydrobiidae. Tại các điểm nghiên cứu, đã được 6 loài thuộc họ này, đó là *Oncomelania* sp.1, *Oncomelania* sp.2, *Oncomelania* *Katayama nosophora*, *Katayama* sp., *Blanfordia formosana*. Trong đó, đã xác định được 2 loài *Oncomelania* sp.1 và *Oncomelania* sp.2 là vật chủ trung gian 1 của sán lá (ảnh). Tuy nhiên, những loài này còn chưa nghiên cứu đầy đủ tại Việt Nam. Đây là lần đầu tiên chúng tôi thu được mẫu vật và được loại bởi GS.TSKH Đặng Ngọc Thanh. Theo những loài ốc này cũng cần được nghiên cứu hơn.

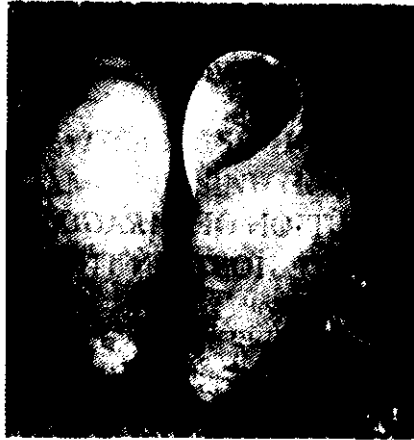
Tỷ lệ nhiễm ấu trùng cercaria sán lá ở các loài ốc này rất thấp: *Oncomelania* sp.1 Ngảo-Sin Hồ (Lai Châu) bị nhiễm 0, *Oncomelania* sp.2 ở Nhà Mường-Mộc Châu (La) là 0,25%. Riêng ở Tu Lý-Đà Bắc (Bình), xét nghiệm ốc *Oncomelania* sp.2 ở suối: 5.000 ốc *Oncomelania* sp.2 ở suối 1 500 ốc *Oncomelania* sp.2 ở suối nhỏ dưới núi, mới chỉ thấy ốc ở suối nhỏ dưới chân nhiễm ấu trùng sán lá phổi với tỷ lệ 0,2%.

Chúng tôi có nhận xét rằng: trong khi nhiễm metacercaria ở cua rất cao, nhưng nhiễm cercaria ở ốc lại rất thấp, điều này có thể do biến động theo mùa, cần nghiên cứu thêm.

Ngoài 6 địa điểm trên, một số loài ốc họ Hydrobiidae còn phân bố ở một số địa khác, như: Thị xã Hoà Bình, Phong Phú Lạc, Tân Mai-Mai Châu (Hoà Bình), Bắc Mường Lay (Sơn La). Tại các vùng này thấy sự hiện diện của cua suối *Potamiscus*. Như vậy, ở những vùng này, hai loại vật chủ trung gian của sán lá phổi có sự có mặt của sán lá phổi thì chúng điều kiện để khép kín vòng đời và phát tán bệnh.



Oncomelania sp.1



Oncomelania sp.2

Ảnh. Vật chủ trung gian 1 của sán lá phổi *P. heterotremus*

III. KẾT LUẬN

1. Nghiên cứu tại 57 xã thuộc 24 huyện của 3 tỉnh Sơn La, Lai Châu và Hoà Bình, đã phát hiện mầm bệnh sán lá phổi có ở 6 điểm thuộc 4 huyện của 3 tỉnh vùng Tây Bắc là: Sù Đê Phìn, Tả Ngảo và Noong Hẻo-Sìn Hồ (Lai Châu), Nà Mường-Mộc Châu (Sơn La), Tu Lý-Đà Bắc và Thượng Tiến-Kim Bôi (Hoà Bình).

2. Vật chủ trung gian 2 của loài sán lá phổi *P. heterotremus* là 3 loài cua suối thuộc giống *Potamiscus*: *P. mieni*, *P. kimboiensis* và *P. tannanti*. Tôm và cua đồng không phải là vật chủ trung gian của loài sán này.

3. Tỷ lệ và cường độ nhiễm metacercaria sán ở cua tại Sìn Hồ (Lai Châu) là cao nhất: ở Sù Đê Phìn tỷ lệ là 88,9%, cường độ nhiễm 1-299 metacercaria/cua, ở Tả Ngảo là 81,3% và 6-327 metacercaria /cua, ở Noong Hẻo là 47,0%, và 2-10 metacercaria/cua. Còn tỷ lệ nhiễm ở Nà Mường-Mộc Châu (Sơn La) thấp hơn (42,6% và 1-8 metacercaria/cua). Cua *P. tannanti* ở Thượng Tiến-Kim Bôi (Hoà Bình) bị nhiễm 23,3% với cường độ 1-9 metacercaria/cua, còn ở Tu Lý-Đà Bắc (Hoà Bình), thấy cả 3 loài cua suối bị nhiễm với tỷ lệ và cường độ nhiễm ở *P. mieni* là 38,8% và 1-11 metacercaria/cua, ở *P. kimboiensis* là 40,8% và 1-15 metacercaria/cua, ở *P. tannanti* là 22,9% và 1-12 metacercaria /cua.

4. Vật chủ trung gian 1 của loài sán lá phổi *P. heterotremus* là ốc *Oncomelania* sp.1 ở Tả

Ngảo-Sìn Hồ (Lai Châu) và *Oncomelania* sp.2 ở Nà Mường-Mộc Châu (Sơn La) và Tu Lý-Đà Bắc (Hoà Bình) với tỷ lệ nhiễm là 0,75%, 0,25% và 0,2% tương ứng. Còn các điểm Sù Đê Phìn, Noong Hẻo-Sìn Hồ (Lai Châu) và Thượng Tiến-Kim Bôi (Hoà Bình), chưa phát hiện thấy vật chủ trung gian 1 của sán lá phổi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng Ngọc Thanh, Thái Trần Bái, Phạm Văn Miên**, 1980: Định loại động vật không xương sống nước ngọt Bắc Việt Nam. Nxb Khoa học và Kỹ thuật: 380-439.
2. **Đặng Ngọc Thanh, Hồ Thanh Hải**, 2001: Động vật chí Việt Nam, V. Nxb Khoa học và Kỹ thuật.
3. **Asavisanu R., Setasuban P., Kitikoon V.**, 1985: Southeast Asian Journal of tropical Medicine and Public Health, 16: 345.
4. **Burch J. B., Upatham E. S.**, 1989: Journal of Medical and Applied Malacology, 1: 1-9.
5. **Cao Văn Viên**, 1997: Kỹ yếu Hội nghị khoa học - công nghệ - môi trường lần thứ V các tỉnh miền núi phía Bắc: 81-84.
6. **Hu W. Q., Zhou S.**, 1995: Journal of Endemic Diseases Bulletin, 10: 40-43.
7. **Kino H., et al.**, 1995: Japanese Journal of Parasitology, 44: 470-472.

8. Nguyễn Thị Lê, Đặng Tất Thế, Phạm Ngọc Doanh, 1997: Y học Việt Nam, 2: 35-40.
9. Nguyễn Văn Đê và cs, 1998: Hội thảo quốc gia phòng chống các bệnh giun sán 1998 2000 và đến 2005: 41-44.

DISTRIBUTION OF *PARAGONIMUS HETEROTREMUS* AND ITS INTERMEDIATE HOSTS IN THE NORTHWEST REGION OF VIETNAM

PHAM NGOC DOANH et al.

SUMMARY

The examination of 5.524 individuals of 6 crabs species and 2 crayfish species collected from 4 localities of 3 provinces (Laichau, Sonla and Hoabinh) in the Northwest region of Vietnam revealed that the metacercaria of *Paragonimus heterotremus* were found in 3 species of stream crabs: *Potamiscus mieni*, *tannanti* and *P. kimboiensis* collected from 6 localities of these 3 provinces. Meanwhile, crabs *Oriental glabra*, *Somaniathelphusa sinensis*, *S. brandti*, crayfish *Macrobrachium nipponense*, *M. dienbienphuensis* were not infected with this metacercaria.

The prevalence of infection with metacercaria in Suadephin-Sinho (Laichau) was at 88,9% with intensity 1-299 per crab; in Tangao-Sinho (Laichau): 81.3%; 6-327; in Noongheo-Sinho (Laichau): 47.0%, 2-10; Namuong-Mocchâu (Sonla): 42.6%, 1-8; in Thuongtien-Kimboi (Hoabinh): 23.3%, 1-9; in Tuly-Dab (Hoabinh): 38.8%, 1-11 per crab in *P. mieni*; 40.8%, 1-15 in *P. kimboiensis* and 22.9% , 1-12 in *P. tannanti* respectively.

19.030 snails of 13 species collected from 6 localities, where metacercaria of *Paragonimus* were found were examined for the first intermediate host of *Paragonimus* and indicated that cercaria of *Paragonimus* were found in two snail species as *Oncomelania* sp.1 in Tangao-Sinhho (Laichau) at 0.75%, a *Oncomelania* sp. 2 in Namuong-Mocchau (Sonla) and Tuly-Dabac (Hoabinh) at 0.25%, 0.2% respectively.

Ngày nhận bài: 24-12-20

PHÁT HIỆN LOÀI SÁN DÂY *TAENIA ASIATICA* KÝ SINH TRÊN NGƯỜI Ở VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIÁM ĐỊNH SINH HỌC PHÂN TỬ

LÊ THANH HOÀ, NGUYỄN BÍCH NGÀ

Viện Công nghệ sinh học

NGUYỄN VĂN ĐỀ, LÊ ĐÌNH CÔNG

Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng

NGUYỄN QUỐC DOANH

Viện Thú y

Trong những thập kỷ qua, nhiều điều tra nghiên cứu cho thấy ở nước ta, sán dây ký sinh ở người là sán dây bò (*Taenia saginata*) và sán dây lợn (*Taenia solium*), trong đó sán dây bò chiếm 78-80%. Tỷ lệ nhiễm sán dây ở đồng bằng Việt Nam là 0,5-2%, ở miền núi là 2-6% [1]. Lớp sán dây (Cestoda Rudolphi, 1808) có rất nhiều loài ký sinh ở động vật có xương sống, trong đó ký sinh ở người chủ yếu là loài sán dây bò *Taenia saginata* (*Taeniarhynchus saginatus*), Goeze 1782 và loài sán dây lợn *Taenia solium*, Linnaeus 1758 [2, 3]. Gần đây, ở một số nước châu Á, có một loài mới gọi là loài sán dây châu Á (*Taenia asiatica*) đã được phát hiện và xác định [4, 5]. Tỷ lệ nhiễm loài này tại Đài Loan là 11,0%, tại Hàn Quốc là 6,0%, tại Indonexia là 21% [5]. Năm 1905, tại Việt Nam, có loài sán dây *Taenia tonkinensis* Railliet et Hanry, 1905, được thông báo ký sinh trên người tại Bắc Bộ, nhưng không được nghiên cứu một cách đầy đủ [3].

Vấn đề xác định thành phần loài sán nhiễm trên người là hết sức quan trọng trong công tác phòng chống vì loài sán có liên quan chặt chẽ đến vật chủ trung gian truyền bệnh. Những kết quả định loại sán thu từ người dựa vào hình thái dễ có sai sót, nhất là việc phân biệt hình thái giữa *T. saginata* và *T. asiatica*. Một vấn đề cần được quan tâm nghiên cứu là liệu ở Việt Nam có tồn tại loài sán dây châu Á (*T. asiatica*) hay không? Các kết quả này sẽ tạo cơ sở khoa học cho những nghiên cứu tiếp theo để phòng chống bệnh sán dây cho cả người và gia súc.

Hơn một thập kỷ qua, phương pháp giám định loài sinh vật dựa trên đặc điểm phân tử ADN đã được phát triển và đang được sử dụng rộng rãi. Thực chất của phương pháp phân loại này là dựa vào các đặc điểm kiểu gen thay cho kiểu hình. Lợi thế của phương pháp sinh học phân tử là cho kết quả có độ tin cậy cao, cần ít mẫu vật và không phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển cá thể của sinh vật, rất phù hợp cho việc định loại sán dây ký sinh ở người. Hiện nay, ADN của hệ gen ty thể đang được sử dụng phổ biến trong phương pháp phân loại nhiều loài ký sinh trùng. Ưu điểm của ADN ty thể là: ở thể đơn bội, không tái tổ hợp, di truyền theo dòng mẹ và có tỷ lệ biến đổi nucleotit cao. Những tính chất này làm cho việc phân tích quan hệ họ hàng và tiến hoá của sinh vật ở mức độ phân tử trở nên đơn giản nhưng chính xác và đang được ứng dụng để giám định loài trên thế giới, trong đó có định loại sán dây [6, 7]. Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp định loại sinh học phân tử hệ gen ty thể, chúng tôi đã phát hiện lần đầu tiên loài sán dây *T. asiatica* có ở Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Mẫu sán dây nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu là đốt sán dây trưởng thành thu hồi từ một bệnh nhân nam 14 tuổi tại Hà Nội, tháng 5 năm 2000. Bệnh nhân này có đốt sán ra theo phân hàng ngày trong 1 tháng trước khi nhập viện, đốt sán có khả năng cử động, co

giãn như sán dây bò. Đốt sán được cố định trong cồn 70% và bảo quản lạnh ở -20°C, cho đến khi sử dụng.

2. Chọn chuỗi so sánh

Chúng tôi dùng phương pháp truy cập Ngân hàng gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), để tìm kiếm tất cả các chuỗi nucleotit hiện có của hệ gen ty thể (mtDNA) của tất cả các loài thuộc giống *Taenia* đã được đăng ký cho đến hiện nay. Kết quả đã thu nhận được rất nhiều chuỗi nucleotit, trong đó chúng tôi chọn chuỗi *cytochrome oxidase 1 (cox1)* và chuỗi *cytochrome oxidase b (cob)*, là những gen có độ bảo tồn rất cao trong hệ gen ty thể [6, 7] để làm số liệu so sánh trong giám định loài sán dây của Việt Nam (ký hiệu là TspVN).

3. Thiết kế và tổng hợp môi PCR

Chúng tôi nhận định rất có thể loài sán dây TspVN là *Taenia asiatica* (Fan, 1988; Bowles và cs, 1994), vì hình thái của mẫu thu được có

khác với loài *T. saginata* (sán dây bò) và *solium* (sán dây lợn). Do vậy, cặp môi (prime dùng trong nhân bản ADN đích bằng phản ứng PCR (polymerase chain reaction), được thiết kế dựa trên cơ sở các trình tự bảo tồn của gen *cox1* (Ngân hàng gen, số đăng ký: AB066494) và gen *cob* (Ngân hàng gen, số đăng ký: AB066580) của *T. asiatica* (chủng Đài Loan). Cặp môi cho gen *cox1*: Tacox 5'ATTGGGTTTGTGGTCAGG3' và Tacox1 5'CCAACCATAAACATATGATGAGCCCA3' nhân đoạn gen dài 652 nucleotit; cặp môi cho gen *cob*: TacytF: 5'ATGGGTGAGGCTTTTACTIG3' TacytR: 5'ATTCTGGATGGCAACCACCC3' nhân đoạn gen dài 800 nucleotit, dựa trên chuỗi trình tự tương ứng của *T. asiatica*, chủng Đài Loan. Trình tự tương ứng với đoạn ADN nghiên cứu một số quần thể thuộc giống *Taenia* đã được đăng ký tại Ngân hàng gen và công bố trên tạp chí quốc tế [7] được sử dụng để so sánh chi tiết (bảng 1).

Bảng

Các chuỗi nucleotit dùng để so sánh trong giám định phân tử loài *Taenia* TspVN

Loài	Nguồn gốc	Ký hiệu	Số đăng ký (Ngân hàng Gen)	
			<i>cob</i>	<i>cox1</i>
<i>Taenia</i> TspVN	Việt Nam	VN	AF429313	AF429314
<i>T. asiatica</i>	Đài Loan	TW	AB066580	AB066494
<i>T. saginata</i>	Trung Quốc	CN	AB066581	AB066495
<i>T. solium</i>	Trung Quốc	CN	AB066570	AB066485
	Thái Lan	TL	AB066572	AB066487
	Indônêxia	IN	AB066573	AB066488
	Tanzania	TZ	AB066578	AB066493
	Mêhicô	MX	AB066575	AB066490
<i>T. crassiceps</i>	Mỹ	US	AF216699	

4. Tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số được tách chiết bằng bộ hoá chất DNeasy Tissue Kit (QIAGEN Inc.) theo quy trình của nhà sản xuất. Mô tả rút gọn như sau: mẫu vật bảo quản trong cồn 70% được lấy ra và cho vào cồn bay hơi hết trong ly tâm chân không, sau đó rửa nhiều lần trong PBS. Mẫu vật được nghiền và xử lý với các dung môi của Kit, rồi hấp phụ lên màng và ly chiết ADN theo quy trình tách chiết. Hàm lượng ADN sử dụng cho mỗi phản ứng PCR (50 microlit) là khoảng 150 nanogram.

5. PCR và giải trình tự

ADN đích đã được nhân bản bằng PCR tiêu chuẩn với bộ hoá chất PCR Master Mix Kit (Promega). Chu trình nhiệt của PCR trên máy Perkin-Elmer (Perkin-Elmer Inc., Mỹ) gồm các bước như sau: 1 94°C-5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ: 94°C-1 phút, 50°C-1 phút và 72°C-1 phút, chu kỳ cuối kéo dài 10 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được tinh chế bằng bộ hoá chất QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc.) và được dòng hoá vào vector pCR2.1 của bộ hoá chất TA-cloning Kit (Invitrogen Inc.). Vector pCR2.1 tiếp nhận sản phẩm PCR được chuyển nạp vào dòng tế bào IVN α F' và chọn lọc khuẩn lạc theo phương pháp kháng sinh và chỉ thị màu [8]. ADN của plasmid có chứa PCR được tách chiết với bộ hoá chất QIAprep Spin Plasmid Extraction Kit (QIAGEN Inc.). Chuỗi ADN được giải trình tự trên máy giải trình tự động ABI 377 PRISM (Perkin-Elmer) và thực hiện với số lượng nhiều plasmid tái tổ hợp nhằm thu được kết quả chính xác. Sắp xếp, đối chiếu trình tự tương ứng của từng đoạn gen bằng hệ chương trình máy tính AssemblyLIGN 1.9 và MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular Inc.). Trình tự axit amin được dịch mã theo bảng mã di truyền mt-DNA số 21 của sán dẹt (platyhelminth mtDNA genetic code) giới thiệu trong Ngân hàng gen.

6. Địa điểm tiến hành

Công việc giám định phân tử và giải trình trình tự được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Kỹ sinh trùng học phân tử thuộc Viện nghiên cứu Y học Queensland (Molecular Parasitology Laboratory, Queensland Institute of Medical Research (QIMR), Australia).

II. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Đối chiếu so sánh phân đoạn gen *cox1*

Hình 1 biểu thị so sánh đối chiếu trình tự của 800 nucleotit và 266 axit amin của đoạn gen *cox1* của *Taenia TspVN* với chuỗi chuẩn tương ứng của *Taenia asiatica* (chủng Đài Loan), *T. saginata* (Trung Quốc), *T. crassiceps* (Mỹ) và các chủng khác nhau trên thế giới của loài *T. solium*. Chỉ có 2 sai khác về nucleotit ở vị trí 115 (C) và vị trí 720 (C), và 1 sai khác tương ứng về axit amin (N \rightarrow T) ở vị trí 39 do

bộ mã di truyền bị chuyển đổi (AAC \rightarrow ACC) giữa *Taenia TspVN* với *T. asiatica* của Đài Loan (hình 1A và 1B). Mức độ tương ứng về hai thành phần là rất cao, 99,8% (nucleotit) và 99,6% (axit amin). *T. saginata* sai khác với *T. asiatica* ở mức độ 26/800 (nucleotit), chiếm tỷ lệ 96,7% và 2/266 (axit amin) chiếm tỷ lệ 99,3%, trong khi đó các chủng của *T. solium* và *T. crassiceps* có mức độ tương ứng thấp hơn, dưới 90%. Như vậy, với thành phần sai khác rất thấp trong gen *cox1* của *TspVN* với *T. asiatica* (Đài Loan), và rất cao với các loài khác, cho phép *Taenia TspVN* được xác định thuộc loài *T. asiatica*. Đoạn gen *cox1* của *T. asiatica* (Việt Nam) được đăng ký trong Ngân hàng gen với số hiệu: AF429314.

2. Đối chiếu so sánh phân đoạn gen *cob*

Trong hình 2, đối chiếu trình tự của 652 nucleotit và 217 axit amin của đoạn gen *cob* của mẫu sán dây nghiên cứu của Việt Nam với các trình tự tương ứng của *Taenia asiatica* ở Đài Loan, chỉ có sai khác 2 nucleotit, đó là ở các vị trí 102 (C) và 650 (T), tỷ lệ tương ứng đạt 99,7%, và 1 axit amin ở vị trí 217 (E \rightarrow V) do thay đổi bộ mã di truyền GAA \rightarrow GTA, tỷ lệ tương ứng đạt 99,5%. Sự sai khác T \rightarrow C ở vị trí 102 không làm thay đổi axit amin. Trong lúc đó, *T. saginata* của Trung Quốc có sai khác với *T. asiatica* Đài Loan tới 24 nucleotit, tỷ lệ tương ứng là 96,3% và *T. solium* của Trung Quốc có sai khác với *T. asiatica* Đài Loan tới 105 nucleotit, tỷ lệ tương ứng là 83,9%. Mức sai khác về thành phần axit amin của các loài này cũng rất cao, đặc biệt với loài có họ hàng xa là *T. crassiceps*, tỷ lệ tương ứng chỉ đạt khoảng 85%. Rõ ràng, cũng như ở gen *cox1*, với hệ số tương ứng gần như là đồng nhất trong gen *cob*, *Taenia TspVN* là thuộc loài *T. asiatica* và có quan hệ họ hàng rất gần với *T. asiatica* của Đài Loan. Đoạn gen *cob* của *T. asiatica* (Việt Nam) được đăng ký trong Ngân hàng gen với số hiệu: AF429313.

Mức độ tương đồng cao về trình tự nucleotit và axit amin giữa các chuỗi gen *cox1* và *cob* của mẫu sán dây ở Việt Nam với chuỗi gen mẫu của *Taenia asiatica* ở Đài Loan và so sánh với các loài khác ở Trung Quốc, Indônêxia, Thái Lan, Tanzania, Mêhicô, Mỹ, cho phép chúng ta

1A. Nucleotit

Tsai (TW): TTGGGTTTGGGGTCAGGTTTCTAGGTTTAAAGATTTAGTTTATTAATTCGGTAAATTTTATAGAGCCTATTATAAGTTATTTCTTTGGGATTGTATAATTTTGGATTACTAACCATGGAATA :126
 Tsp (VN):C..... :126
 Tsag (CN):G..... :126
 Tsol (CN):T.....A.....G.....A.....T..... :126
 Tsol (TL):A.....A.....G.....A..... :126
 Tsol (IN):G.....T.....A.....G.....A..... :126
 Tsol (TZ):A.....T.....A.....G.....A..... :126
 Tsol (MX):T.....T.....A.....A..... :126
 Tcra (US): A.A.C.A.T.G.....G.....A.A.A.....T.....A.....A.T.....A.....A.A.....T..... :126

Tsai (TW): ATAAATGATTTCTTTTTTGGATGCCATTTTGGATAGGTGGTTTGGTAAATATTAAATCCCTTTGGTTGGTGGGTTATCTGATTAAACTTGGCCGTTTAAATGCTTAAAGTCGCTGGTTGGT :252
 Tsp (VN): :252
 Tsag (CN):A.....T.....A.....C.....C.....G.....T.....A.....C.....A.....A..... :252
 Tsol (CN):A.....T.....A.....T.....A.....C.....C.....A.....A.A.A.....G.....G.....T.....A.....S.....A..... :252
 Tsol (TL):A.....T.....A.....T.....A.....C.....C.....A.....A.A.A.....G.....G.....T.....A.....S.....A..... :252
 Tsol (IN): G.....A.....T.....A.....T.....A.....C.....C.....A.....A.A.A.....G.....G.....T.....A.....S.....A..... :252
 Tsol (TZ):A.....T.....A.....T.....A.....C.....C.....A.....A.A.A.....G.....G.....T.....A.....S.....A..... :252
 Tsol (MX):A.....T.....A.....T.....A.....C.....C.....A.....A.A.A.....G.....G.....T.....A.....S.....A..... :252
 Tcra (US): T.....T.....C.....A.....A.....T.....A.....T.....A.....C.....A.....A.A.A.....G.....G.....T.....A.....S.....A..... :252

Tsai (TW): ATTCCCTCAATAGTTTCTCTTTAGTTAGTATGCTTTGGGTCTGGTATAGGGTGAACTTTTATCCGCCCTTGGCTGCTCATTATTTCAAGTAGTAACGGTGGGATTTTGTATGTTCCG :378
 Tsp (VN): :378
 Tsag (CN):G.....G.....C.....G.....G.....G.....G.....A.....A.....A.....T.....G.....G.....AG.A.GT.G.A.....A.....T..... :378
 Tsol (CN): G.....A.....T.....A.....G.....A.....C.....G.....C.....A.....A.A.A.....T.....G.....G.....AG.A.GT.G.A.....A.....T..... :378
 Tsol (TL): G.....A.....T.....A.....G.....A.....C.....G.....C.....A.....A.A.A.....T.....G.....G.....AG.A.GT.G.A.....A.....T..... :378
 Tsol (IN): G.....A.....T.....A.....G.....A.....C.....G.....C.....A.....A.A.A.....T.....G.....G.....AG.A.GT.G.A.....A.....T..... :378
 Tsol (TZ): G.....A.....T.....A.....G.....A.....C.....G.....C.....A.....A.A.A.....T.....G.....G.....AG.A.GT.G.A.....A.....T..... :378
 Tsol (MX): G.....A.....T.....A.....G.....A.....C.....G.....C.....A.....A.A.A.....T.....G.....G.....AG.A.GT.G.A.....A.....T..... :378
 Tcra (US):T.....T.....T.A.A.A.....A.....A.....A.....T.A.A.G.G.....T.....A.....T.A.T.A.G.....A.....A.....T.....A.....A..... :378

Tsai (TW): TTGCATTAGCGGGTCGGCTAGAAATTTAGTCTTAATTTTATTTGGTACTTTATATAGAAATTTATGACTAATATTTTCTCGTACTTCTATAATTTATGGGCTATTATTACGTCA :504
 Tsp (VN): :504
 Tsag (CN):G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G..... :504
 Tsol (CN):T.....TA.A.T.....A.....A.....G.....G.....T.....A.....G.....G.....AT.....A.....T..... :504
 Tsol (TL):T.....TA.A.T.....A.....A.....G.....G.....T.....A.....G.....G.....AT.....A.....T..... :504
 Tsol (IN):T.....TA.A.T.....A.....A.....G.....G.....T.....A.....G.....G.....AT.....A.....T..... :504
 Tsol (TZ):A.....T.....TA.A.T.....A.....A.....G.....G.....T.....A.....G.....G.....AT.....A.....T..... :504
 Tsol (MX):A.....T.....TA.A.T.....A.....A.....G.....G.....T.....A.....G.....G.....AT.....A.....T..... :504
 Tcra (US):G.....T.....GTTA.....T.....C.A.A.....C.....CTG.G.....A.....T.....TC.T.A.T.A.....C.T.....T..... :504

Tsai (TW): ATCTATTGTAGTTACTCTCCCTGTGTAGCAGCTGCTATTACTATGCTTTTATTTGGATCGTAAATTTAGTCTCGGTTTTTTGATCCGTTAGGTGGTGGTATCTGTTTATTTCACATAG :630
 Tsp (VN): :630
 Tsag (CN):T.....A.....A.....C.....C.....A.....G..... :630
 Tsol (CN):G.....A.....G.....T.A.....T.....G.....C.....G.....C.....G.....A..... :630
 Tsol (TL):G.....A.....G.....T.A.....T.....G.....C.....G.....C.....G.....A..... :630
 Tsol (IN):G.....A.....G.....T.A.....T.....G.....C.....G.....C.....G.....A..... :630
 Tsol (TZ):G.....A.....G.....T.A.....T.....G.....C.....G.....C.....G.....A..... :630
 Tsol (MX):G.....A.....G.....T.A.....T.....G.....C.....G.....C.....G.....A..... :630
 Tcra (US):A.....GC.AA.....AT.G.....T.....A.....G.....T.....T.....G.....G.....A..... :630

Tsai (TW): TTTTGAATTTTGGTCATCCGGAGGTTTATGTTTAAATTTCTCGGTTTGGTATGATTAGTCATATATGTTTAAAGAATAAGTATGTTCCGGATGCTTTTGGTTTTATGGTTTGTATTGCT :756
 Tsp (VN): :756
 Tsag (CN):A.....A.....G..... :756
 Tsol (CN):C.....G.....C.....G.....G.....A.....G.....T.....T.....T.....C.....G.....A.....G..... :756
 Tsol (TL):C.....G.....C.....G.....G.....A.....G.....T.....T.....T.....C.....G.....A.....G..... :756
 Tsol (IN):C.....G.....C.....G.....G.....A.....G.....T.....T.....T.....C.....G.....A.....G..... :756
 Tsol (TZ):T.....G.....C.....G.....G.....A.....G.....T.....T.....T.....C.....G.....A.....G..... :756
 Tsol (MX):T.....G.....C.....G.....G.....A.....G.....T.....T.....T.....C.....G.....A.....G..... :756
 Tcra (US):T.....A.....G.....AT.G.....A.....T.....A.....T.....G.....A.....AA.TGT.....T..... :756

Tsai (TW): ATGCTTTCAATAGTATGTTTGGGAGAAAGTGTGGGGTCATCA :800
 Tsp (VN): :800
 Tsag (CN):G..... :800
 Tsol (CN):A.....A.....A.....A..... :800
 Tsol (TL):A.....A.....A.....A..... :800
 Tsol (IN):A.....A.....A.....A..... :800
 Tsol (TZ):A.....A.....A.....A..... :800
 Tsol (MX):G.....A.....A.....A.....A..... :800
 Tcra (US):T.....A.....T.....G..... :800

1B. Axit amin

Tsai (TW): LGLWSGFVGLSFLSLIRVNFLEPYNNVISLDCYNFLIINHGIIMIFFMPLIGGFGNYLIPLVGGLSDLNLPRLNALSAWLLIPISIVFLVSMC : 96
 Tsp (VN):T..... : 96
 Tsag (CN):MA..... : 96
 Tsol (CN):IS.....V.....I..... : 96
 Tsol (TL):IS.....V.....I..... : 96
 Tsol (IN):V.....I.....V.....I..... : 96
 Tsol (TZ):I.....V.....I..... : 96
 Tsol (MX):I.....V.....I..... : 96
 Tcra (US): I.....I.....F.....I.....L.....IS.....LF.....I.....S..... : 96

Tsai (TW): LGAIGLWTFYPLPSSSLFSSSNGVDFLMFLSLHLAGASSIFSSINFICTLYSIFMNI FSRTSIILWAYLFTSILLVTLPLVAAAATMLLPDRNFS : 192
 Tsp (VN): : 192
 Tsag (CN): : 192
 Tsol (CN):GS.....V.....V.....V.....S.....V..... : 192
 Tsol (TL):GS.....V.....V.....V.....S.....V..... : 192
 Tsol (IN):GS.....V.....V.....V.....S.....V..... : 192
 Tsol (TZ):GS.....V.....V.....V.....S.....V..... : 192
 Tsol (MX):GS.....V.....V.....V.....S.....V..... : 192
 Tcra (US):YM.N.....Y.....L.....TV.....S.....I..... : 192

	200	*	220	*	240	*	260	
Tasi (TW):	SAFFDPLGGGGDPLVFOHMFVFFGHPEVYVLIIPGFGMISHICLSISMCPDAFGFYGLLFAMFSIVCLGSSVNGH	:	266					
Tsp (VN):L.....I.....S.....	:	266					
Tsag (CN):L.....I.....S.....	:	266					
Tsol (CN):L.....I.....S.....	:	266					
Tsol (TL):L.....I.....S.....	:	266					
Tsol (IN):L.....I.....S.....	:	266					
Tsol (TZ):L.....I.....S.....	:	266					
Tsol (MX):L.....V.....S.....	:	266					
Tcra (US):L.....I.....N.....NC.S.....	:	266					

Hình 1. So sánh trình tự 800 nucleotit (A) và 266 axit amin (B) của đoạn gen *cox1* của *Taenia* TspVN với *Taenia asiatica* (Đài Loan), *T. saginata* (Trung Quốc), *T. crassiceps* (Mỹ) và các chủng khác nhau trên thế giới của loài *T. solium*. Ghi chú: dấu (.) biểu thị giống với trình tự *Taenia asiatica* (Đài Loan); sai khác về nucleotit hoặc axit amin được thể hiện bằng các chữ cái ký hiệu của chúng. Tasi = *Taenia asiatica*, T. sol = *Taenia solium*, T. cra = *Taenia crassiceps*, TW = Đài Loan, CN = Trung Quốc, TL = Thái Lan, IN = Ấn Độ, TZ = Tanzania, MX = Mêhicô, US = Mỹ

2A. Nucleotit

	20	*	40	*	60	*	80	*
Tasi (TW):	ATGGGTGAGGCTTTTACTGGATATATATTACCTTGACATCAAATGTCATATTGGGCTGCTACTGCTTGACATCTATAGTTGATAGATTGCCA	:	94					
Tsp (VN):G.....G.....T.....A.....	:	94					
Tsag (CN):G.....G.....T.....A.....	:	94					
Tsol (CN):A.....A.....G.....G.....G.....T.....T.....A.....G.....A.....AT	:	94					
Tsol (TL):A.....A.....G.....G.....G.....T.....T.....A.....G.....A.....AT	:	94					
Tsol (IN):A.....A.....G.....G.....G.....T.....T.....A.....G.....A.....AT	:	94					
Tsol (TZ):A.....A.....G.....G.....G.....T.....T.....A.....G.....A.....AT	:	94					
Tsol (MX):A.....A.....G.....G.....G.....T.....T.....A.....G.....A.....AT	:	94					
Tcra (US):G.....A.....A.....T.....C.....G.....G.....G.....A.....A.....T.....A.....A.....A.....CT	:	94					

	100	*	120	*	140	*	160	*	180
Tasi (TW):	TTTTTGGTAATGTTGTTTATAAGATATAGTATGGGATTTCTGTATCAGGTATAAATTGATTCGTGTGTTATCTGTGCATATTGTTGGG	:	188						
Tsp (VN):C.....G.....T.....G.....A.....A.....AC.....G.....A.....	:	188						
Tsag (CN):C.....G.....T.....G.....A.....A.....AC.....G.....A.....	:	188						
Tsol (CN):A.....G.....A.....C.....T.....G.....T.....G.....A.....A.....AC.....G.....A.....	:	188						
Tsol (TL):A.....GG.....A.....C.....T.....G.....T.....G.....A.....A.....AC.....G.....A.....	:	188						
Tsol (IN):A.....GG.....A.....C.....T.....G.....T.....G.....A.....A.....AC.....G.....A.....	:	188						
Tsol (TZ):A.....GG.....A.....C.....T.....G.....T.....G.....A.....A.....AC.....G.....A.....	:	188						
Tsol (MX):A.....GG.....A.....C.....T.....G.....T.....G.....A.....A.....AC.....G.....A.....	:	188						
Tcra (US):G.....CC.AGAT.A.....G.....G.....T.....T.....AG.T.....G.....A.....G.....AC.T.....	:	188						

	200	*	220	*	240	*	260	*	280
Tasi (TW):	TTTTTGTATTTTGGGATTAATGGTTATTCATATGTTTTATTACATAAAAGTGGTAGAAGTAAACCTTTATTTTCATTTAATTATTAGAGAT	:	282						
Tsp (VN):G.....C.....G.....G.....C.....G.....T.....G.....A.....A.....G.....A.....G.....C.....G.....T.....	:	282						
Tsag (CN):A.....G.....C.....G.....T.....G.....A.....A.....G.....A.....G.....C.....G.....T.....	:	282						
Tsol (CN):A.....C.....C.....G.....A.....G.....A.....C.....C.....T.....G.....A.....G.....A.....A.....G.....C.....G.....T.....	:	282						
Tsol (TL):A.....A.....C.....C.....G.....A.....G.....A.....C.....C.....T.....G.....A.....G.....A.....A.....G.....C.....G.....T.....	:	282						
Tsol (IN):A.....A.....C.....C.....G.....A.....G.....A.....C.....C.....T.....G.....A.....G.....A.....A.....G.....C.....G.....T.....	:	282						
Tsol (TZ):A.....A.....C.....C.....G.....A.....G.....A.....C.....C.....T.....G.....A.....G.....A.....A.....G.....C.....G.....T.....	:	282						
Tsol (MX):A.....A.....C.....C.....G.....A.....G.....A.....C.....C.....T.....G.....A.....G.....A.....A.....G.....C.....G.....T.....	:	282						
Tcra (US):G.....A.....A.....T.....T.....A.....A.....G.....AG.....T.....A.....T.....A.....T.....T.....CTG.T.....	:	282						

	300	*	320	*	340	*	360	*
Tasi (TW):	GTGATTTATTTTCATTTTATTACGGTTAAGGATTTTGTGTGTTTATGATAGTTGTTATGTTTGTAGTTTTTTGATTATTGTAGACCTG	:	376					
Tsp (VN):C.....G.....T.....G.....A.....A.....G.....G.....C.....T.....	:	376					
Tsag (CN):A.....AC.GT.....GA.A.....G.....G.....C.....T.....	:	376					
Tsol (CN):A.....T.....T.....A.....AC.GT.....GA.A.....G.....G.....C.....T.....	:	376					
Tsol (TL):A.....T.....T.....A.....AC.GT.....GA.A.....G.....G.....C.....T.....	:	376					
Tsol (IN):A.....T.....T.....A.....AC.GT.....GA.A.....G.....G.....C.....T.....	:	376					
Tsol (TZ):A.....T.....T.....A.....AC.GT.....GA.A.....G.....G.....C.....T.....	:	376					
Tsol (MX):A.....T.....T.....A.....AC.GT.....GA.A.....G.....G.....C.....T.....	:	376					
Tcra (US):TG.....AC.G.....A.....AT.T.....C.....T.....A.....G.....A.....A.....T.....G.....G.....G.....AT.....	:	376					

	380	*	400	*	420	*	440	*	460
Tasi (TW):	ATGCTTTGGTTGATATTGAGGCATATTAGAGGCTGATTCGTTGAATCTCCTGTTTCAATTAAGCCTGAGTGATATTTTATCATTTTACGC	:	470						
Tsp (VN):G.....A.....G.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....A.....A.....C.....T.....	:	470						
Tsag (CN):G.....A.....G.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....A.....A.....C.....T.....	:	470						
Tsol (CN):G.....A.....G.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....A.....A.....C.....T.....	:	470						
Tsol (TL):G.....A.....G.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....A.....A.....C.....T.....	:	470						
Tsol (IN):G.....A.....G.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....A.....A.....C.....T.....	:	470						
Tsol (TZ):G.....A.....G.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....A.....A.....C.....T.....	:	470						
Tsol (MX):G.....A.....G.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....A.....A.....C.....T.....	:	470						
Tcra (US):TTG.....AC.G.....A.....AT.T.....C.....T.....A.....G.....A.....A.....T.....G.....G.....G.....A.....	:	470						

	480	*	500	*	520	*	540	*	560
Tasi (TW):	TATTTTACGTTGTATAGGGTCAAGATTGGTGGTGGTAAATGTTAGCGTTTTTTATTTTTTTGAGTACCTACAAATAGTGGTTCGAGT	:	564						
Tsp (VN):G.....G.....A.....G.....A.....G.....A.....GT.....G.....A.....GG.....A.....	:	564						
Tsag (CN):G.....G.....A.....G.....A.....G.....A.....GT.....G.....A.....GG.....A.....	:	564						
Tsol (CN):G.....G.....T.....T.....G.....G.....A.....G.....A.....GT.....G.....A.....GG.....A.....	:	564						
Tsol (TL):G.....G.....T.....T.....G.....G.....A.....G.....A.....GT.....G.....A.....GG.....A.....	:	564						
Tsol (IN):G.....G.....T.....T.....G.....G.....A.....G.....A.....GT.....G.....A.....GG.....A.....	:	564						
Tsol (TZ):G.....G.....T.....T.....G.....G.....A.....G.....A.....GT.....G.....A.....GG.....A.....	:	564						
Tsol (MX):G.....G.....T.....T.....G.....G.....A.....G.....A.....GT.....G.....A.....GG.....A.....	:	564						
Tcra (US):A.....G.....G.....C.....T.....A.....AA.A.A.....T.....T.....T.....C.....G.....T.....G.....C.....T.....	:	564						

* 580 * 600 * 620 * 640 *

Tasi (TW) : GTATATAATGTATGGCGTCAGGTTAAATTTTGATTGATTGTAAGTTTATTTTTTCTTTAATTTATTTGGGTGGTGGCCATCCAGAAT : 652
Tsp (VN) :T..... : 652
Tsag (CN) :G.....A.....T..... : 652
Tsol (CN) : ..G...A...A...AA.....G..T...A...A...G.....T.C.....A...A.T.....T.G. : 652
Tsol (TL) : ..G...A...A...AA.....G..T...A...A...G.....T.C.....A...A.T.....T.G. : 652
Tsol (IN) : ..G...A...A...AA.....G..T...A...A...G.....T.C.....A...A.T.....T.G. : 652
Tsol (TZ) : ..G...A...A...AA.....G..T...A...A...G.....T.C.....A...A.T.....T.G. : 652
Tsol (MX) : ..G...A...A...AA.....G..T...A...A...G.....T.C.....A...A.T.....T.G. : 652
Tcra (US) : ..T...GGT..GTA.....TT.....T...A.T.A.A.G...G...A.G.C.....A...A.T.....T.G. : 652

2B. Axit amin

* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *

Tasi (TW) : MGEAFTGYLFPWRQMSYWAATVLTSLIVDSLPIFGVHYKYVGGESVSGITLIRLVSVHICLGPVLGLVHMVYLNHNSGSSNPLFSFNLYSDVYFHSYPTKDFVLF : 110
Tsp (VN) :K..... : 110
Tsag (CN) :K..... : 110
Tsol (CN) :L..S.I.....V.....V.....I.V.....K...G..... : 110
Tsol (TL) :L..S.I.....V.....V.....I.V.....K...G..... : 110
Tsol (IN) :L..S.I.....V.....V.....I.V.....K...G..... : 110
Tsol (TZ) :L..S.I.....V.....V.....I.V.....K...G..... : 110
Tsol (MX) :L..S.I.....V.....V.....I.V.....K...G..... : 110
Tcra (US) :IE...FV.PSL.S.....V.....W...I.....Y...KK.....Y..Y.SG..V.....I...F... : 110

* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 *

Tasi (TW) : MIVMVFVEMLFVSPDALDIEAYLEADSLNTPVSIKPEWYFLSFYALRCIGSKIGGLVLIVAFLLWVPTNSGSSVYVNRQVNFNLVLSLFLYGGCHPE : 217
Tsp (VN) :V..... : 217
Tsag (CN) :S..... : 217
Tsol (CN) : ...TS..I.....G...S...P.....MS.....D.....I...I...F.IN...F..... : 217
Tsol (TL) : ...TS..I.....G...S...P.....MS.....D.....I...I...P.IN...F..... : 217
Tsol (IN) : ...TS..I.....G...S...P.....MS.....D.....I...I...F.IN...F..... : 217
Tsol (TZ) : ...TS..I.....G...S...P.....MS.....D.....I...I...F.IN...F..... : 217
Tsol (MX) : ...TS..I.....G...S...P.....MS.....D.....I...I...F.IN...F..... : 217
Tcra (US) : .VEGS..IV...LN..L.L...S...P.S.....A.T.....I...LS.....G...SLV...I.F.I...V...T..... : 217

Hình 2. So sánh trình tự 652 nucleotit (A) và 217 axit amin (B) của đoạn gen *cob* của *Taenia* TspVN *Taenia asiatica* (Đài Loan), *T. saginata* (Trung Quốc), *T. crassiceps* (Mỹ) và các chủng khác nhau trên giới của loài *T. solium*. Ghi chú: dấu (.) biểu thị giống với trình tự *Taenia asiatica* (Đài Loan); sai khác nucleotit hoặc axit amin được thể hiện bằng các chữ cái ký hiệu của chúng. Tasi = *T. asiatica*; Tsag *saginata*; Tsol = *Taenia solium*; Tcra = *Taenia crassisepps*; TW = Đài Loan, CN = Trung Quốc, TL = Lan, IN = Indônêxia, TZ = Tanzania, MX = Mêhicô, US = Mỹ.

kết luận loài sán dây trên mẫu nghiên cứu thu hồi từ người Việt Nam (tại Hà Nội) là *Taenia asiatica*. Do quan hệ về lịch sử tiến hoá [4, 5], trước đây người ta vẫn coi *T. asiatica* là loài phụ (subspecies) của *T. saginata*, với tên gọi kép là *T. saginata asiatica*. Những bằng chứng sinh học phân tử gần đây đã chính thức phân biệt với loài sán dây bò *T. saginata* và tách biệt thành loài mới ký sinh trên người: *Taenia asiatica*, phân bố và gây bệnh ở các nước Đông và Đông-Nam châu Á.

Như vậy, loài sán dây *T. asiatica* ký sinh riêng cho người đã được phát hiện ở Việt Nam; nhất thiết cần có những biện pháp dịch tễ ngăn chặn loại bệnh ký sinh trùng nguy hiểm này.

III. KẾT LUẬN

- Bằng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên phản ứng PCR, mẫu vật sán dây thu hồi ở người Việt Nam tại Hà Nội được xác định là loài *Taenia asiatica*.

- Loài sán dây *T. asiatica* ở Việt Nam và ở Đài Loan có mức độ tương ứng cao về cấu trúc

di truyền (99,7-99,8%) qua so sánh trình tự nucleotit và axit amin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Đê và cs., 1998: Thông phòng chống sốt rét và các bệnh ký trùng, 2: 29-32.
2. Nguyễn Thị Lê và cs., 2000: Lớp sán *Giun sán học đại cương*. Nxb Khoa học Kỹ thuật: 21.
3. Phan Thế Việt và cs., 1997: *Giun sán sinh ở động vật Việt Nam*. Nxb Khoa học Kỹ thuật Hà Nội: 218.
4. BOWLES J. and MCMANUS D.P., 1994: *J. Trop. Med. Hyg.*, 50: 33-44.
5. FAN P. C., 1995: Annual economic caused by *Taenia saginata asiatica* Taeniasis in three endemic areas of Asia. *Abstract of second seminar on F born Parasitic Zoonoses- Thailand*: 25.
6. LE T. H., BLAIR D. and MCMANUS I 2000: *Acta Tropica*, 77: 243-256.

7. **Lê Thanh Hoà và MCMANUS D. P.**, 2001: Tập san Sinh học - Hội nghị quốc tế về sinh học, 2-4/7/2001 Hà Nội: 101-108.
8. **SAMBROOK J. and RUSSELL D.**, 2001: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (3rd ed.)* Cold Springs Harbor Press, Cold Springs Harbor N. Y.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *TAENIA ASIATICA* - A NEW HUMAN *TAENIID* SPECIES FOR VIETNAM

LE THANH HOA et al.

SUMMARY

A portion of the mitochondrial-encoded *cob* and *cox1* gene of the proglottide collected from a Taeniasis patient in Hanoi, Vietnam, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and the nucleotide and amino acid sequences were comparatively aligned with the known corresponding sequences of *Taenia asiatica* (geographical origin: Taiwan) and other related *Taenia* species (GenBank and published data) using special programs. Molecular-based analysis revealed that the *Taenia* species from this patient in Hanoi is *Taenia asiatica*. There was high nucleotide and amino acid similarity (99.7-99.8%) between *T. asiatica* in Vietnam and *T. asiatica* in Taiwan. Now that the causative agent of human taeniasis has now been identified in Vietnam, all steps should dramatically be taken to instigate control programs against this important disease.

Ngày nhận bài: 28-11-2001

ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA *GNATHOSTOMA SPINIGERUM* Ở NGƯỜI

LÊ XUÂN TÚ

Viện Công nghệ sinh học

LÊ THỊ XUÂN

Trường đại học Y - Dược, Tp. HCM

TRẦN VINH HIẾN

Trung tâm Bệnh nhiệt đới, Tp. HCM

Gnathostoma spinigerum là một loại giun ký sinh ở chó mèo ở giai đoạn trưởng thành. Vòng đời của loại ký sinh trùng này trải qua 2 ký chủ trung gian ở dưới nước: Cyclops và cá, ếch.... Người bị nhiễm khi ăn cá, lươn, ếch mang mầm bệnh không được nấu chín. Ở người, ấu trùng chỉ phát triển đến giai đoạn giun non, không cố định ở một nơi mà thường xuyên di chuyển trong cơ thể. Biểu hiện của bệnh nhiễm *Gnathostoma spinigerum* rất phong phú và đa dạng, tùy thuộc vào nơi ký sinh trùng có mặt, thường gặp nhất là ở ngoài da, ngoài ra còn có thể gặp ở các cơ quan nội tạng khác, hệ thần kinh và mắt. Bệnh chỉ được xác định khi bắt được giun từ những nơi bị tổn thương khác nhau của cơ thể, nhưng điều này rất hiếm khi xảy ra.

Bệnh phổ biến ở Đông Nam Á, nhất là Thái Lan, Nhật Bản, Việt Nam.

Ở Việt Nam, trường hợp nhiễm đầu tiên ở người được phát hiện ở Sài Gòn năm 1963 trên một em bé trai [5], đến nay đã có 10 trường hợp được ghi nhận. Gần đây, trên thế giới đã có những công trình nghiên cứu về đáp ứng miễn dịch của người đối với *Gnathostoma*, kết quả cho thấy có sự hiện diện của các kháng thể trong huyết thanh người bị nhiễm giun này. Có nhiều kỹ thuật huyết thanh học được nghiên cứu như là kết tủa, ngưng kết hồng cầu thụ động, miễn dịch enzym, phóng xạ ... Trong số đó, kỹ thuật miễn dịch enzym (ELISA) tỏ ra thích hợp

hơn trong chẩn đoán các bệnh ký sinh trùng thường quy tại các phòng xét nghiệm, do ít tốn sinh phẩm, hóa chất, thao tác đơn giản và có tính tự động hóa được. Ngoài ra, kỹ thuật này có thể phát hiện được kháng thể (AB-ELISA) và kháng nguyên lưu lưu (AG-ELISA).

Với mục đích góp phần chẩn đoán bệnh nhiễm *Gnathostoma spinigerum* ở người, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật miễn dịch (ELISA) để phát hiện ra kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên *Gnathostoma*.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Kháng nguyên

Kháng nguyên được điều chế từ ấu trùng giai đoạn 3 của *G. spinigerum*, thu thập từ loại thủy sản. Nồng độ protein trong dung dịch kháng nguyên được đo bằng phương pháp Lowry và cs. (1951), Bovin Serum Albumin (BSA) được dùng làm chuẩn.

2. Các mẫu huyết thanh

- Đối chứng dương là mẫu gồm 6 huyết thanh trộn chung lại, được lấy từ 6 bệnh nhân được xác định nhiễm *G. spinigerum*, 5 người ấu trùng di chuyển dưới da và một người bị trùng chui vào mắt.

- Đối chứng âm là mẫu gồm 20 mẫu huyết thanh trộn lẫn nhau, được lấy từ 20 người

Công trình được sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản.

khỏe mạnh, không có tiền sử bị ấu trùng di chuyển ngoài da, bạch cầu ái toan trong giới hạn bình thường, xét nghiệm phân, đờm, nước tiểu đều không tìm thấy ký sinh trùng trong thời điểm lấy máu.

- Các mẫu huyết thanh của những bệnh nhân bị nhiễm các ký sinh trùng khác được thu thập từ nhiều nguồn khác nhau và được chia làm 4 nhóm:

Nhóm 1. Giun: *Gnathostoma spinigerum* (8 trường hợp), *Ascaris lumbricoides* (7), giun móc (5), *Trichuris trichiura* (3), *Strongyloides stercoralis* (30), *Toxocara canis* (18), *Angiostrongylus cantonensis* (12).

Nhóm 2. Sán dây: *Toenia saginata* (5), *Cysticercus cellulosae* (Gạo lợn) (8).

Nhóm 3. Sán lá: *Fasciola* sp. (21), *Clonorchis sinensis* (2), *Paragonimus* sp. (15).

Nhóm 4. Đơn bào: *Entamoeba histolytica* (16), *Toxoplasma gondii* (9).

3. Phương pháp:

Kỹ thuật ELISA gián tiếp (Engvall và Perlmann, 1972) dùng phiến nhựa 96 giếng (Greiner, Đức).

Các thành phần tham gia phản ứng được pha loãng ở các nồng độ:

Kháng nguyên: 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml

Huyết thanh: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400 và 1/12800.

Cộng hợp: 1/500, 1/1000, 1/2000.

Các bước thực hiện phản ứng:

a. Phủ 100 µl kháng nguyên đã được pha loãng trong dung dịch đệm Carbonate, 0,1 M, pH = 9,6 và ủ ở 37°C trong 1 giờ, sau đó để ở 4°C qua đêm.

b. Rửa các giếng 3 lần bằng dung dịch đệm PBS-0,005% Tween 20, 0,01 M, pH = 7,4 (PBS-Tween)

c. Cho 150 µl dung dịch BSA 1% vào mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

d. Rửa các giếng 3 lần bằng dung dịch đệm PBS-Tween

đ. Cho 100 µl huyết thanh đã pha loãng vào

mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

e. Rửa các giếng 5 lần bằng dung dịch đệm PBS-Tween.

f. Cho 100 µl cộng hợp đã pha loãng vào mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

g. Rửa các giếng 5 lần bằng dung dịch đệm PBS-Tween.

h. Cho 100 µl 3,3', 5,5'-tetrametyl-benzidin (TMB) vào mỗi giếng, để trong vòng 30 phút.

i. Cho 100 µl H₂SO₄ 2 M vào để ngưng phản ứng.

k. Kết quả được đọc bằng máy đọc ELISA tự động ở bước sóng 450 nm.

- Cộng hợp IgG thử kháng IgG người có gắn enzym peroxidase (Pasteur, Paris).

- Chất nền là TMB.

Kết quả được xem là dương tính khi có trị số OD bằng hoặc cao hơn trị số OD của trung bình cộng và độ lệch chuẩn của 20 mẫu huyết thanh được lấy từ người khỏe mạnh.

II. KẾT QUẢ

Để tìm cách phát hiện tối ưu sự kết hợp của kháng nguyên, kháng thể và cộng hợp, các thành phần được thử nghiệm với nhiều độ pha loãng khác nhau. Kết quả cho thấy nồng độ tối ưu của kháng nguyên là 5 µg/ml, độ pha loãng tối ưu của cộng hợp và của kháng thể là 1/1000 và 1/400.

Với các nồng độ nêu trên, chúng tôi tiến hành thử nghiệm với 20 mẫu huyết thanh của người khỏe mạnh. Trung bình cộng (\bar{X}) OD của 22 mẫu này là 0,288, và độ lệch chuẩn (SD) là 0,022. Ngưỡng phân biệt âm tính và dương tính được tính theo công thức: $\bar{X} + SD = 0,398$. Những mẫu có OD $\geq 0,398$ được xem là dương tính.

Đối với 6 mẫu của những người bị nhiễm *G. spinigerum* thì kết quả ELISA cho thấy OD (0,531-1,177) đều cao hơn OD ngưỡng (0,398).

Kết quả của ELISA giữa kháng nguyên *G. spinigerum* và huyết thanh của những người bị nhiễm loài giun sán, đơn bào khác gồm 163 mẫu cho thấy có 10 mẫu có trị số OD bằng và cao hơn trị số ngưỡng, tỷ lệ 5,30%. Có 3 loài

giun sán cho dương tính giả, đó là *Paragonimus* sp. (4/15 mẫu) và *Fasciola Angiostrongylus cantonensis* (5/12 mẫu) (1/33 mẫu).

Bản

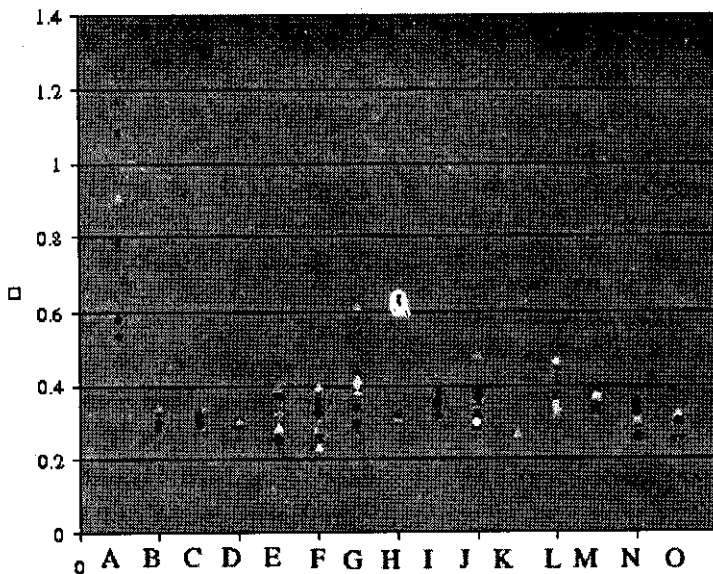
Tỷ lệ dương tính (OD ngưỡng = 0,398) của những mẫu huyết thanh người bị nhiễm *Gnathostoma spinigerum*, những người bị nhiễm các loại KST khác và người khỏe mạnh

Các loài bệnh nhiễm	Số mẫu	Dương tính OD = 0,398	% dương tính
<i>Gnathostoma spinigerum</i>	6	6	100
<i>Ascaris lumbricoides</i>	7	0	0
Giun móc	5	0	0
<i>Trichuris trichiura</i>	3	0	0
<i>Strongyloides stercoralis</i>	30	0	0
<i>Toxocara canis</i>	18	0	0
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	12	5	41,5
<i>Toenia saginata</i>	5	0	0
<i>Cysticercus cellulosae</i>	8	0	0
<i>Fasciola</i> sp.	33	1	0
<i>Clonorchis sinensis</i>	2	0	0
<i>Paragonimus</i> sp.	15	4	26,6
<i>Entamoeba histolytica</i>	16	0	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	9	0	0
Người bình thường	20	0	0
Tổng cộng	189		

Bc

Kết quả ELISA những mẫu huyết thanh cho phản ứng chéo với kháng nguyên *Gnathostoma spinigerum* (OD)

Các loài bệnh nhiễm	Số mẫu thử	Số mẫu có OD \geq 0,398	DO	X \pm SD
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	12	5	0,398 - 0,614	0.500 \pm 0.03
<i>Paragonimus</i> sp.	15	4	0,401 - 0,458	0,433 \pm 0,01
<i>Fasciola</i> sp.	33	1	0,463	0,463



Hình 1. Kết quả của thử nghiệm ELISA với các huyết thanh người bị nhiễm *Gnathostoma spinigerum*, những người bị nhiễm các loại KST khác và người khỏe mạnh: A = *Gnathostoma spinigerum*, B = *Ascaris lumbricoides*, C = Giun móc, D = *Trichuris trichiura*, E = *Strongyloides stercoralis*, F = *Toxocara canis*, G = *Angiostrongylus cantonensis*, H = *Toenia saginata*, I = *Cysticercosis*, J = *Fasciola* sp., K = *Clonorchis sinensis*, L = *Paragonimus* sp., M = *Entamoeba histolytica*, N = *Toxoplasma gondii*, O = Người bình thường.

III. BÀN LUẬN

Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu điều chế kháng nguyên và dùng kháng nguyên này để phát hiện kháng thể trong máu của người bị nhiễm *Gnathostoma* G. *spinigerum* là loài thường gặp nhất ở người, mầm bệnh xâm nhập vào người ở dạng ấu trùng giai đoạn 3 và ở người, chúng không phát triển đến giai đoạn trưởng thành được. Chúng tôi dùng ấu trùng giai đoạn 3 để làm kháng nguyên, vì nghĩ rằng kháng nguyên được điều chế từ giun ở cùng giai đoạn phát triển với mầm bệnh ở trong cơ thể bệnh nhân cho kết quả tốt hơn.

Nồng độ protein trong dung dịch kháng nguyên tối ưu là 5 µg/ml. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của Suntharasamai và cs. (1985).

Trị số trung bình cộng và độ lệch chuẩn của 20 mẫu huyết của những người khỏe mạnh $\bar{X} + SD = 0,288 + 0,01$. Ngưỡng để phân biệt âm tính và dương tính: $\bar{X} \pm 5 SD = 0,288 \pm 0,110 = 0,398$. Như vậy, kết quả được xem là dương tính khi có trị số OD $\geq 0,398$. Với ngưỡng này, cả 6

mẫu huyết thanh lấy từ bệnh nhân đã bắt được ấu trùng đều có trị số OD cao hơn, không có trường hợp âm tính giả.

Phản ứng chéo thường hay gặp trong một số bệnh nhiễm ký sinh trùng. Trong công trình của chúng tôi, dương tính giả được ghi nhận ở 3/13 loài KST được thử, đó là *Angiostrongylus cantonensis*, *Paragonimus* sp. và *Fasciola* sp. Ở hiệu giá kháng thể 1/400, tỷ lệ dương tính giả ở *A. cantonensis* của chúng tôi (41.5%) cao hơn của Suntharasamai và cs. (1985) (23%). Phản ứng chéo giữa *G. spinigerum* với *A. cantonensis* cũng được ghi nhận bởi Dhamkrong và cs. (1986), Maleewong và cs. (1988). Đối với *Paragonimus* thì tỷ lệ dương tính giả của chúng tôi là 26,6 %, của Suntharasamai và cs. (1985) là 40%; trong khi đó Anantaphruti (1989) thì *G. spinigerum* thì không chéo với *Paragonimus* sp. Chúng tôi có một trường hợp *Fasciola* chéo với *G. spinigerum* với tỷ lệ 3% (1/33). Kết quả của Anantaphruti (1989) cho thấy không có phản ứng chéo giữa *G. spinigerum* với *Fasciola*. Thử nghiệm của chúng tôi với *Clonorchis sinensis* (một loại sán lá nhỏ ở gan) cho thấy không có phản ứng chéo với *G. spinigerum*, nhưng kết quả

của hai tác giả Maleewong và cs. (1988) và Suntharasamai và cs. (1985) cho thấy tỷ lệ dương tính giả với *Opisthorchis* (một loài sán lá nhỏ khác ở gan) lại cao.

Chúng tôi nghĩ *Gnathostoma spinigerum* có thể chéo với *Angiostrongylus cantonensis*, *Paraganimus* và *Fasciola*, nhưng ở nước ta hiện tượng đa nhiễm có thể được đặt ra, vì đường lây nhiễm vào người của 3 loài KST này đều qua thực phẩm chưa chín. Số liệu của chúng tôi còn quá ít để có thể đưa ra kết luận lúc này. Công trình này cần được tiếp tục để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của thử nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anantaphruti MT., 1989: Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth., 20(2): 297-304.
2. Dhamkrong-AT A. et al., 1986: J. Clin. Microbiol., 23: 847.
3. Diaz Camacho SP. et al., 1998: Am. J. Trop. Med. Hyg., 59(6): 908-15.
4. Kasemsuth R., Panut-Ampon P. and Sanghirun C., (1981): Southeast Asian J Trop. Med. Pub. Health., 12: 410.
5. Lê Văn Hoà và cs. 1965: Bull. Soc. Patol Ext. 58: 236- 244.
6. Lowry O. H. et al. 1951: J. Biol. Chem. 193: 265.
7. Mellewong Moakote N. et al., 1988 Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health 2, 201-205.
8. Nopparatana C. et al., 1988. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health., 19: 274.
9. Soesaty M. H. N. E. et al., 1987: Trans Roy. Trop. Med. Hyg., 81: 799.
10. Suntharasamai P. et al., 1985: Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health., 16: 219-224.
11. Tada J. et al., 1987: Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth., 18: 444.
12. Tapchaisri P. et al., 1991: Int. J. Parasitol 21: 315-319.

IMMUNODIAGNOSIS OF HUMAN GNATHOSTOMIASIS

LE XUAN TU, LE THI XUAN, TRAN VINH HIEN

SUMMARY

A diagnostic method for human gnathostomiasis by ELISA was carried out. This study characterized the IgG antibodies from cases of gnathostomiasis by assaying the sera against the crude antigen (5 µg/ml) prepared from larvae of *Gnathostoma spinigerum*. The ELISA antibody titres were found to range from 1/40 to 1/12800. At the titre of 1:400 and above, positive results were observed in 100% of 6 parasitologic confirmed and 20 samples from healthy adults which had a titre from 1/50 to 1/200. The IgG antibodies from heterologous serum samples elicited a number of false positives (10/189) from three helminthic infections: angiostrongyliasis, paragonimiasis and fascioliasis. The results in the present study seem to be promising for the routine diagnosis of gnathostomiasis. The cross-reaction with other parasitic infections and the evaluation of the sensitivity and the specificity by this method are in progress.

Ngày nhận bài: 11-01-2000

SỰ BIẾN ĐỔI CÁC CHẤT ỨC CHẾ TRIPXIN (TI) Ở HẠT GẮC TRONG QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH VÀ PHÁT TRIỂN CỦA HẠT

NGUYỄN QUỲNH UYÊN, LÊ TRỌNG QUANG,
TRINH HỒNG THÁI, PHAN THỊ HÀ, PHẠM THỊ TRÂN CHÂU

Đại học Quốc gia Hà Nội

LÊ NGUYỄN DŨNG, JEAN FRANCOIS, LAURENT CHICHE

Đại học Montpellier I

Các protein ức chế tripxin (TI) của hạt bí có nhiều tính chất đặc biệt như: khối lượng phân tử thấp (vào khoảng 3 kDa), rất bền với nhiệt, bền với axit, ở dạng tự nhiên khó bị phân giải dưới tác dụng của các proteinaz khác nhau (trừ pepxin), vì vậy các TI này đã được nhiều người quan tâm nghiên cứu. Đến nay, đã có gần 50 TI của hạt bí đã được xác định cấu trúc bậc I. Do có nhiều tính chất mới mẻ nên các TI của hạt bí được xếp thành một họ mới, họ thứ 10 của các protein ức chế proteinaz - xerin. Một số các TI này đã được nghiên cứu cấu trúc không gian, tổng hợp bằng phương pháp hoá học hoặc bằng các biện pháp công nghệ sinh học (CNSH), cải biến phân tử để tạo ra các phân tử có hoạt tính sinh học mới với hiệu quả ứng dụng cao hơn.

Tuy nhiên hầu hết các nghiên cứu TI ở họ bầu bí cũng như các họ khác đều tập trung vào các TI ở hạt chín sinh lý, vì vậy, cho đến nay, còn ít biết về quá trình sinh tổng hợp, quá trình tích lũy TI ở hạt và còn ít dẫn liệu thực nghiệm về vai trò của chúng ở thực vật. Hiểu biết vấn đề này không chỉ có ý nghĩa khoa học mà còn có ý nghĩa thực tiễn để nâng cao hiệu quả sử dụng và khai thác các TI của họ bầu bí.

Các nghiên cứu của chúng tôi trước đây ở *Cucurbita pepo var. patisonnina* (CPP) [9] là công trình đầu tiên nghiên cứu có hệ thống các TI ở các phần khác nhau của quả, ở các giai đoạn phát triển khác nhau của hạt từ lúc hình thành đến khi nảy mầm [8, 9] cũng như ở hạt aloron của nội nhũ hạt [7]. Các kết quả thu được đã đóng góp dẫn liệu cho các vấn đề đã nêu. Hướng nghiên cứu trên cũng đã được tiếp tục một phần với các hạt của các loài khác thuộc họ

bầu bí khác của Việt Nam như mướp đắng [12], mướp hương, mướp Ấn Độ [14, 15].

Hạt gác trồng thuộc loại giàu TI nhất trong số các hạt của các loài họ bầu bí đã nghiên cứu, vì vậy, bên cạnh các nghiên cứu khai thác sử dụng các PPI của hạt gác [10, 11], công trình này giới thiệu kết quả nghiên cứu TI trong quá trình phát triển của hạt gác nhằm góp thêm dẫn liệu để tìm hiểu quá trình sinh tổng hợp TI ở hạt, một vấn đề còn ít được chú ý nghiên cứu.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

- Hạt gác non: tuổi hạt được tính từ lúc hoa nở, sau khi thu về giữ ở -20°C .

- Dịch chiết (DC) hạt: hạt nghiền mịn chiết bằng axit perchloric 0,15 M, do thể tích đồng thể, ly tâm 10000 vòng/phút, lấy dịch trong, điều chỉnh dung dịch đến pH = 7,0 bằng dung dịch KOH 0,1 M, ly tâm thu dịch trong để phân tích. Quá trình nghiền hạt và chuẩn bị DC, ly tâm đều thực hiện ở điều kiện lạnh.

- Các hoá chất có độ sạch tinh khiết.

2. Phương pháp

Xác định protein theo phương pháp Lowry [6], dùng albumin huyết thanh bò làm chất chuẩn. Hoạt độ ức chế tripxin (TIA) được xác định bằng hiệu số hoạt độ enzym trước và sau khi xử lý enzym với dung dịch có chứa chất ức chế trong 10 phút. Hoạt độ proteolytic được xác định theo phương pháp Anson cải tiến [13], dùng cơ chất casein. Hàm lượng chất ức chế

được tính bằng đơn vị (IU): 1IU là lượng chất ức chế làm giảm 50% hoạt độ của 2 mg tripxin. Điện di protein theo phương pháp Leammli [5], điện di phát hiện các băng TI trên gel poliacrilaMIT (PAG) theo phương pháp Hanspal [2]. Điện di phát hiện protein trên PAG có SDS và cơ chất casein theo phương pháp của Heussen và Dowdle [3].

Xác định chất khô bằng cân thủy phân Scaltec.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

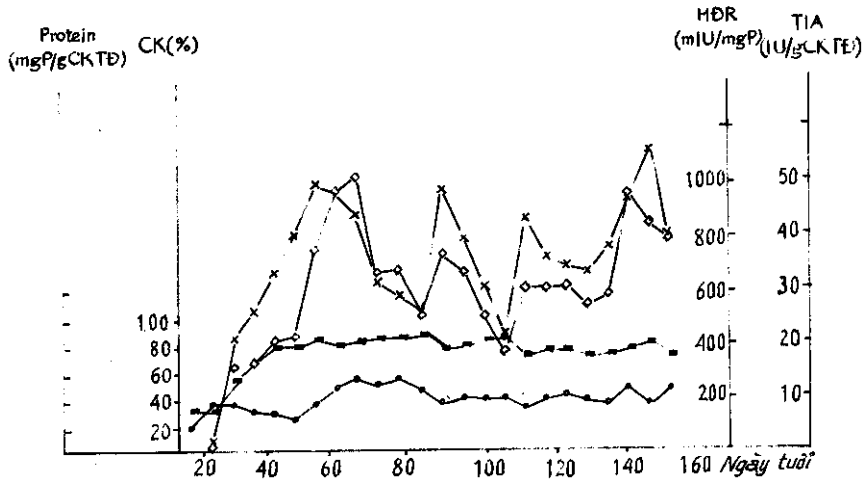
1. Sự biến đổi chất khô, protein, TIA của hạt trong quá trình phát triển

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trọng lượng hạt (cả vỏ cứng) đạt cực đại vào ngày thứ 80-95

ngày tuổi, sau đó giảm dần do quá trình l nước khi hạt chín. Hàm lượng chất khô của l vào 60 ngày tuổi (hình 1), đạt 80% trọng l hạt và giữ ở mức 80-90% trong tháng tiếp th sau đó giảm và giữ ở mức 75-80% cho đến 1 ngày tuổi.

Hàm lượng protein tan trong axit cũng b đổi theo cách tương tự với sự biến đổi chất k ít thay đổi kể từ 90 ngày tuổi (3/5 thời gian p triển) cho đến 150 ngày tuổi.

Hoạt độ ức chế tripxin (TIA) của DC non rất thấp, có thể định lượng được ở hạt ngày tuổi và tăng lên nhanh, đạt cực đại vào ngày tuổi.(khoảng gần giữa thời gian phát triể sau đó tuy có tăng hoặc giảm nhưng đều ở n thấp hơn hạt 70 ngày tuổi, đến ngày thứ 140-1 mới tăng lên gần bằng hạt 70 ngày tuổi.



Hình 1. Sự biến đổi hàm lượng chất khô, protein và TI của hạt gạo trong quá trình phát triển

1. Chất khô, 2. Protein, 3. TIA, 4. Hoạt độ riêng

—•— CKTD (%) —x—HDR (mIU/mgP)
—●— Protein (mg P/g CKTD) —◇—TIA (IU/g CKTE)

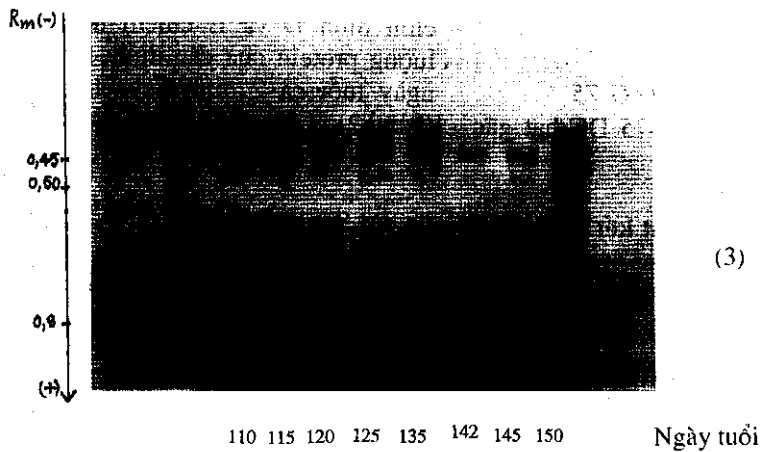
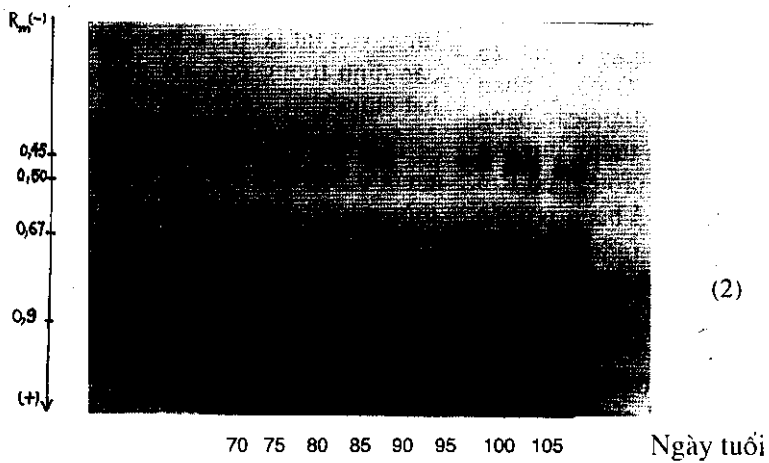
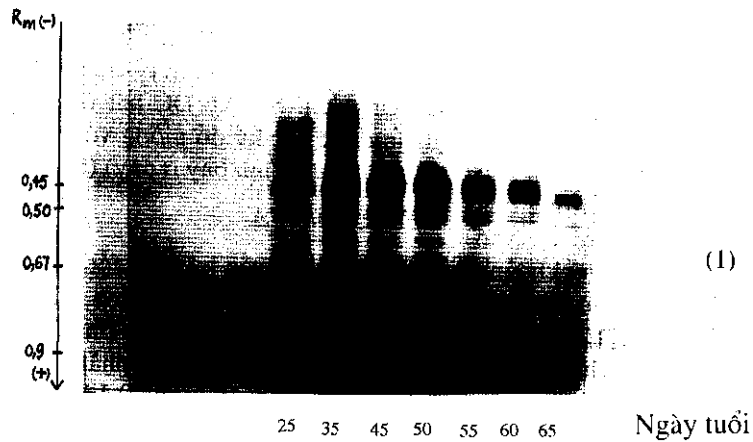
Kết quả trên mới cho biết sự biến đổi về lượng, để theo dõi sự biến đổi về "bộ" TI trong quá trình phát triển của hạt, chúng tôi đã sử dụng phương pháp điện di trên gel poliacrilaMIT (PAGE).

Sử dụng phương pháp PAGE có cơ chất không có mercaptoetanol để theo dõi thành phần các TI trong DC hạt cho thấy:

- Ở điều kiện không có SDS, điện di theo chiều từ (-) → (+) và từ (+) → (-), đã phát hiện được từ DC hạt 60-150 ngày tuổi đều có 4 băng

TI chính di chuyển về phía catot và 3 băng k di chuyển về anot, các băng TI có tính k tăng lên rõ rệt từ 80 ngày tuổi cho đến khi chín. Ở DC hạt 25-55 ngày, các băng TI 1 nhau không rõ.

- Ở điều kiện điện di có SDS (ảnh 1), tất các mẫu đều có băng (hoặc vùng băng) TI yếu với Rm vào khoảng 0,9 (là TI có khối lư phân tử thấp nhất), tiếp đến là băng TI có R: 0,45; băng TI 0,5 cũng có ở tất cả các 1 nhưng ít hơn. Nhìn chung, phổ điện di TI



Ảnh 1. Phổ điện di TI của hạt gấc ở các ngày tuổi khác nhau

Điện di trên PAG có cơ chất casein 0,2%, có SDS, ở điều kiện không khử (không có mercaptoetanol)
 (1) hạt gấc từ 25-65 ngày tuổi; (2) hạt gấc từ 70-105 ngày tuổi; (3): hạt gấc từ 110-150 ngày tuổi

DC hạt vào khoảng 65 ngày tuổi cho đến khi chín khá giống nhau; ở hạt non hơn, phổ điện di phức tạp hơn, bao gồm nhiều băng trong đó đáng lưu ý là băng TI với $R_m = 0,67$ có cường độ bất mầu gần tương đương với TI có $R_m = 0,45$. Việc không phát hiện được băng TI 0,67 ở những hạt già, ít nhất cũng chứng tỏ tỷ lệ của TI này bị giảm so với các TI khác. Nhìn chung, có thể thấy sự thay đổi tỷ lệ giữa các TI trong quá trình phát triển của hạt gạo xảy ra rõ rệt vào khoảng 65-75 ngày tuổi, nghĩa là vào khoảng giữa thời kỳ phát triển của hạt, giống như đã xác định được ở các loài họ bầu bí khác [12, 14, 15]. Tuy nhiên chưa phát hiện được sự chuyển hoá tương hỗ giữa các TI như ở hạt CPP [9].

Tóm lại, kết quả trên cho thấy TI (hoặc các TI) phân tử thấp nhất với $R_m = 0,9$ là TI chủ yếu của hạt gạo chín đã xuất hiện ngay ở hạt 25 ngày tuổi. Điện di protein (ảnh 2) cũng nhận được kết quả tương tự, phát hiện được các băng protein chủ yếu với các giá trị R_m tương ứng với các băng TI, nhưng ở vùng băng protein có R_m khoảng 0,9, đã phát hiện được 2-3 băng protein sát nhau. Ở hạt non hơn 75 ngày tuổi, phổ điện di phức tạp hơn, nhiều băng protein ở vùng M_r lớn, kể cả hạt 15 ngày tuổi. Tuy nhiên, ở hạt 15 ngày tuổi đã không phát hiện được băng protein ứng với R_m khoảng 0,9. Từ đó, có thể nghĩ rằng các TI phân tử thấp (là những TI chủ yếu ở hạt gạo chín) xuất hiện ở hạt sau 15 ngày tuổi.

2. Tách TI của DC hạt 25 ngày tuổi và hạt chín

a) Sắc ký lọc gel qua cột Sephadex G-75

Sắc ký qua cột Sephadex G-75 DC hạt gạo

25 ngày tuổi, nhận được 1 đỉnh TIA ứng với $V_e = 190$ ml (hình 2); đối với DC hạt gạo chín, thì được 2 đỉnh TIA tách nhau không rõ: đỉnh I có $V_e = 190$ ml, đỉnh II có $V_e = 202$ ml. Từ đó, có thể nghĩ rằng ở hạt chín tỷ lệ các TI phân tử thấp đã tăng lên. Sắc ký DC hạt 60 ngày tuổi cũng nhận được sắc ký đồ giống với hạt 25 ngày tuổi (hình không trình bày ở đây) (bảng 1).

b) Thu đỉnh TIA

Tiến hành sắc ký qua cột Mono S hệ thối FPLC. Kết quả trên hình 3a, 3b cho thấy pl protein của 2 mẫu này có những sai khác nhất định: ở hạt 25 ngày tuổi phần protein được rút xuống ở nồng độ muối 0,1 M có 1 cụm di protein được rút xuống sớm hơn các đỉnh A và của hạt chín. Dựa vào thời gian lưu (retention time: viết tắt là rt), ở hạt 25 ngày tuổi không các đỉnh tương ứng với đỉnh A và đỉnh B của hạt chín.

- Phần protein được rút xuống ở nồng độ muối 0,2 M của 2 mẫu có các đỉnh tương ứng thời gian lưu như nhau (bảng 2): các đỉnh C₃, C₄, E, F của hạt chín (hình 3a) đều có hoạt tính chế tripxin, có thể tương ứng theo thứ tự với các đỉnh TIA c₃, c₄, e, f (hình 3b) của hạt 25 ngày tuổi; đỉnh D tương ứng với đỉnh TIA d. Sự khác chủ yếu là tỷ lệ giữa các đỉnh: ở hạt non đỉnh f chiếm tỷ lệ lớn hơn cả chiếm 57% tổng protein của các đỉnh trong khi ở hạt chín di protein này chiếm hơn 15%. Ngược lại, ở hạt chín đỉnh D và E chiếm đến hơn 68% tổng lượng protein của các đỉnh, trong khi ở hạt 25 ngày tuổi cả 2 đỉnh này chỉ chiếm gần 2% (bảng 2).

Bản

Tóm tắt kết quả sắc ký qua cột Sephadex G-75

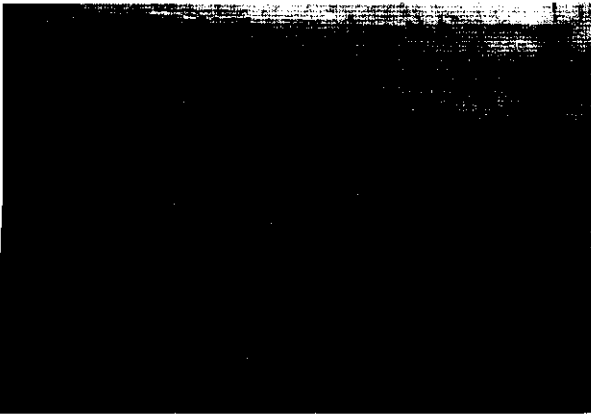
Hạt	Mẫu	Protein		TIA		HDR IU/mg protein	Độ sắc
		mg	%	IU	%		
25 ngày tuổi	DC	66,0	100	86,0	100	1,30	1,0
	Sephadex G-75 (đỉnh TIA)	29,9	34,6	64,5	75	2,15	1,6
Hạt chín	LC	241,7	100	174,9	100	0,80	1,0
	Sephadex G-75 (đỉnh TIA)	120,0	49,6	158,8	90	1,32	1,6



(1)

15 25 35 45 50 55

Ngày tuổi



(2)

60 65 70 75 80 85

Ngày tuổi

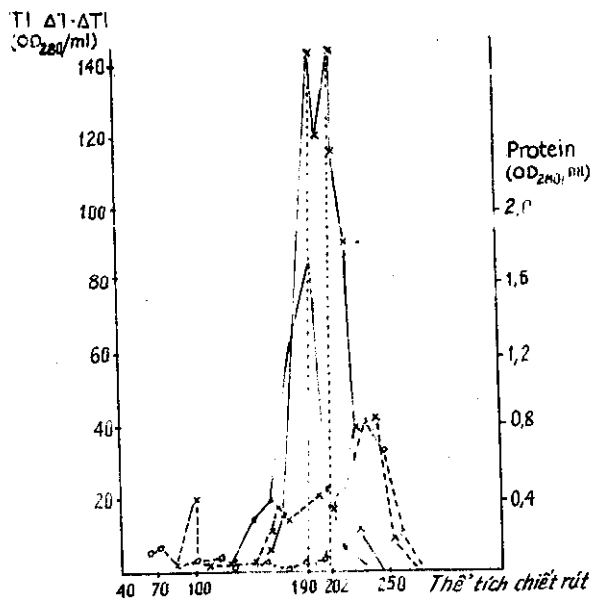


(3)

90 95 100 105 110 115

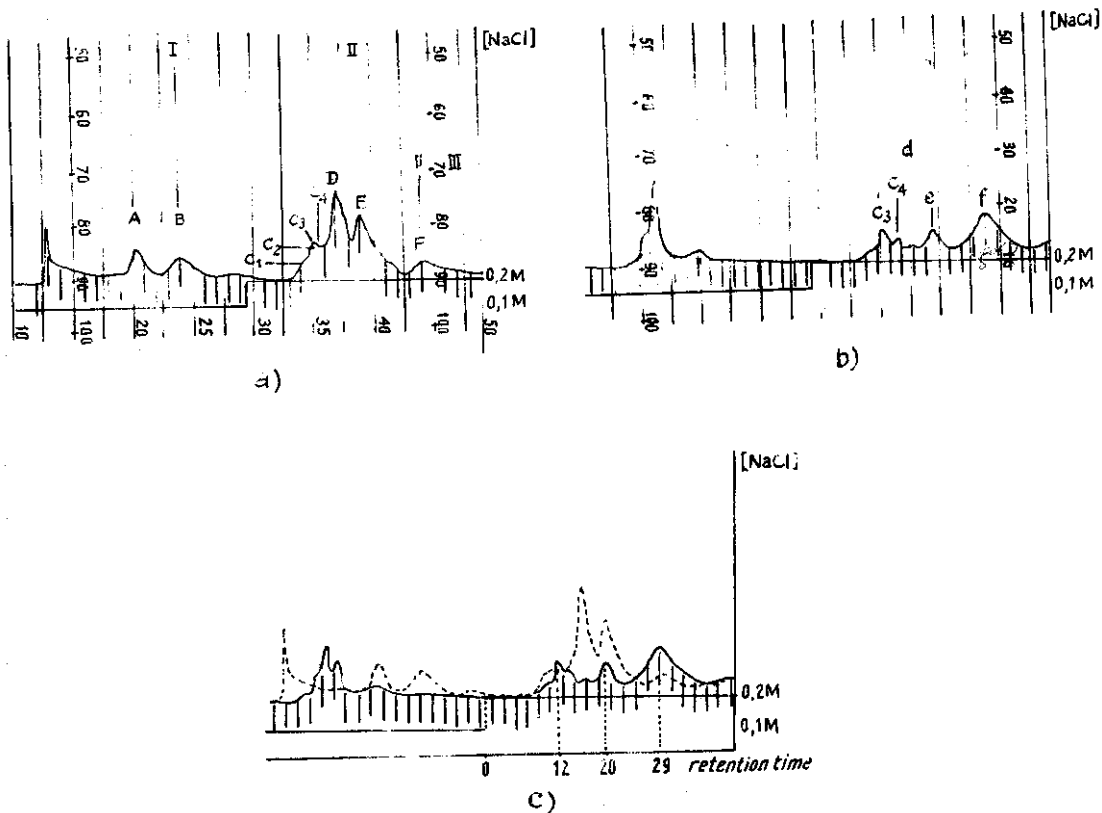
Ngày tuổi

Ảnh 2. Phổ điện di protein của hạt gạo ở các ngày tuổi khác nhau
Điện di trên PAG có DSC ở điều kiện không khử (không có mercaptoetanol)
(1) hạt gạo từ 15-55 ngày tuổi, (2) hạt gạo từ 60-85 ngày tuổi; (3): hạt gạo từ 90-115 ngày tuổi



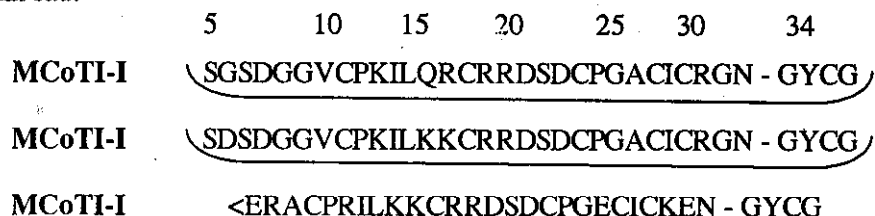
Hình 2. Sắc ký qua cột Sephadex G-75, kích thước cột: 2x94 cm, vận tốc 32 ml/h, phân đoạn 3 ml; thể tích mẫu = 5 ml, đệm axetat natri: 0,02 M pH = 5

— x — TIA của hạt gấc chín --- x --- Protein của hạt gấc chín
 — • — TIA của hạt 25 ngày tuổi --- o --- Protein của hạt 25 ngày tuổi



Hình 3. Sắc ký đồ qua cột Mono S, hệ thống FPLC. Đệm natri axetat: 0,005 M, pH = 3,6
 a: hạt gấc chín, b: hạt gấc 25 ngày tuổi, c: vẽ chồng 2 đồ thị a và b để tiện so sánh
 --- hạt gấc chín, — hạt gấc 25 ngày tuổi

Các TI của các đỉnh B, D, E, F của hạt chín đã được xác định cấu trúc bậc I [4] được mô tả theo hình sau:



Bảng 2

So sánh các đỉnh TIA của hạt gấc chín và hạt gấc 25 ngày tuổi nhận được sau khi sắc ký qua cột Mono S

Nồng độ NaCl của dung dịch	Hạt chín			Hạt 25 ngày tuổi		
	Đỉnh	Thời gian lưu (phút)	% tổng số đỉnh được rút xuống ở cùng nồng độ muối	Đỉnh ứng với các đỉnh của hạt chín	Thời gian lưu (phút)	% tổng số đỉnh được rút xuống ở cùng nồng độ muối
0,1 M	A					
	B	33,5				
0,2 M	C ₁	9,5	3,19			
	C ₂	10,5	4,15	c ₂	10,00	4,11
	C ₃	11,5	2,87	c ₃	12,00	9,36
	C ₄	13,5	5,75	c ₄	14,00	6,36
	D	16,5	34,18	d	16,50	6,36
	E	20,5	34,18	e	20,00	15,35
	F	29,5	15,72	f	29,00	57,30

và ký hiệu là MCoTI-I (B), -II (E) và -III (F). Các nghiên cứu cũng đã xác định đỉnh D là isofom của MCoTI-II, đỉnh F ngoài MCoTI-III còn có dạng succimide của MCoTI-II [4]. Đối chiếu các đỉnh TIA của hạt non với các đỉnh TIA của hạt chín, có thể nghĩ rằng ở hạt 25 ngày tuổi không có MCoTI-I hoặc chỉ có với lượng rất ít, lượng MCoTI-II cũng ít hơn MCoTI-III. Để khẳng định điều này, cần tiếp tục nghiên cứu xác định cấu trúc bậc I của các TI ở các đỉnh c, d, e, f của hạt non. MCoTI-I, -II, -III có khối lượng phân tử tương ứng là 3480,7 ; 3453,0 và 3379,6. MCoTI-I và -II có cấu trúc vòng kiểu nối đầu đuôi, bao gồm 34 axit amin trong đó có 6 gốc Cys tạo thành 3 cầu -S-S-, tuy nhiên chúng vẫn có những đặc tính chung của

các TI họ bầu bí. Cấu trúc vòng của MCoTI-I và -II là lần đầu tiên được phát hiện ở các TI thuộc họ bầu bí. Hơn nữa, theo cách định vị của các cấu trúc trong phân tử, 2 TI này được đề nghị là các thành viên đầu tiên của một họ mới thuộc Knottin vòng [1].

III. KẾT LUẬN

Sử dụng các phương pháp điện di, sắc ký lọc gel, sắc ký trao đổi ion để nghiên cứu các TI của hạt gấc trong quá trình hình thành và phát triển của hạt, đã đi đến một số kết luận sau:

1. Sự biến đổi hàm lượng chất khô, protein tan trong môi trường axit của hạt tăng lên từ 15

ngày tuổi đến khoảng 60-65 ngày tuổi, sau đó thay đổi không nhiều. TIA (tính trên g chất khô) cũng tăng nhanh từ hạt 25 ngày tuổi cho đến ngày thứ 70 (52 IU/g CK), sau đó có xu hướng giảm, đến ngày thứ 140 lại tăng lên (49,2 IU/ g CK)

2. Phổ điện di TI cũng như phổ điện di protein của hạt non hơn 65 ngày tuổi có nhiều băng TI hơn các hạt già; ở hạt từ 70 ngày tuổi trở đi, số băng TI được phát hiện ít hơn nhiều so với các hạt non. Các TI phân tử thấp nhất và là TI chủ yếu của hạt chín đã có ở hạt 25 ngày tuổi.

3. Sắc ký qua cột Mono S, hệ thống FPLC đã tách được từ hạt 25 ngày tuổi các đỉnh TIA tương ứng với MCoTI-III của các hạt chín tuy nhiên khác nhau rõ rệt về tỷ lệ: ở hạt 25 ngày tuổi, đỉnh tương ứng với MCoTI-III (và dạng succinimide của MCoTI-II của hạt chín) chiếm ưu thế. Ngoài ra, ở hạt 25 ngày tuổi, không phát hiện được đỉnh nào tương ứng với MCoTI-I của hạt chín.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Annie Heitz et al., 2001: Biochemistry, 40: 7973-7983.
- Hanspal J. S., Bushell G. I., Ghosh P., 1983: Anal. Biochem, 132: 288-292.
- Heussen. C., Dowdle E. B., 1980: Analyt Biochem., 102: 196- 202.
- Jean- Francois Hernandez et al., 2000: Biochemistry, 39: 5722-5730.
- Leammli U. K., 1970: Nature, 277: 680-685.
- Lowry O. H et al., 1951: J. Biol. Chem. 193: 265-270.
- Phạm Trần Châu, 1986: Biochem. Physiol Pflanzet, 181: 565-569
- Phạm Trần Châu, J. Leluk, 1987: Tạp chí Sinh học, 9(1): 1-7.
- Phạm Thị Tran Chau, 1987: Trypsin inhibitors of white bush (*Cucurbita pepo* var. *Patissonina*) fruits and seeds. Publishing House: Univ. of Wroclaw: 110 pages
- Phạm Thị Trần Châu và cs., 2000: Tạp chí Khoa học, ĐHQG Hà Nội, XVI(1): 1-11.
- Phan Thị Hà, Phạm Thị Trần Châu 2000: Tạp chí Sinh học, 22(3): 31-37.
- Pham Tuan Nghia, Pham Tran Chau 1990: Proceeding of the National center of Scientific Research of Vietnam, 2: 129-135.
- Pietrova J. S., Wincjunajte M. M., 1960: Priklad. Biochem. Mikrobiol. 2: 232 (Russian).
- Quyên N. H. M. and Pham Tran Chau 1994: Proceedings of the 11th FAO/IBP Symposium 15-18/11/1994. Biopolymers and Bioproducts: Structure, Functions and Applications: 399-405. Samakkhis (dokya) Public Company Limited 1995.
- N. H. M. Quyên và cs., 1997: Tạp chí Khoa học, ĐHQG Hà Nội, XIII: 20-27.

STUDY ON THE CHANGE OF TRYPSIN INHIBITORS (TI) IN THE SEEDS OF MOMORDICA COCHINCHINENSIS DURING THEIR FORMATION AND DEVELOPMENT

NGUYEN QUYNH UYEN et al.

SUMMARY

Using PAGE, column chromatography to study the qualitative and quantitative changes in TIs from developing seeds of *Momordica cochinchinensis* showed that:

1. The change in dry substances and proteins increased from day 15 after the flowering (aff.) to day 65 and then slightly decreased.

TIA (per dry substances) of the seeds also quickly increased from day 15 aff., to day 70 aff. (52 IU/g dry substances), then changed to lower level but at day 140 aff., it reached to 49,2 IU/g dry substances.

2. Electrophoretic patterns of TIs from the younger than 65 days aff. seeds showed much more bands than those of the over 70 days aff. seeds. The major TIs of the lowest Mr in the mature seeds were also discovered in the 25th day seeds.

3. Using chromatography method on sephadex G-75 and Mono S column to fractionate TIs from the seeds indicated that: in the 25th day seed extract there exist the TIA peaks named e, f corresponding to the MCoTI_II and MCoTI_III of the mature seeds. However, in the young seeds, peak f was the major one while in mature seeds MCoTI_III was the minor TI as compared with MCoTI_II. Moreover, no TIA peak corresponded to MCoTI_I was found in young seeds.

Ngày nhận bài: 17-8-2001

CHỌN TẠO CÁC DÒNG THUẦN ƯU TÚ TỪ CÁC DÒNG LÚA ƯU THỂ LAI BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY BAO PHẦN

PHẦN 1: NUÔI CẤY BAO PHẦN CỦA CÁC DÒNG LÚA ƯU THỂ LAI

NGHIÊM NHU VÂN, LÊ XUÂN ĐẮC,
LÊ TRẦN BÌNH, LÊ THỊ MUỘI

Viện Công nghệ sinh học

Tạo ra các giống lúa thuần mới có các đặc tính nông, sinh học và kinh tế tốt hơn so với các giống đã được phổ biến trong sản xuất là nhiệm vụ của công tác chọn giống mà trong đó lai giống rất thường được sử dụng và nó có ý nghĩa như là một phương pháp tạo ra vật liệu khởi đầu cho chọn giống.

Kết quả của lai là tạo ra cây lai F1 có chứa vật chất di truyền của cả hai giống bố mẹ mà bao phần của chúng là nguyên liệu rất tốt cho chọn giống vì có chứa một quần thể các tiểu bào tử rất đa dạng và phong phú về kiểu gen. Trong số đó, có các tiểu bào tử kết hợp được các đặc điểm tốt bổ sung của cả hai giống bố mẹ. Khi áp dụng kỹ thuật nuôi cấy bao phần vào giai đoạn này để gây phát sinh hình thái ở các tế bào phần đơn bội và nhân đôi số lượng nhiễm sắc thể ở các cây đơn bội tái sinh, sẽ lập tức nhận được các cây lưỡng bội đồng hợp tử. Trên cơ sở quần thể các dòng đồng hợp tử phong phú và đa dạng về kiểu gen đó, có thể tiến hành đánh giá chọn lọc ra các dòng thuần ưu tú có năng suất cao, chất lượng tốt, có khả năng chịu bệnh để đưa vào thực tiễn sản xuất. Chính vì những ưu điểm của phương pháp nuôi cấy bao phần, hiện nay các nhà nghiên cứu chọn giống [1-5] đang cố gắng sử dụng kết hợp kỹ thuật này để rút ngắn thời gian và làm giảm công sức trong quá trình chọn giống.

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu nuôi cấy bao phần của một số dòng lúa ưu thế lai hiện đang dùng trong sản xuất và F1 của một số tổ hợp lai nhằm mục đích nhanh chóng tạo ra các dòng thuần đa dạng và phong phú về kiểu gen. Trên cơ sở đó chọn ra các dòng thuần mong muốn và các dòng thuần ưu tú có năng

suất và tính chống chịu có thể kém hơn các dòng ưu thế lai ban đầu đôi chút nhưng bỏ qua được khâu phải sản xuất hạt giống lai hàng năm.

I. PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

1. Nguyên liệu

Nguyên liệu sử dụng để nuôi cấy bao phần gồm có bốn dòng ưu thế lai đang được dùng trong sản xuất là VL902, Sán ưu 63, Sán ưu 99, Chi ưu hương; hai dòng lai nhân bằng tính Dt,C và Dt,T; F1 của hai tổ hợp lai (Te. CR203), (BoA x CR203) và một dòng bất thụ tế bào chất IR62829A.

2. Phương pháp

a) Thu và xử lý dòng

Đã thu thập các dòng lúa có khoảng 5-6 bông giữa tai lá đòng và tai lá thứ nhất từ 1-5 bông. Đòng được lấy vào buổi sáng (từ 8-10 giờ) cắm vào bình nước (nếu cấy ngay) hoặc trong các túi polyetylen rồi cắm trong bình nước và đặt trong tủ lạnh. Thời gian xử lý lạnh từ ngày ở 6-8°C.

b) Khử trùng đòng và tách bao phần để cấy

Dùng bông có tấm côn 96° lau kỹ toàn bộ mặt đòng, tách bỏ các lớp bẹ lá bên ngoài và vỏ lụa bên trong. Dùng kéo cắt bỏ các phần đòng quá già hoặc quá non, chỉ lấy các bông chứa hạt phần ở giai đoạn đơn nhân. Tách phần cấy vào các ống nghiệm nhỏ kích thước 1,5 x 20 cm có chứa môi trường đặt nghiêng. Môi trường tạo mô sẹo là N₆ cơ bản có bổ sung 2 mg/l 2,4-D, 60 g/l đường saccaroza. 1 trong tối ở nhiệt độ 26° ± 2°C.

c) Tái sinh cây và tách dòng cây tái sinh

Sau 4-5 tuần nuôi cấy, từ một số bao phần xuất hiện các khối mô sẹo màu trắng, nhỏ ly ty. Khi các khối mô sẹo đạt đường kính chừng 1-2 mm, chúng được cấy chuyển sang môi trường tạo cây. Môi trường tạo cây cũng là N₆ nhưng hàm lượng đường saccarosa giảm xuống còn 30 g/l, các chất điều hoà sinh trưởng là IAA 0,5 mg/l và kinetin 2 mg/l. Nuôi dưới ánh sáng đèn huỳnh quang cường độ 2000 lux, nhiệt độ 26±2°C. Các cụm chồi được hình thành sau 2-3 tuần nuôi, tách thành từng dòng riêng biệt dựa vào mức độ liên kết giữa các chồi trong cụm.

d) Nhân dòng cây tái sinh và tạo cây hoàn chỉnh

Để đảm bảo cho việc đưa thành công các dòng cây tái sinh ra trồng ngoài ruộng, đã tiến hành nhân vô tính thành khoảng 10-20 cụm chồi đối với mỗi dòng, sau đó cấy chồi sang môi

trường mới không có chất điều hoà sinh trưởng để cho ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của xử lý lạnh lên khả năng tạo mô sẹo từ phần

Trong nuôi cấy bao phần, có nhiều yếu tố gây ảnh hưởng lên khả năng hình thành mô sẹo như kiểu gien của cây cho phần, thành phần môi trường dinh dưỡng, thành phần và nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng, nồng độ đường, điều kiện nuôi cấy,... trong đó xử lý lạnh cũng là một yếu tố đáng chú ý.

Trước khi đưa các bao phần vào nuôi cấy, chúng tôi đã tiến hành xử lý ở nhiệt độ 6-8°C để xác định thời gian tối ưu cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao đối với từng dòng lai, đối chứng là các bao phần được cấy ngay không qua xử lý.

Bảng 1

Ảnh hưởng của thời gian xử lý lạnh (6-8°C) lên tỷ lệ tạo mô sẹo từ phần

Tên dòng lai	Số bao phần cấy	Tỷ lệ mô sẹo hình thành từ bao phần xử lý lạnh (%) Thời gian xử lý (ngày)						
		ĐC	1	2	3	4	5	6
Sán ưu 63	12.581	3,44	2,99	2,24	0,34	1,14	-	-
Sán ưu quế 99	16.084	0,84	1,42	2,09	2,52	2,33	-	-
Dt ₁ T	6.111	1,74	1,48	1,58	-	2,07	-	-
BoA x CR203	8.254	1,37	2,51	0,32	0,42	0,40	0,35	0,11

Kết quả trình bày trên bảng 1 cho thấy nhìn chung các bao phần sau khi được xử lý lạnh đã hình thành mô sẹo với tỷ lệ cao hơn so với các bao phần không qua xử lý. Tỷ lệ tạo mô sẹo cao hơn cả ở các bao phần được xử lý trong vòng 1-4 ngày, tùy theo từng dòng lai, cụ thể: tỷ lệ tạo mô sẹo đạt cao nhất ở Sán ưu quế 99 là sau 3 ngày (tỷ lệ là 2,52%, cao gấp khoảng 4 lần so với đối chứng); ở Dt₁T là sau 4 ngày (tỷ lệ là 2,07% và cao hơn đối chứng); ở F1 của (BoA x CR203) là sau 1 ngày (tỷ lệ là 2,51% và cao gấp gần 2 lần so với đối chứng). Trong khi đó, riêng Sán ưu 63 tỷ lệ cao nhất lại là ở bao phần không qua xử lý lạnh (tỷ lệ là 3,44% và cao hơn so với

các lô có xử lý lạnh). Như vậy, hầu hết các dòng lúa thí nghiệm đều cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao khi các bao phần được xử lý lạnh, nhưng thời gian xử lý tối ưu ở các dòng khác nhau là khác nhau. Khi xử lý bao phần ở thời gian lâu hơn thì khả năng tạo mô sẹo giảm dần và tỷ lệ thấp nhất đã nhận được ở các bao phần sau 6 ngày xử lý. Sự giảm dần khả năng tạo mô sẹo sau khi đã đạt tỷ lệ tối đa có thể do nguyên nhân hạt phần bị giảm sức sống do giữ lâu trong tủ lạnh. Kết quả đó cũng cho thấy, nếu bảo quản bao phần như trong điều kiện của chúng tôi thì, để đạt được tỷ lệ tạo mô sẹo cao, chỉ nên dùng bao phần xử lý lạnh sau 1-4 ngày để nuôi cấy. Gosal và cs

(1996) cho biết khi xử lý lạnh ở nhiệt độ ôn hoà (10°C) lên bao phần trong 11 ngày đã nâng tỷ lệ tạo mô sẹo từ 12,5% (ở đối chứng) lên 32,8% [2]. Như vậy, kết quả chúng tôi nhận được phù hợp với kết quả của các tác giả trên về việc xử lý lạnh làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo ở hầu hết các giống lúa và các giống lúa khác nhau có khả năng chịu đựng nhiệt độ xử lý khác nhau.

2. Khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây ở các dòng lúa lai khác nhau

Để tìm hiểu khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây ở các dòng lai khác nhau, đã tiến hành nuôi cấy các bao phần không qua xử lý lạnh. Tính tỷ lệ tạo mô sẹo từ phần, tỷ lệ tạo cây (cả cây xanh và cây bạch tạng) từ mô sẹo và tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh.

Bảng 2

Khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây ở các dòng lúa lai khác nhau

Thứ tự	Tên dòng lai	Số bao phần cây tạo mô sẹo	Tỷ lệ bao phần tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mô sẹo tái sinh cây xanh và bạch tạng (%)	Tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh (%)
1	VL902	2.737	1,46	15,0	16,7
2	Sán ưu 63	320	3,44	45,5	80,0
3	Sán ưu quê 99	3.695	0,84	29,0	55,6
4	Dt, T	1.549	1,74	18,5	60,0
5	BoA x CR203	802	1,37	9,1	0,0

Ghi chú:

$$\text{Tỷ lệ bao phần tạo mô sẹo} = \frac{\text{Số mô sẹo tạo được}}{\text{Số bao phần cấy}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ tái sinh cây (xanh và bạch tạng)} = \frac{\text{Số mô sẹo tái sinh cây}}{\text{Số mô sẹo cấy}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ tái sinh cây xanh} = \frac{\text{Số mô sẹo tái sinh cây xanh}}{\text{Số mô sẹo tái sinh cây}} \times 100$$

Kết quả nhận được ở bảng 2 cho thấy khả năng tạo mô sẹo của các dòng lai khác nhau là khác nhau và thay đổi từ 0,84-3,44%. Tỷ lệ tạo mô sẹo cao hơn cả ở Sán ưu 63 (3,44%) và thấp nhất ở Sán ưu quê 99 (0,84%). Khả năng tái sinh cây từ mô sẹo của các dòng lai nói trên cũng khác nhau và thay đổi từ 9,1-45,5%: thấp nhất ở F1 của tổ hợp BoA x CR203 (9,1%) và cao hơn cả ở Sán ưu 63 (45,5%). Tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh cũng rất khác nhau: Sán ưu 63 cho tỷ lệ cây xanh rất cao (80%), trong khi đó ở (BoA x CR203) các cây tái sinh đều bị bạch tạng. Kết quả đó cho thấy kiểu gen có ảnh hưởng rất nhiều lên khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây xanh trong nuôi cấy bao phần.

3. Ảnh hưởng của xử lý lạnh lên tỷ lệ tái sinh cây xanh

Khi nuôi cấy bao phần, đã nhận được cả cây xanh và cây bạch tạng, trong khi đó chỉ sử dụng được các cây xanh trong thực tiễn chọn giống. Việc xử lý lạnh các bao phần trước khi nuôi cấy nhằm làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo, nghĩa là làm tăng khả năng nhận cây tái sinh, nhưng nhiệt độ thấp có ảnh hưởng tới chất lượng của mô sẹo được hình thành hay không? (tỷ lệ tái sinh cây từ mô sẹo có tăng lên không và tỷ lệ cây xanh cao hơn ở mô sẹo không qua xử lý hay không?).

Để tìm hiểu vấn đề này, chúng tôi đã tính

lệ cây xanh tái sinh từ phần xử lý lạnh với thời gian khác nhau (từ 1-4 ngày). Kết quả nhận được cho thấy, trừ Sán ưu quế 99, còn ở tất cả các dòng lai dùng trong thí nghiệm đều thấy cùng một hiện tượng là mô sẹo được tạo thành từ phần không qua xử lý đã tái sinh cây xanh với tỷ lệ cao hơn cả (từ 43,8-80,0%). Trong khi đó, ở mô sẹo từ bao phần xử lý lạnh, tỷ lệ cây xanh bị giảm đi rõ rệt (chỉ bằng một nửa hoặc một phần ba so với đối chứng). Đồng thời kết quả này cũng cho thấy không có quy luật rõ rệt nào về tỷ lệ cây xanh từ phần xử lý lạnh với thời gian khác nhau (trong vòng 1-4 ngày). Các mô sẹo nhận từ phần xử lý lạnh với thời gian khác nhau đã cho tỷ lệ cây xanh gần như nhau, điều này gợi cho chúng tôi ý nghĩ rằng có lẽ chính

sốc lạnh mới ảnh hưởng tới phẩm chất của mô sẹo hình thành, làm giảm khả năng phân hóa cây xanh chứ không do thời gian xử lý dài hay ngắn. Một bằng chứng nữa cũng cố cho ý nghĩ này, đó là khi phân biệt một cách chi tiết màu sắc của các cụm cây tái sinh trên cùng một khối mô, đã thấy hầu như tất cả các khối mô được cấy hoặc tạo toàn cây xanh hoặc tạo toàn cây bạch tạng. Chỉ có trường hợp ở Dt₁C, có 2 trên tổng số 111 khối mô sẹo (1,8%) đã phân hóa cả chồi xanh và chồi bạch tạng trên cùng một khối mô. Như vậy, trong quá trình phân hóa cơ quan, đột biến bạch tạng có thể xảy ra nhưng với tỷ lệ rất thấp, vậy rõ ràng sốc lạnh đã ảnh hưởng tới phẩm chất của hạt phấn, làm tăng tỷ lệ mô sẹo tạo cây bạch tạng.

Bảng 3

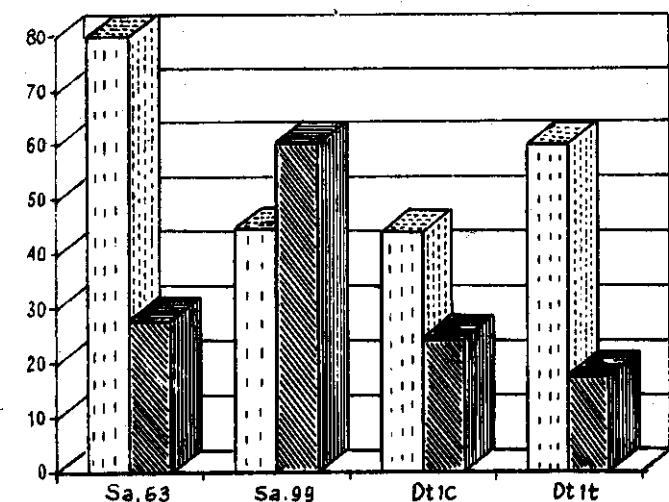
Ảnh hưởng của xử lý lạnh bao phần lên tỷ lệ tái sinh cây xanh

Tên dòng lai	Số mô sẹo có tái sinh cây	Tỷ lệ tái sinh cây xanh (%) từ mô sẹo nhận từ xử lý lạnh bao phần ở nhiệt độ 6-8°C theo thời gian (ngày)					
		ĐC	1	2	3	4	Trung bình*
Sán ưu 63	195	80,0	26,0	28,6	28,6	27,7	27,7
Sán ưu quế 99	105	44,4	100,0	60,3	25,0	55,8	60,3
Dt ₁ C	290	43,8	21,4	21,7	25,0	30,0	24,5
Dt ₁ T	103	60,0	33,3	20,0	17,8	0,0	17,7

Ghi chú: Tỷ lệ tái sinh cây xanh trung bình ở mô sẹo nhận từ phần xử lý lạnh trong thời gian 1-4 ngày

Từ các kết quả nêu trên, cho thấy việc xử lý lạnh tuy có tác dụng làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo song đồng thời lại làm giảm tỷ lệ phân hóa cây xanh. Hình cho thấy, trong đa số trường hợp (3/4 dòng lai), các bao phần không qua xử lý

lạnh đã cho khả năng tái sinh cây xanh cao gấp 2-3 lần so với khi có xử lý. Vì vậy, khi tiến hành nuôi cấy bao phần, trong từng trường hợp cụ thể, cần cân nhắc đến hiệu quả của việc xử lý lạnh.



Hình. Ảnh hưởng của xử lý lạnh bao phần lên tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh

Ghi chú: ĐC: đối chứng, TN: thí nghiệm; trục X: tên các dòng lai; trục Y: tỷ lệ cây xanh



4. Kết quả tạo mô sẹo và tái sinh cây xanh từ nuôi cấy bao phấn các dòng lúa lai khác nhau

Để nhận các dòng lưỡng bội đồng hợp tử phong phú và đa dạng về kiểu gen, chúng tôi tiến hành nuôi cấy bao phấn các dòng ưu thế lai hiện đang dùng trong sản xuất, các con lai F1 ở một số tổ hợp lai (bảng 4).

Bảng

Kết quả tạo mô sẹo và tái sinh cây xanh từ nuôi cấy bao phấn các dòng lúa lai

Thứ tự	Tên dòng lai	Thể hệ	Số bao phấn cấy tạo mô sẹo	Số mô sẹo cấy tạo cây	Số dòng cây xanh nhận được
1	VL902	F1	2.737	40	5
2	Sán ưu 63	F1	12.581	195	67
3	Sán ưu quê 99	F1	16.084	294	197
4	Chi ưu hương	F1	11.297	146	30
5	Dt ₁ C	F1	10.896	301	114
6	Dt ₁ T	F1	6.111	97	20
7	TeA x CR203	F1	11.669	309	0
8	BoA x CR203	F1	8.254	33	0
9	IR62829A	CMS	3.041	13	0
Tổng cộng:			82.670	1.428	433

Đã nuôi cấy 82.670 bao phấn của các dòng lai để tạo mô sẹo, đã cấy 1.428 khối mô sẹo sang môi trường tái sinh cây và đã thu được 433 dòng cây xanh từ phần. Các dòng này hiện đang được duy trì và nhân trong điều kiện in vitro để vụ tới đưa ra trồng trong các chậu đất và thu hạt dùng cho việc phân tích di truyền, đánh giá các đặc điểm nông sinh học, các yếu tố cấu thành năng suất và chọn ra các dòng thuần ưu tú có năng suất cao, chất lượng tốt và chịu bệnh có thể đưa vào sản xuất.

III. KẾT LUẬN

1. Việc đưa các bao phấn vào xử lý ở nhiệt độ 6-8°C trước khi nuôi cấy, trong đa số trường hợp, đã làm tăng rõ rệt tỷ lệ tạo mô sẹo lên 2-3 lần so với đối chứng. Tùy theo từng dòng, thời gian xử lý có hiệu quả là trong khoảng từ 1-4 ngày. Khi thời gian xử lý dài hơn thì tỷ lệ tạo mô sẹo giảm.

2. Các dòng lai khác nhau cho khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây khác nhau, tỷ lệ tạo mô

sẹo từ 0,84-3,44%, tỷ lệ tái sinh cây (xanh bạch tạng) từ 9,1-45,4%, tỷ lệ cây xanh từ quần thể cây tái sinh từ 0-80%.

3. Việc xử lý lạnh các bao phấn trước cấy có ảnh hưởng tới phẩm chất của mô sẹo hình thành, tỷ lệ tái sinh cây xanh ở mô sẹo từ phần không xử lý lạnh cao gấp 2-3 so với ở mô từ phần xử lý lạnh. Vậy sốc lạnh chính là nguyên nhân làm giảm tỷ lệ tái sinh xanh.

4. Đã nuôi cấy 82.670 bao phấn của dòng lai khác nhau để tạo mô sẹo. Đã tái sinh cây và tách được 433 dòng cây xanh tái sinh từ các dòng cây này hiện đang được nhân và đưa trồng để thu hạt dùng trong việc đánh giá, chọn lọc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bong BB and Swaminathan MS., 1 Variation in some quantitative characters of doubled haploid lines derived from

heterotic rice hybrid. In "Rice Genetics III". Proceedings of the third International Rice Genetics Symposium, IRRI, Philippines, Edited by G.S. Khush: 499-504.

2. **Gosal et al.**, 1996: Haploidy in rice. In "In vitro Haploid Production in higher plants". Edited by S. Mohan Jain, S. K. Sopory, R. E. Veilleux: 1-35.

3. **Moon HP. et al.**, 1996: Genetic variation of a single pollen-derived doubled haploid population in rice. In "Rice Genetics III" Proceedings of the third International Rice Genetics Symposium, IRRI, Phillipines,

Edited by G.S. Khush: 491-498.

4. **Raina S. K. et al.**, 1996. Haploid, somaclone and transformation studies in basmati rice. In "Rice Genetics III" Proceedings of the third International Rice Genetics Symposium, IRRI, Phillipines, Edited by GS. Khush: 487-491.

5. **Sanint L. R. et al.**, 1996: Anther culture as a rice breeding tool: a profitable investment. In "Rice genetics III" Proceedings of the third International Rice Genetics Symposium, IRRI, Philippines. Edited by G.S. Khush: 511-518.

PRODUCTION OF HOMOZYGOUS LINES BY ANTHER CULTURE OF HETEROSIS LINES OF RICE.

I. ANTHER CULTURE OF HETEROSIS LINES OF RICE

NGHIEM NHU VAN et al.

SUMMARY

Hybrid rices possess good genetic background, so their anthers are excellent breeding materials, in which the good complementary characteristics of two parents can be combined. In general, the production of desirable dihaploid plants by anther culture is the way of shortening the conventional breeding cycle.

Anthers of eight hybrid lines of rice were culture on N6 medium supplemented with 2.4 D (2 mg/l) to produce callus. The frequency of the callus induction was distinctly higher when the anthers were cold-treated at 6-8°C for 1-4 days. After 3-4 weeks, on the callus induction medium, calli were appeared and then they were lifted out of the anthers and placed on the plant regeneration medium. The plant regeneration frequency and the percentage of green plantlets were differed in different hybrid lines: the range of the regeneration frequency (green and albino plants) among the hybrids was from 9.1 to 45.5 % and Shanyou 63 had the highest frequency of the green plant regeneration (80%). The cold shock also affected the callus quality: the frequency of the regeneration of green plants was decreased 2-3 times in the calli derived from cold-treated anthers.

433 regenerated plant lines were obtained and were grown for grains using for the following evaluation and the selection.

Ngày nhận bài: 1-4-2000

KHẢ NĂNG QUANG HỢP VÀ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY TRANG (*Kandelia candel* (L.) Druce) TRỒNG Ở CÁC MÔI TRƯỜNG THÍ NGHIỆM CÓ ĐỘ MẶN KHÁC NHAU

TRẦN THỊ PHƯƠNG, MAI SỸ TUẤN

Trường đại học Sư phạm Hà Nội

Trang (*Kandelia candel* (L.) Druce) là một trong những loài cây được chọn trồng phổ biến ở vùng rừng ngập mặn ven biển nước ta, nhằm khôi phục lại những diện tích rừng bị phá huỷ, bảo vệ bờ biển, chống xói lở vỡ đê. Một trong số các nhân tố sinh thái có ý nghĩa đặc biệt quan trọng đối với loài cây này là độ mặn của môi trường sống. A. Werner, R. Stelezer (1990) cho thấy, mặc dù sống trong điều kiện mặn, nhưng khi dung dịch trồng cây chứa lượng NaCl nhiều tương ứng với độ mặn nước biển đã hạn chế khả năng sinh trưởng của cây. Mặt khác, độ mặn thấp (25% độ mặn nước biển - tương đương 33‰ NaCl) là yếu tố cần thiết kích thích sự sinh trưởng của nhiều loài cây ngập mặn như *Rhizophora stylosa*. Để góp phần nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh thái của loài cây này, từ đó tìm hiểu các biện pháp kỹ thuật trồng và chăm sóc rừng trang hợp lý, chúng tôi thiết kế thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của các độ mặn đến khả năng quang hợp và sinh trưởng của cây trang.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thu hái trụ mầm để gieo trồng

Chúng tôi thu hái trụ mầm già, tươi của cây trang (*Kandelia candel*) ở rừng ngập mặn Thái Thụy, Thái Bình vào ngày 25/5/2000, chuyển về Hà Nội trồng trong các chậu nhựa chứa cát sạch vào ngày 29/5/2000. Để đảm bảo độ mặn trong môi trường trồng cây không đổi, cát trồng cây được rửa sạch nhiều lần nhằm loại bỏ mùn bã và chất hữu cơ. Mỗi chậu trồng 5 cây. Tất cả các chậu được đặt trong nhà trồng cây có mái che bằng polyetylen nhằm tránh mưa tại vườn thí nghiệm khoa Sinh - KTNN, trường đại học Sư

phạm Hà Nội, trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng tự nhiên. Các độ mặn trồng cây được thi kế là 0%, 25%, 50%, 75%, 100% độ mặn nước biển (tương đương với 33‰ NaCl) (Ảnh).

Các chậu cây trong thời gian đầu tưới bằng nước máy. Sau 3, 5 tuần, thay nước máy bằng dung dịch dinh dưỡng cơ bản và nước biển nh tạo do K. Kyuma và cộng sự (1989) đề xuất đã được áp dụng cho thực vật ngập mặn ở nhi nước.

2. Xác định hàm lượng sắc tố

Hàm lượng sắc tố được xác định th phương pháp của D.O. Hall và K. K. R (1999). Nghiền kỹ lá tươi với dung môi hữu tạo thành hỗn hợp đồng thể. Sau đó, dùng m bơm hút chân không PJ 1754-035 (của Đức) chiết dịch sắc tố, rồi đem so màu trên m quang phổ kế 722 (của Trung Quốc) ở các bu sóng 663 nm, 645 nm, 440,5 nm; Lấy các giá OD và tính toán hàm lượng diệp (chlorophyl) theo các công thức sau:

$$\text{Chl.a} = 12,7 \times \text{OD}_{663} - 2,69 \times \text{OD}_{64}$$

$$\text{Chl.b} = 2,29 \times \text{OD}_{645} - 4,68 \times \text{OD}_{663}$$

$$\text{Car.} = 4,695 \times \text{OD}_{440,5} - 0,268(\text{Chl.a} + \text{Chl.b}) \quad (\text{mg})$$

Tiến hành xác định hàm lượng sắc tố của cây ở 5 độ mặn môi trường khác nhau: 0, 25%, 50%, 75% và 100% độ mặn nước biển.

3. Đo cường độ quang hợp

Sử dụng máy phân tích khí (LCA- 4 của hãng ADC- Anh) để đo cường độ quang hợp thuận (Pn) ở cặp lá thứ 3 (đếm từ ngọn xuống gốc). Cường độ quang hợp thuận được xác định th qua hiệu số nồng độ CO₂ giữa đi



Ảnh. Cây trang (*Kandelia candel*) trồng ở các độ mặn thí nghiệm

không khí đi vào và đi ra của buồng đồng hoá. Buồng đồng hoá bao phủ 6,25 cm² diện tích lá. Đọc kết quả sau 20 giây đóng kín buồng đồng hoá và việc đo đạt tới trạng thái ổn định. Thí nghiệm tiến hành trong 3 giờ (từ 9 giờ đến 12 giờ) trong ngày ở điều kiện ánh sáng tự nhiên, cường độ 700-800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, nhiệt độ không khí trung bình 28,5-30°C. Ở mỗi lần đo tiến hành lặp lại 3 lần ở tất cả các độ mặn khác nhau và tính các giá trị trung bình. Đo cường độ quang hợp của cây ở 5 độ mặn thí nghiệm trên.

4. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu sinh trưởng

a) Tăng trưởng chiều cao, đường kính

Đo đường kính thân ở đốt thứ nhất; chiều cao cây đo từ đốt thứ nhất tới ngọn mỗi tháng một lần. Tính độ tăng trưởng chiều cao (Δ_H) và đường kính (Δ_D) cây trang từng tháng theo công thức: $\Delta_H = H_{n+1} - H_n$; $\Delta D = D_{n+1} - D_n$ (H_n : chiều cao đo được ở lần thứ n; H_{n+1} : chiều cao đo được ở lần thứ n+1; D_n : đường kính đo được ở lần thứ n; D_{n+1} : đường kính đo được ở lần thứ n+1).

b) Số lượng và diện tích lá

Mỗi tháng 1 lần đếm số lượng lá trên cây, số lượng lá rụng (bằng cách đếm vết lá rụng trên thân cây) và đo chiều cao, đường kính cây thí nghiệm. Tính số lượng lá sinh ra đến thời điểm nghiên cứu bằng cách đếm tổng số lá trên cây cộng với tổng số lá rụng. Sau 12 tháng trồng, chúng tôi tiến hành đo và tính diện tích lá trung bình của một cây và diện tích trung bình của 1 lá.

II. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

1. Hàm lượng sắc tố và cường độ quang hợp

a) Hàm lượng sắc tố

Sắc tố của thực vật nói chung và thực vật ngập mặn nói riêng có ý nghĩa hết sức quan trọng trong quá trình quang hợp của cây xanh. Nhóm sắc tố quan trọng nhất là diệp lục (chlorophyll). Trong cấu trúc diệp lục, có ion Mg^{2+} . Để tìm hiểu ảnh hưởng của các mức độ mặn khác nhau đến hàm lượng sắc tố ở lá cây trang, chúng tôi đã tiến hành phân tích hàm lượng diệp lục của cây thí nghiệm.

Kết quả thí nghiệm cho thấy hàm lượng diệp

lục a,b (bảng 1) đạt giá trị cao nhất ở 25% độ mặn nước biển (2,477 mg/dm²lá và 0,920 mg/dm²lá). Ở 0% độ mặn nước biển, hàm lượng diệp lục a,b là thấp nhất (1,925 mg/dm²lá và 0,670 mg/dm²lá). Hàm lượng diệp lục a giảm 0,431 mg/dm²lá khi độ mặn môi trường tăng từ 25% đến 100% độ mặn nước biển. Cây sống ở môi trường có độ mặn cao thì nồng độ ion Na⁺ và Cl⁻ tích lũy trong lá cây lớn và có thể chúng đã gây lên sự phá vỡ cấu trúc diệp lục. Mặt khác khi cây hấp thu và tích lũy Na⁺ và Cl⁻ cao thì khả năng hấp thu K⁺ và Mg²⁺ giảm sút nên quá trình sinh tổng hợp diệp lục bị hạn chế. Theo M.

S. Tuấn (1995) cây sinh trưởng ở môi trường có độ mặn cao thường tích lũy trong dịch tế bào một hàm lượng cao các ion có nhiều trong nước mặn (Cl⁻, Na⁺, SO₄²⁻), nhất là tế bào lá. Ở những cây này, hàm lượng diệp lục trong lá cây thường giảm so với lá cây sống nơi độ mặn thấp, có thể là do diệp lục đã bị phân huỷ do ảnh hưởng của các ion đó. Tuy nhiên, mức độ suy giảm diệp lục còn tùy thuộc vào từng loài cây và khả năng chịu mặn của cây. Những loài cây có khả năng chịu mặn kém, khi sống trong điều kiện ngập mặn cao, hàm lượng diệp lục giảm nhiều hơn so với những loài cây có khả năng chịu mặn cao

Bảng 1

Hàm lượng sắc tố trong lá cây trang (*Kandelia candel*) sau 12 tháng sinh trưởng ở các độ mặn thí nghiệm

Mẫu xác định độ mặn nước biển (%)	Lần đo	Hàm lượng sắc tố (mg/dm ² lá)					
		Diệp lục a		Diệp lục b		Carotenoit	
		Các giá trị	Trung bình	Các giá trị	Trung bình	Các giá trị	Trung bình
0	1	1,888		0,616		0,934	
	2	2,006	1,925±0,070	0,795	0,670±0,108	0,930	0,943±0,019
	3	1,882		0,601		0,965	
25	1	2,413		1,442		0,722	
	2	2,427	2,477 ±0,092	0,550	0,920±0,465	0,939	0,967±0,261
	3	2,583		0,768		1,242	
50	1	2,642		0,897		1,130	
	2	2,432	2,530±0,106	0,769	0,847±0,065	1,142	1,170±0,039
	3	2,515		0,813		1,238	
75	1	2,070		0,915		1,053	
	2	1,865	2,157 ±0,029	0,769	0,832±0,075	1,303	1,198±0,130
	3	2,536		0,813		1,240	
100	1	1,856		0,581		1,273	
	2	2,210	2,046 ±0,178	0,806	0,730±0,129	1,233	1,229±0,04
	3	2,071		0,802		1,181	

b) Cường độ quang hợp

Từ kết quả thí nghiệm (bảng 2), chúng tôi nhận thấy cường độ quang hợp của trang kh nhau rất rõ ở các độ mặn thí nghiệm.

Cường độ quang hợp của trang (*Kandelia candel*) ở các độ mặn thí nghiệm

	Cường độ quang hợp của cây trang ($\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$)				
	0%	25%	50%	75%	100%
Lần 1	4,42	6,47	5,17	3,96	3,44
	4,58	6,70	5,00	3,87	3,47
	4,33	6,57	5,11	3,84	3,55
	4,12	6,27	5,22	3,76	3,43
	4,28	6,08	5,20	3,79	3,32
Lần 2	4,33	6,88	5,19	3,74	3,34
	4,42	6,60	5,27	3,86	3,43
	4,39	6,43	5,12	4,02	3,37
	4,23	6,37	5,08	3,81	3,64
	4,31	6,31	5,14	3,90	3,52
Lần 3	4,37	6,42	5,48	3,78	3,14
	4,15	6,67	5,43	4,22	3,26
	4,09	6,88	5,67	3,94	3,32
	4,68	6,52	5,39	4,17	3,31
	4,64	6,49	5,28	4,92	3,30
Trung bình	4,36	6,51	5,25	3,97	3,39

Cường độ quang hợp đạt giá trị cao nhất là $6,51\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ở 25% độ mặn nước biển và thấp nhất $3,39\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ở 100% độ mặn nước biển. Ở các độ mặn 0%, 50%, 75%, kết quả theo thứ tự là $4,36\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, $5,25\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, $3,97\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Cường độ quang hợp của cây giảm nhanh khi cây chuyển từ 25% độ mặn nước biển lên các độ mặn cao hơn (hình 1). Cường độ quang hợp giảm $3,12\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ khi tăng độ mặn từ 25% đến 100% ; giảm $1,26\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ khi tăng độ mặn từ 25% đến 50% độ mặn nước biển; giảm $1,28\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ khi từ 50% đến 75% độ mặn nước biển và giảm $0,58\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ khi từ 75% đến 100% độ mặn nước biển. Độ mặn môi trường cao đã ảnh hưởng đến quá trình quang hợp của cây trang.

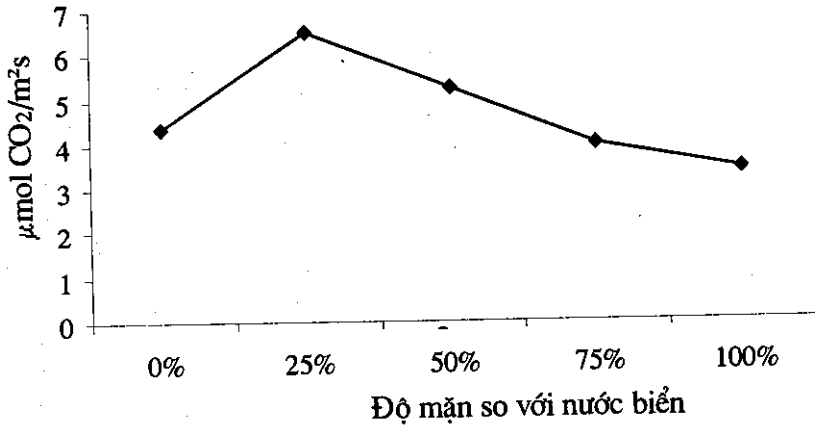
Nghiên cứu của Mai Sỹ Tuấn (1995) cho kết quả về khả năng quang hợp thuần của cây mắm

(*Avicennia marina*) bị tác động bởi nồng độ muối bên ngoài. Sự suy giảm khả năng quang hợp lại không tương ứng rõ với việc phá vỡ sự điều chỉnh áp suất thẩm thấu mà có thể liên quan tới nồng độ ion cao trong các lá. Theo I. Ninomiya và cs (1994), tỷ lệ quang hợp của cây đước dôi (*Rhizophora apiculata*) sống ở môi trường 100% độ mặn nước biển giảm 60% so với cây sống ở môi trường 25% độ mặn nước biển.

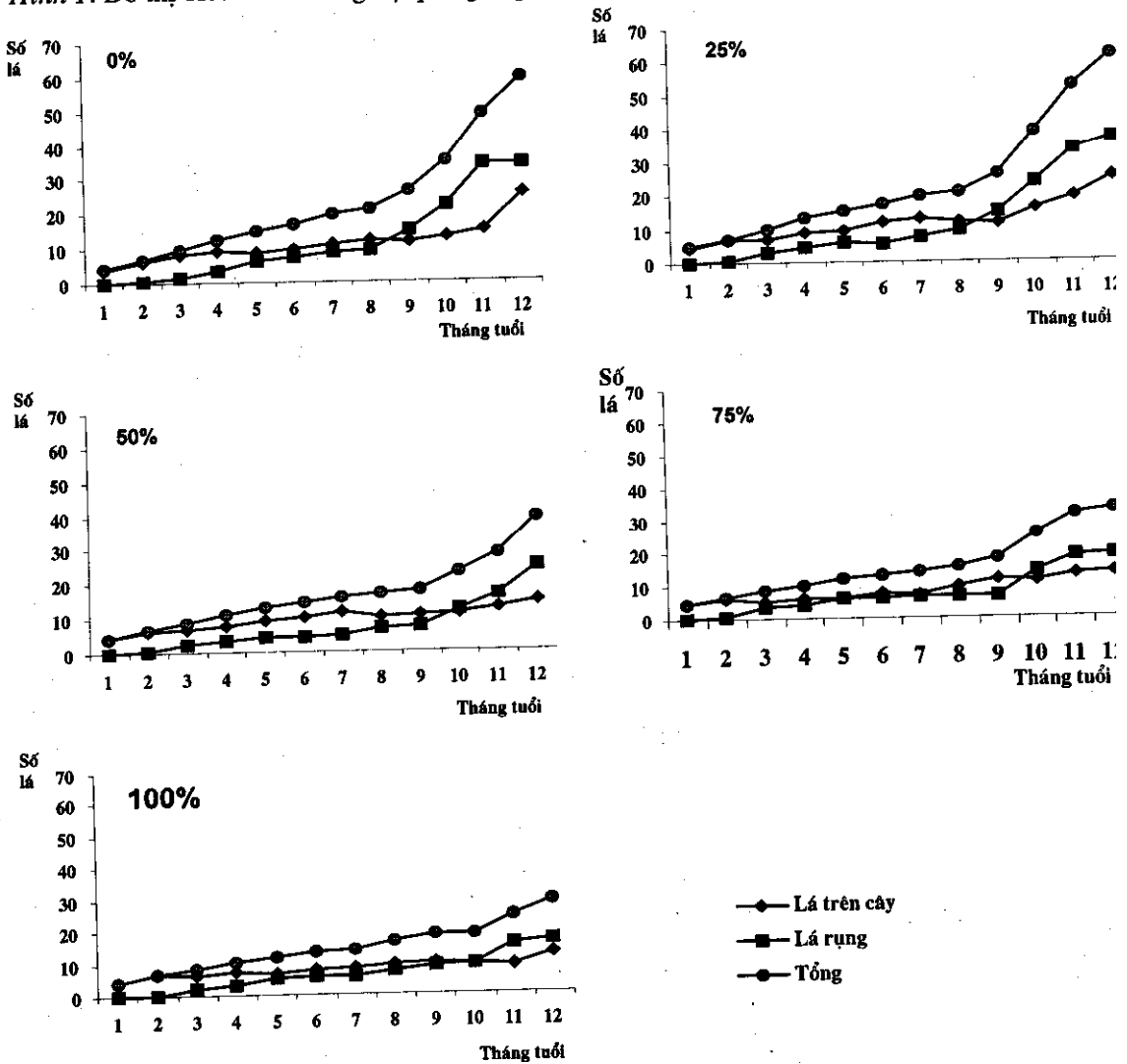
2. Số lượng lá, diện tích lá

a) Số lượng lá

Kết quả theo dõi (hình 2) cho thấy: Số lượng lá xuất hiện có sự khác nhau ở các độ mặn thí nghiệm. Cây trang có tốc độ sinh trưởng nhanh sau khi trồng 7 tháng, cây có sự phân cành. Số lá xuất hiện sau 12 tháng theo dõi ở các độ mặn khác nhau cũng khác nhau. Trung bình, ở 0% độ



Hình 1. Đồ thị biểu diễn cường độ quang hợp của trang (*Kandelia candel*) ở các độ mặn thí nghiệm



Hình 2. Số lượng lá trang (*Kandelia candel*) sau 12 tháng theo dõi ở các độ mặn thí nghiệm (0%, 25%, 50%, 75%, 100% độ mặn nước biển (tương đương 33‰ NaCl))

mặn có 59,28 lá/cây; ở 25% độ mặn có 61,63 lá/cây; ở 50% độ mặn có 38,75 lá/cây; ở 75% và 100% độ mặn nước biển là 32,83 lá/cây và 28,88 lá/cây.

Từ số liệu theo dõi, chúng tôi nhận thấy số lá xuất hiện lớn nhất ở 25% độ mặn nước biển (61,63 lá/cây). Số lá xuất hiện thấp nhất ở 100% độ mặn nước biển (28,88 lá/cây). Độ mặn càng cao số lá rụng càng nhiều. Tỷ lệ lá rụng cao nhất ở 100% độ mặn nước biển (64,05%), sau đến 0% độ mặn nước biển (62,23%) và thấp nhất ở 25% độ mặn nước biển (52,94%). Ở 50% và 75% độ mặn nước biển tỷ lệ lá rụng là 58,06% và 61,68%. Trong mỗi độ mặn thí nghiệm số lượng lá sinh ra trên 1 cây đều tăng trong quá trình sinh trưởng của cây. Tuy nhiên, tổng số lá sinh ra ở mỗi độ mặn thí nghiệm không giống nhau.

Độ mặn khác nhau của môi trường thí nghiệm đã ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây. Độ mặn cao cây sinh trưởng kém hơn, sự phân cành cũng ít hơn, vì thế mà số lá sinh ra cũng ít hơn so với cây sống ở độ mặn thấp.

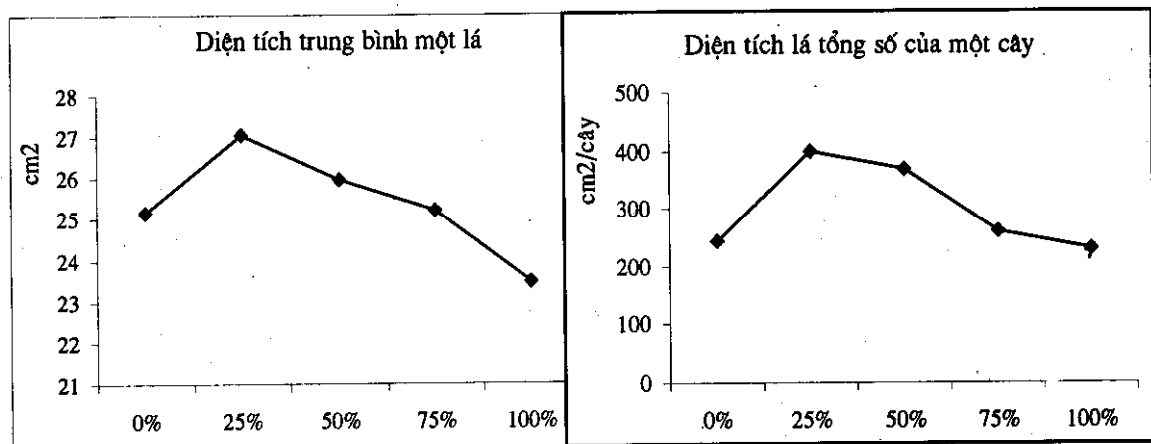
b) Diện tích lá

Diện tích trung bình của một lá và diện tích lá trung bình của một cây được trình bày ở hình 3. Từ kết quả theo dõi, chúng tôi nhận thấy diện tích trung bình của 1 lá có sự khác nhau ở các độ mặn thí nghiệm. Diện tích trung bình của 1 lá cao nhất ở 25% độ mặn nước biển (26,5 cm²/lá) và thấp nhất ở 100%. Diện tích lá trung bình của

một cây có sự khác nhau rõ giữa cây trồng ở 25% độ mặn nước biển với cây trồng ở các độ mặn khác. Diện tích lá trung bình của một cây đạt giá trị cao nhất ở 25% độ mặn nước biển (380cm²/cây), sau đến 50% độ mặn nước biển. Ở 0%, 75% độ mặn nước biển, diện tích lá trung bình của một cây khác nhau không đáng kể. Diện tích lá trung bình của 1 cây là thấp nhất ở 100% độ mặn nước biển (215cm²/cây).

Từ các kết quả thực nghiệm trên, chúng tôi có nhận xét: độ muối bên ngoài cao tác động mạnh đến quá trình sinh lý của cây như: gây ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp diệp lục, diệp lục bị phân huỷ mạnh, lá bị già hoá rụng nhiều, diện tích lá trên cây cũng giảm, hoạt động quang hợp bị ức chế. Kết quả là sinh trưởng của cây giảm. Như vậy, có thể khẳng định rằng sự suy giảm cường độ quang hợp đồng thời với sự suy giảm diện tích lá ở mỗi cây gắn liền với sự suy giảm sinh trưởng. Tuy nhiên, ở mỗi độ mặn khác nhau, theo thời gian thí nghiệm, cây đều có khả năng sinh trưởng liên tục.

Kết quả nghiên cứu tác động của muối đến sự sinh trưởng của trang phù hợp với công trình nghiên cứu của B. Clough (1984) đối với đước vôi: "sinh trưởng của cây cực thuận ở độ mặn môi trường ngoài là 25% độ mặn nước biển". S. Kuraishi và N. Bukurai (1985) cho rằng sự sinh trưởng của cây trang (*Kandelia candel*) bị kìm hãm ở độ mặn 1,7%. H. Kameya và cs (1996) cho rằng trang sinh trưởng tốt hơn ở nơi có độ mặn thấp hoặc ở những vùng nước lợ.

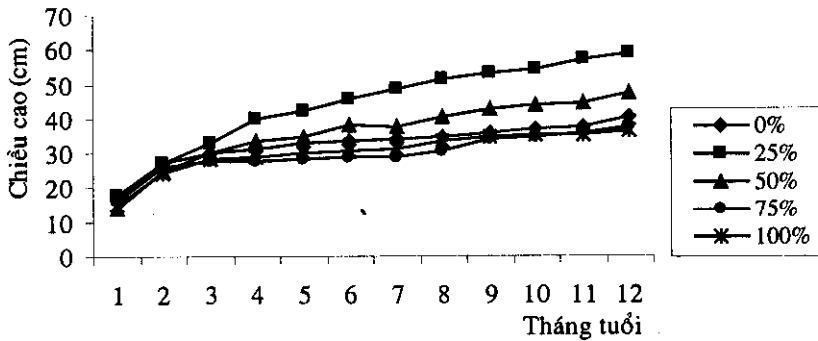


Hình 3. Diện tích trung bình của một lá và diện tích lá tổng số của một cây trang (*Kandelia candel*) sau 12 tháng theo dõi ở các độ mặn thí nghiệm

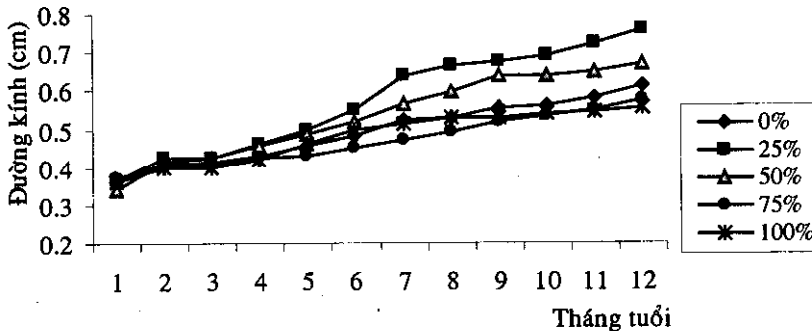
3. Sinh trưởng

Chiều cao, đường kính thân cây trang là lớn nhất ở 25% độ mặn nước biển. Sau 1 năm, cây có chiều cao thân là 58,81 cm và giảm dần với mức độ tăng độ mặn môi trường ngoài từ 25% tới 100% (hình 4, 5). Ở 100% độ mặn nước biển, cây có chiều cao thân là 35,31cm. Chiều cao, đường kính thân cũng tăng dần qua từng tháng theo dõi. Kết quả này thu được ở tất cả các độ mặn thí nghiệm. Tuy vậy, nếu xét riêng từng độ mặn thí nghiệm, chúng tôi thấy có những biến đổi rõ rệt. Ở 25% và 50% độ mặn nước biển, tốc độ tăng trưởng chiều cao và

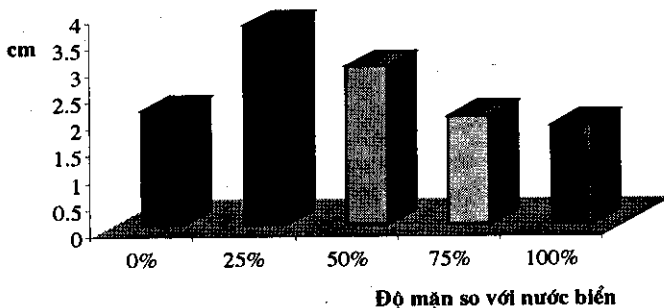
đường kính thân đạt cao nhất. Ở 100%, tốc độ tăng trưởng chiều cao, đường kính là thấp nhất (hình 6, 7). Tốc độ tăng trưởng của đường kính thân cây là chậm hơn so với tốc độ tăng trưởng của chiều cao cây. Tuy nhiên, sự tăng trưởng chiều cao và đường kính còn khác nhau giữa các tháng trong năm ở các độ mặn thí nghiệm và khác nhau này còn do 1 nguyên nhân khác, là nhiệt độ. Từ tháng 11 đến tháng 2, có các cơn gió mùa Đông Bắc, nhiệt độ thấp nên cây sinh trưởng chậm. Ngược lại, những tháng mùa hè nhiệt độ cao hơn, nên thuận lợi cho sự sinh trưởng của cây, tốc độ tăng trưởng cao hơn.



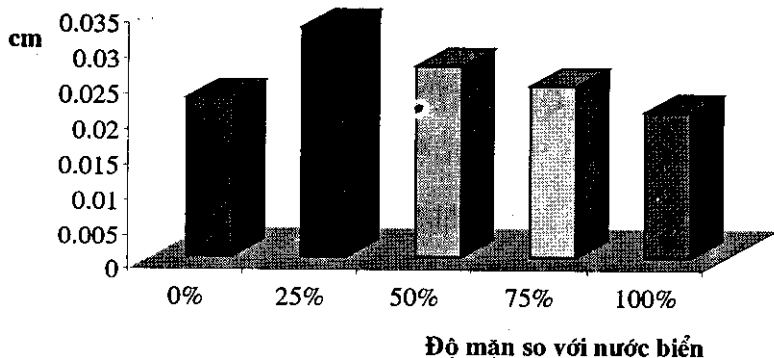
Hình 4. Chiều cao thân của cây trang (*Kandelia candel*) sau 12 tháng theo dõi ở các độ mặn thí nghiệm (cm) (0%, 25%, 50%, 75%, 100% độ mặn so với nước biển)



Hình 5. Đường kính thân của cây trang (*Kandelia candel*) sau 12 tháng theo dõi ở các độ mặn thí nghiệm (cm) (0%, 25%, 50%, 75%, 100% độ mặn so với nước biển)



Hình 6. Biểu đồ tăng trưởng chiều cao thân trung bình của cây trang (*Kandelia candel*) sau 12 tháng theo dõi ở các độ mặn thí nghiệm (cm/tháng)



Hình 7. Biểu đồ tăng trưởng đường kính thân trung bình của cây trang (*Kandelia candel*) sau 12 tháng theo dõi ở các độ mặn thí nghiệm (cm/tháng)

III. KẾT LUẬN

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Qua một năm theo dõi sinh trưởng của cây trang (*Kandelia candel*), chúng tôi nhận thấy:

- Cây trang có tốc độ sinh trưởng cao nhất ở 25% độ mặn nước biển (8,25‰ NaCl) và cũng ở nồng độ này, quang hợp của cây đạt giá trị lớn nhất. Ở 0% độ mặn nước biển, quá trình quang hợp và sự sinh trưởng của cây cũng cao hơn ở 100% độ mặn nước biển.

- Ở môi trường có độ mặn tương đương với độ mặn của nước biển (33‰ NaCl) thì các hoạt động sinh lý của cây trang đều giảm mạnh.

- Độ mặn ảnh hưởng mạnh đến sinh trưởng ban đầu của cây trang. Các phản ứng sinh trưởng do xử lý mặn ở cây trang xuất hiện sớm. Hàm lượng sắc tố giảm, quang hợp giảm và kết quả là giảm sinh trưởng thể hiện rõ khi ở các độ mặn thí nghiệm cao hơn 25% độ mặn nước biển. Kết quả này phù hợp với thực tế. Trong tự nhiên, cây trang phân bố ở các vùng cửa sông có nước lợ.

- Khi độ mặn môi trường trồng cây thay đổi cây có phản ứng thích nghi tương ứng qua việc điều chỉnh các quá trình sinh lý trong cây (tổng hợp diệp lục, quang hợp...), giúp cho cây có thể sinh trưởng được ở các độ mặn khác nhau. Tuy nhiên, các quá trình sinh lý trao đổi chất ở cây sinh trưởng trong môi trường có độ mặn thấp (25%) luôn cao hơn so với cây sống trong môi trường có độ mặn cao (50%, 75% và 100% độ mặn nước biển).

1. Clough B. F., 1984: J. Plant physiol, Aust: 419-430.
2. Hall D. O. and Rao K. K., 1999: *Photosynthesis, Sixth edition*. Cambridge University Press, p: 42-54.
3. Kameya H., Nehira K. & Nakagoshi N., 1996: *Tropics*, 6(1/2): 51-64.
4. Kuraiski S. and Bukurai N., 1985: "Cultivation conditions for *Kandelia candel* seedlings", In: *J. Sudi...ed, The studies of mangrove Ecosystem*, Nodai Research Institute, Tokyo: 94-101.
5. Kyuma K. et al., 1989: Report on the field studies conducted by the soil group of the mangrove workshop held on Iriomote island
6. Ninomiya I., Kadowabi D., Ogino K., 1994: "Water use efficiency in the mangrove", *Proceedings of the 105th conference of Japanese forestry society*, in Japanese, 136p.
7. Snedaker S. C. and Lugo A. E. 1974: *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5: 39-64.
8. Tuan M. S., 1995: *Ecophysiological response of Avicennia marina seedling to salinity*, In partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Agriculture, 97 p.
9. Werner A. and Stelzer R., 1990: *Plant, Cell and Environment*: 243-25.

PHOTOSYNTHESIS AND GROWTH OF *KANDELIA CANDEL* (L.) DRUCE GROWN IN DIFFERENT LEVELS OF EXTERNAL SALINITY

TRAN THI PHUONG, MAI SY TUAN

SUMMARY

The seedlings of *Kandelia candel* were grown at 5 different levels of external salinity (0, 25, 50, 75 and 100% salinity of sea water). The ecophysiological response of *Kandelia candel* to salinity was studied by examining the growth performance and the photosynthetic rate. The optimal growth was recorded in the medium of 25% salinity of sea water. The high salinity caused the increase of fallen leaves and the decrease of the growth rate. The photosynthesis was strongly affected by the external salinity. The photosynthetic rate was highest in the seedlings growing in 25% and lowest in 100% salinity of sea water. In the sodium chloride free medium the growth of seedlings was inhibited. In conclusion, the external salinity was an important factor which affected the photosynthesis and the growth of *Kandelia candel*. *Kandelia candel* was a species that grows best in the blackest water of about 25% salinity of seawater.

Ngày nhận bài: 12-12-200

ĐỊNH LOẠI CHỦNG XẠ KHUẨN *STREPTOMYCES* DN-05 SINH CHẤT KHÁNG SINH CÓ HOẠT PHỔ RỘNG ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TỈNH QUẢNG NAM

ĐỖ THU HÀ

Trường đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng

Qua quá trình nghiên cứu sự phân bố của khu hệ xạ khuẩn sinh chất kháng sinh ở khu vực Quảng Nam - Đà Nẵng, chúng tôi đã lựa chọn được chủng xạ khuẩn *Streptomyces* DN-05 sinh chất kháng sinh có hoạt phổ rộng, chống nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật mạnh, góp phần đảm bảo cho sự cân bằng hệ vi sinh vật và cây trồng trong đất. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các đặc điểm hình thái, sinh lý, khả năng sinh chất kháng sinh và xác định đến loài chủng xạ khuẩn này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

a) Đối tượng

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* DN-05 được phân lập từ đất tỉnh Quảng Nam.

Các chủng vi khuẩn kiểm định gồm: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* ATCC 1228; *Escherichia coli* ATCC 1283

Các chủng nấm kiểm định:

- Các chủng nấm mốc: *Fusarium oxysporum*; *Aspergillus niger*; *Pyricularia oryzae*

- Các chủng nấm men: *Candida albicans*; *Saccharomyces cerevisiae*

Tất cả các chủng vi sinh vật kiểm định do Phòng Vi sinh vật, Viện Kiểm nghiệm dược liệu và Trung tâm Vi sinh học ứng dụng, Trường đại học Khoa học tự nhiên Hà Nội cung cấp.

Hóa chất và dụng cụ

Các loại đường chuẩn: Glucoza; mannoza; fructoza; saccaroza; lactoza; xyloza, do Hãng Merck, CHLB Đức sản xuất.

Các dung môi: n-nutanol, metanol, axeton và benzen của hãng Reachim (Nga).

Giấy sắc ký Whatman No. 1 của Đức sản xuất.

Máy đo pH Mitsubishi của Nhật Bản.

Máy đo phổ tử ngoại UV-VIS 160 A Shimadzu của Nhật Bản sản xuất $\lambda = 200-1100$ nm.

Máy lắc Eroco-MaraLLI IP-55 của Italia.

2. Phương pháp

Lấy mẫu đất và phân lập xạ khuẩn theo phương pháp của Nguyễn Thành Đạt [1].

Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại xạ khuẩn.

- Nghiên cứu đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy, đặc tính sinh lý, sinh hóa trên 7 môi trường thông dụng [2].

- Xác định vị trí phân loại của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu dựa theo khóa phân loại của Krasilnikov, Gauze và cộng sự [7,8].

Có sử dụng bảng màu của Tresner và Backus [10], bảng màu của Bondasev [5].

Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh. Nuôi cấy xạ khuẩn trên môi trường đặc và lỏng Gauze I, Gauze II, ISP4. Sau 5 - 7 ngày xác định hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp thổi thạch của Egorov [6].

Xác định giá trị Rf của dịch kháng sinh thô của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* DN-5 trong một số hệ dung môi theo Ishida và cộng sự [3].

Xác định phổ hấp thụ tử ngoại của các chất kháng sinh do xạ khuẩn sinh ra, được tiến hành trên máy đo phổ tử ngoại UV-VIS 160A của Nhật Bản bước sóng $\lambda = 200-1100$ nm theo Ball et al. [4].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN - 05 được trình bày ở bảng 1.

1. Đặc điểm nuôi cấy và hình thái

Bảng 1

Đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN- 05

TT	Môi trường	Khả năng sinh trưởng	Màu KTKS	Màu KTCC	Sắc tố tan	Hình dạng cuống sinh bào tử	Hình dạng bề mặt bào tử
1	Gauze I	+++	xám trắng, xám	vàng nhạt, trắng	không màu	xoắn, thẳng dài hơi có móc	hình ovan
2	Gauze II	+++	xám, xám trắng	trắng, vàng nhạt	hơi vàng	thẳng dài ít xoắn	nt
3	Czapek nguyên gốc	++	xám	vàng nhạt	nt	nt	nt
4	MPA	++	nt	nt	nt	nt	nt
5	ISP4	+	xám nhạt	trắng, vàng nhạt	nt	nt	nt
6	ISP2	+	nt	nt	nt	nt	nt
7	Saccaroza	+	nt	nt	nt	nt	nt

Ghi chú: +++ mọc tốt
 ++ mọc vừa
 + mọc yếu

KTKS = khuẩn ty khí sinh
 KTCC = khuẩn ty cơ chất

Qua kết quả bảng 1 cho thấy:

+ Chủng *Streptomyces* ĐN - 05 sinh trưởng mạnh trên môi trường Gauze I, Gauze II, mọc vừa trên môi trường Czapek nguyên gốc, MPA và mọc yếu trên môi trường ISP4, ISP2, saccaroza.

+ Sự biến đổi màu sắc của KTKS và KTCC, qua các môi trường, như sau:

KTKS có màu xám, xám trắng trên 7 môi trường mô tả.

KTCC có màu trắng, vàng nhạt trên 7 môi trường mô tả.

- Sắc tố tan lúc đầu không có, sau 8 ngày môi trường ngả sang màu hơi vàng.

- Cuống sinh bào tử trên các môi trường mô tả, có dạng thẳng dài ít xoắn, đôi khi có móc. Bào tử có dạng hình ovan, bề mặt bào tử nhẵn.

2. Đặc điểm sinh lý, sinh hoá

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 được trình bày trong bảng 2.

Qua kết quả bảng 2, chúng tôi nhận thấy:

- Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu cho chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 là 28° -30°C; pH thích hợp là 7.

- Axit amin đặc trưng của thành tế bào thuộc loại typ I có chứa LL-ADP.

Chủng *Streptomyces* ĐN-05 có hoạt tính enzym amylaza, proteaza, có khả năng khử nitrat, chịu muối tối đa (NaCl) là 5%; không có khả năng sinh sắc tố melanin.

- Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon: trên môi trường ISP-9 với các nguồn cacbon là glucoza, mannoza, L arabinoza, fructoza, saccaroza, đều có khả năng đồng hoá. Còn đối với đường lactoza, manitol, đồng hóa yếu hơn; đường xyloza không có khả năng.

Bảng 2

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05

Đặc điểm	Mức độ	Khả năng đồng hóa đường	Mu độ
- Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu (°C)	28 - 30	glucoza	+
- Tỷ lệ thành tế bào	LL - ADP	mannoza	
- pH thích hợp	6,8 - 7,2	larabinoza	+
- Thủy phân tinh bột	+++	fructoza	+
- Đông kết sữa	++	saccaroza	
- Pepton hóa sữa	+	xyloza	+
- Dịch hóa gelatin	+	lactoza	+
- Hình thành sắc tố melanin	-	manitol	-
- Khả năng khử nitrat	+		±
- Khả năng chịu muối tối đa (%NaCl)	5		±

3. Khả năng sinh chất kháng sinh

Khả năng sinh chất kháng sinh của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

Hoạt tính kháng sinh của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 trên một số môi trường cơ bản

Môi trường VSVKDD	Gauze I				Gauze II				ISP4			
	Asp.niger	C. albicans	Bac.subtilis	E.codi	Asp.niger	C.albicans	Bac.subtilis	E.codi	Asp.niger	C.albicans	Bac.subtilis	E.codi
Hoạt tính kháng sinh (D-d, mm)	22	6	17,5	5	23	7	18	6	18	4	16	4

Kết quả bảng 3 cho thấy: Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 có khả năng kháng nấm mốc *Asp. niger* và vi khuẩn Gram (+) rất mạnh, còn đối với nấm men và vi khuẩn Gram (-) có hoạt tính yếu hơn nhiều.

4. Xác định giá trị Rf và phổ hấp thụ tử ngoại của dịch kháng sinh thô của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05

Bảng 4

Giá trị Rf của dịch kháng sinh thô của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 trong một số hệ dung môi

Hệ dung môi	Rf
Butanol : axetic : H ₂ O	0,91
Butanol : bão hòa nước	0,78
Butanol : pyridin : H ₂ O	0,79
Butanol : metanol : H ₂ O	0,64
H ₂ O	0

Kết quả hấp thụ phổ tử ngoại của dịch kháng sinh thô của chủng *Streptomyces* ĐN-05 là: 318 : 332 : 350.

Dựa vào trị số các điểm hấp thụ cực đại thì chất kháng sinh của chủng *Streptomyces* ĐN-05 thuộc loại kháng sinh pentaen, là một loại kháng sinh quý, có khả năng chống nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật mạnh.

5. Kết quả phân loại

Kết quả so sánh đặc điểm phân loại của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 với loài xạ khuẩn chuẩn theo khóa phân loại của Krasilnikov [6], khóa phân loại của Gauze và cộng sự [5] và các mô tả của ISP4, được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5

So sánh đặc điểm phân loại của chủng *Streptomyces* ĐN-05 và của loài chuẩn theo Krasilnikov 1941; Waksman 1983; Gauze 1983

Các đặc điểm phân loại	Nhóm xám	
	<i>Streptomyces</i> ĐN-05	<i>S. globosus</i>
Màu sắc KTKS	Xám, xám tro, xám trắng	Xám, xám trắng
Màu sắc KTCC	Trắng, hơi vàng nhạt	Trắng, hơi vàng nhạt
Hình dạng cương sinh bào tử	Thẳng dài hơi lượn sóng, đôi khi có móc	Thẳng dài hơi lượn sóng, đôi khi có móc
Hình dạng và bề mặt bào tử	Hình ovan bề mặt nhẵn	Hình ovan bề mặt nhẵn
Sắc tố tan	Không có hoặc hơi vàng	Không có hoặc hơi vàng
Sự tạo thành melanin	-	-
Khả năng sử dụng đường:		
- D-glucoza	+	+
- Mannoza	+	+
- Fructoza	+	+
- Saccaroza	+	+
- Lactoza	±	+
- Xyloza	-	+
- Manitol	±	±
Hoạt tính kháng sinh	Chống nấm mốc, nấm men và vi khuẩn	Chống nấm mốc, nấm men và vi khuẩn

Ghi chú: + Có khả năng; - không có khả năng; ± có thể có hoặc không

III. KẾT LUẬN

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* DN-05 được phân lập từ đất xã Điện Hồng, huyện Điện Bàn, tỉnh Quảng Nam. Chất kháng sinh do chủng này sinh ra có hoạt phổ rộng, chống nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật mạnh. Căn cứ vào các đặc điểm nuôi cấy, hình thái, sinh lý, sinh hóa, chất kháng sinh, hoạt phổ kháng sinh của chúng, dựa theo khóa phân loại của Krasilnikov 1970, Gauze và cộng sự 1983, chúng tôi xác định chủng xạ khuẩn *Streptomyces* DN-05 thuộc loài *Streptomyces globosus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Nguyễn Thành Đạt và cs., 1974: Tạp chí VSV học, Viện Hàn lâm khoa học Liên Xô, 5: 13 (tiếng Nga)
2. Lê Gia Hy, 1994: "Nghiên cứu xạ khuẩn chi *Streptomyces* sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh đạo ôn và thối cổ rễ phân lập ở Việt Nam". Luận án tiến sĩ: 3-7, 18-19, 52.
3. Blinop N. O. A. S Khokhlov., 1970: Bnmanaia Khromatographia antiliotilov: 183-190, Nauka M.
4. Ball, S. J. Bassell and A. Mortimer, 1957: J. Gen. Microrobiol, 17: 96-103.
5. Bondaev A. S., 1954: Scala svetor , M.
6. Egorov N. C., 1965: Tách chiết chất kháng sinh của vi sinh vật và phương pháp xác định chất kháng sinh của chúng, Nxb Cao đẳng M; tr. 211 (tiếng Nga)
7. G. F. Gauze et al., 1983: Opredelitels actinomycetov: 34-45, Nauka, M.
8. Krasilnikov N. A., 1970: Lutchistuc gripki: 73-75, Nauka, M.
9. Shirling E. B, Gott Lieb D., 1966: Intern. J. Syst. Bact., 16(3): 313-340.
10. Tresner H. D et al., 1963: J. Bacteriol. 81: 703-709.

IDENTIFICATION OF THE STREPTOMYCES STRAIN DN-05 PRODUCING ANTIBIOTICS WITH WIDE ACTIVITY ISOLATED FROM THE SOIL OF THE QUANGNAM PROVINCE

DO THU HA

SUMMARY

The *Streptomyces* strain DN-05, isolated from the soil of the Quangnam province, produced antibiotics with wide activity against the fungi and bacteria causing grave diseases in plants.

Basing on the cultural and morphological characteristics, the physiological and biochemical properties and the antibiotic activity of the *Streptomyces* strain DN-05 and according to ISP, Krasilnikov N.A. 1970, Gauze G.F. 1983 classification keys, this strain was identified as *Streptomyces globosus*.

Ngày nhận bài: 26-11-2001

Thể lệ viết và gửi bài

1. Tạp chí Sinh học đăng các kết quả điều tra cơ bản và các công trình nghiên cứu, giới thiệu phương pháp điều tra nghiên cứu mới, phê bình và giới thiệu sách mới, đưa tin hội nghị thuộc ngành Sinh học.
2. Bài viết được đánh máy rõ ràng, đầu bài được dịch ra tiếng Anh. Các chuyên đề nghiên cứu không quá 6000 chữ; bài giới thiệu những nghiên cứu nhỏ hoặc thông báo kết quả về những cuộc điều tra khảo sát ngắn hạn không quá 3000 chữ; giới thiệu, phân tích sách mới, đưa tin hội nghị không quá 500 chữ. Các chuyên đề nghiên cứu có phần tóm tắt bằng tiếng Anh; phần tóm tắt cung cấp lượng thông tin cần thiết để qua đó người đọc có thể hiểu được nội dung chính của bài báo.
3. Dùng thuật ngữ khoa học và đơn vị đo lường hợp pháp do Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước đã ban hành. Khi dùng những từ mới, cần ghi trong ngoặc đơn thuật ngữ tương ứng bằng chữ nước ngoài.
4. Các hình vẽ và ảnh rõ ràng, nên vẽ hình và dùng ảnh có chiều ngang bằng 7 cm hoặc 14 cm. Hình vẽ và ảnh phải có chú thích để đúng vị trí trong bài.
5. Công thức trong bài viết chân phương, đúng tỷ lệ.
6. Tài liệu dẫn ghi theo thứ tự sau: Họ tên tác giả, năm xuất bản, tên báo hoặc sách, tập, số, từ trang đến trang, nhà xuất bản. Các tài liệu thuộc hệ chữ La tinh ghi nguyên văn, thuộc hệ chữ Slavơ chuyển sang chữ La tinh, thuộc hệ chữ tượng hình dịch ra tiếng Việt.
7. Bài ghi rõ họ tên, nơi làm việc, số điện thoại.
8. Thư và bài gửi về địa chỉ: Tạp chí Sinh học, 70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội.
9. Tạp chí không đăng những bài không theo đúng thể thức trên. Bài không đăng không trả lại bản thảo.

CONTENTS

	<i>Pages</i>
1. NGUYEN MINH TAM, <u>CAO VAN SUNG</u>	1-6
2. TRUONG XUAN LAM	7-13
3. PHAM NGOC DOANH et al.	14-22
4. LE THANH HOA et al.	23-29
5. LE XUAN TU, et al.	30-34
6. NGUYEN QUYNH UYEN et al.	35-43
7. NGHIEM NHU VAN et al.	44-49
8. TRAN THI PHUONG MAI SY TUAN	50-58
9. DO THU HA	59-63

MỤC LỤC

		<i>Trang</i>
1. NGUYỄN MINH TÂM, <u>CAO VĂN SUNG</u>	: Loài chuột mù <i>Typhlomys cinereus chapensis</i> Osgood, 1932 (Rodentia) ở Việt Nam.	1-6
2. TRƯƠNG XUÂN LAM	: Bước đầu nghiên cứu về đặc điểm sinh học của loài bọ xít cổ ngỗng đỏ ăn thịt <i>Sycanus falleni</i> Stal (Heteroptera, Reduviidae, Harpactorinae).	7-13
3. PHẠM NGỌC DOANH và cộng sự	: Phân bố của loài sán lá phổi <i>Paragonimus heterotremus</i> và vật chủ trung gian của nó tại vùng Tây Bắc.	14-22
4. LÊ THANH HÒA và cộng sự	: Phát hiện loài sán dây <i>Taenia asiatica</i> ký sinh trên người ở Việt Nam bằng phương pháp giám định sinh học phân tử.	23-29
5. LÊ XUÂN TÚ và cộng sự	: Đáp ứng miễn dịch của <i>Gnathostoma spinigerum</i> ở người.	30-34
6. NGUYỄN QUỲNH UYẾN và cộng sự	: Sự biến đổi các chất ức chế Tripxin (TI) ở hạt gạo trong quá trình hình thành và phát triển của hạt.	35-43
7. NGHIÊM NHƯ VÂN và cộng sự	: Chọn tạo các dòng thuần ưu tú từ các dòng lúa ưu thế lai bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn. Phần 1: Nuôi cấy bao phấn của các dòng lúa ưu thế lai	44-49
8. TRẦN THỊ PHƯƠNG, MAI SỸ TUẤN	: Khả năng quang hợp và sinh trưởng của cây trang (<i>Kandelia candel</i> (L.) Druce) trồng ở các môi trường thí nghiệm có độ mặn khác nhau.	50-58
9. ĐỖ THU HÀ	: Định loại chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> ĐN-05 sinh chất kháng sinh có hoạt phổ rộng được phân lập từ đất tỉnh Quảng Nam.	59-63

CVr 27