

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 22 - SỐ 1

THÁNG 3-2000

HÀ NỘI

HỌ GIUN ĐẤT OCNERODRILIDAE BEDDARD, 1891 Ở VIỆT NAM

TRẦN THÁI BÁI

Trường đại học Sư phạm Hà Nội I

Một số loài giun đất trong họ này như *Nematogenia panamaensis*, *Ocnerodrilus occidentalis* là vật chủ trung gian truyền bệnh giun phổi cho lợn [7]. Định loại chính xác và xác định rõ vùng phân bố các loài này là yêu cầu không thể thiếu trong các biện pháp phòng chống ký sinh cho gia súc. Tuy nhiên các loài giun đất trong họ này thường có cơ thể bé (chiều ngang của cơ thể thường không vượt quá 1 mm) nên thường khó định loại chính xác.

Trong bài này, dựa trên một số mẫu được lượm từ nhiều vùng của nước ta từ năm 1980 đến nay hiện lưu trữ tại Trung tâm nghiên cứu động vật đất Trường Đại học Sư phạm (Đại học Quốc gia) Hà Nội, Chúng tôi cho các dẫn liệu về vùng phân bố và các nhận xét về biến dị hình thái của từng loài ở nước ta. Kết thúc bài báo là chóa định các loài trong họ Ocnerodrilidae đã gặp ở nước ta.

Tác giả chân thành cảm ơn các đồng nghiệp Huỳnh Thị Kim Hồi (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật), Trần Thúy Mùi, Đỗ Văn Nhượng (Đại học Sư phạm Hà Nội), Lê Văn Triển (Trung tâm phòng trừ mối, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn), Phạm Thị Hồng Hà (Đại học Đà Nẵng), Nguyễn Văn Thuận (Đại học Huế) đã bổ sung mẫu dùng cho bài này.

Sau đây là các dẫn liệu liên quan tới từng loài.

MALABARIA LEVIS (CHIEN, 1938)

Filodrilus levis Chen, 1938

Mẫu vật quan sát: Hà Nội, Từ Liêm, ruộng cạn, 27-11-1981: 44C+114A.

Biến dị cá thể: thường gặp cá thể tiêu giảm một phần hoặc tất cả lỗ dục và tuyến tiền liệt. Cá thể có túi nhận tinh rất ít gặp.

Phân bố: Trong nước: Chỉ mới gặp ở vùng Hà Nội, trong đất nền ruộng cạn. Thế giới:

Trung Quốc, đảo Hải Nam; Popeng [1], Mianma [3].

THATONIA EXILIS GATES, 1945

Mẫu vật quan sát: Hà Nội, Từ Liêm, ruộng cạn, 4-12-1981: 1C.

Phân bố: Trong nước: Chỉ mới gặp ở vùng Hà Nội, trong đất nền ruộng cạn. Thế giới: Lào, Nêmalat, bờ ruộng [6]; Ấn Độ, miền Bắc và miền Trung cao nguyên Đêcan [3].

EUKERRIA KUKENTHALI GATES, 1942

Mẫu vật quan sát:

Thành phố Đà Nẵng: Hòa Vang, Trường Cao đẳng Sư phạm, vườn, 5-5-1985: 4C+2A;

Quảng Ngãi: Mộ Đức, Đức Trạch, bờ ruộng lúa, 15-4-1995: 14C+5A;

Bình Định: Phù Cát, Cát Ninh, bờ ruộng lúa, 16-4-1995: 17C+1A; An Nhơn, bờ giếng nước, 16-4-1995: 1C;

Phú Yên: Tuy Hòa, Hòa Xuân nam, rãnh nước rửa, 12-4-1995: 1C;

Khánh Hòa: Thành phố Nha Trang, Phương Sa, bờ giếng, 12-4-1995: 5C; Vạn Ninh, Vạn Giã, rãnh nước rửa, 12-4-1995: 14C; Ninh Hòa, bờ ao, 12-4-1995: 1C; Diên Khánh, Suối Tân, rãnh nước rửa, 11-4-1995: 3C+4A;

Ninh Thuận: Ninh Sơn, trung tâm bông Nha Hố, bờ hồ Sen, 7-4-1995: 22C+7A.

Bình Thuận: Thị xã Phan Thiết, rãnh nước rửa, 2-4-1995: 1C; Đức Linh, Đức Chính, đất chuồng lợn, 5-4-1995: 12C; rãnh nước rửa, 5-4-1995: 5C.

Phân bố: Trong nước: Vùng đồi và đồng bằng phần lãnh thổ phía nam đèo Hải Vân, trong đất ẩm cạnh rãnh nước. Thế giới: Mianma; bán đảo Mã Lai, Selangor; đảo Christmas (Ấn Java); Porto Rico; Xanh Thomas; Braxin [3].

Vùng phân bố gốc dự kiến: Nam Mỹ [3].

EUKERRIA SALTENSIS (BEDDARD, 1895)

Kerria saltensis Beddard, 1895

Mẫu vật quan sát:

Quảng Ngãi: Thị xã, chân núi Thạch Bút, 4-5-1985: 3C+1A; Đức Phổ, Phổ Trạch, Lan Thành, cạnh bể nước, 16-4-1995: 16C+2A; Tân Diêm, rãnh nước rửa, 16-4-1995: 42C+2A.

Kon Tum: Thị xã, đất vườn, 12-1979: 65C.

Bình Định: Thị trấn Phù Mỹ, Phú Thôn, bờ giếng, 16-4-1995: 14C+16A; Phú Mỹ, Mỹ Lộc, Vạn Phúc, bờ giếng, 4-1995: 2C; Phù Cát, Cát Trinh, bờ ruộng mạ, 16-4-1995: 3A; An Nhơn, bờ giếng, 16-4-1995: 3C;

Phú Yên: Tuy Hòa, 12-4-1995: thị xã, cạnh bể nước; 2C+2A, thị trấn Phú Lâm: 9C+3A; hợp tác xã Hòa Bình 1, sân chơi của lợn, 7-1995: 1C+4A; Hòa Xuân, rãnh nước rửa, 12-4-1995: 15C+4A; đỉnh đèo Cả, 12-4-1995: 1C+1A.

Khánh Hòa: Thành phố Nha Trang, Phước Hải, bờ giếng nước, 11-4-1995: 1C, trại chăn nuôi, sân chơi của lợn, 8-1995: 12C+8A, chân đèo Rù Rì, 12-4-1995: 1C+1A; Vạn Ninh, thị trấn Vạn Giã, rãnh nước rửa, 12-4-1995: 26C; Ninh Hòa, 12-4-1995: cạnh giếng, 2C+1A; bờ ao, 3A; bờ ruộng, 3C; Diên Khánh, Suối Tân, 11-4-1995: cạnh bể nước, 66C+11A; đất trồng khoai môn, 2C+1A; Cam Ranh, Cam Hải, 11-4-1995: bờ ruộng, 1C; gốc xoài cạnh giếng nước, 3C+22A; thị trấn sông Cầu, gốc dừa, 12-4-1995: 2C;

Ninh Thuận: Ninh Sơn, bờ rãnh nước, 7-4-1995: 31C+1A; công ty bông Nha Hồ, 7-4-1995: 1C; Ninh Hải, 8-4-1995: công ty dưa, bờ ruộng, 2C; đất hoang cạnh nhà dân, 2C+4A;

Bình Thuận: Thị xã Phan Thiết, 2-4-1995: chân cầu, 7C+3A; cạnh bếp nhà dân, 6C+2A; nhà khách Tỉnh ủy Phan Thiết, 1A; Phan Rí, cạnh bể nước, 13-4-1995: 48C+33A; Tuy Phong, Cà Ná, cạnh bể nước, 13-4-1995: 1A, xí nghiệp muối Vĩnh Hảo, cạnh bể nước, 6-4-1995: 7C, xí nghiệp tảo lam cố định đạm, cạnh bể nước, 6-4-1995: 2A; Bắc Bình, Hồng Thái, Thái Hòa, cạnh bể nước, 3-4-1995: 228C+85A; khu tập thể Ủy ban Nhân dân Huyện, cạnh bể nước, 3-4-1995: 1A; Tánh Linh, đất trồng xoài, 4-4-1995: 1C.

Phân bố: Trong nước: Vùng đồi và đồng bằng phần lãnh thổ phía nam đèo Hải Vân, trong đất ẩm cạnh rãnh nước. Trong nhiều mẫu lượm gặp cùng với *Eukerria kukenthali*, nhưng loài này gặp phổ biến hơn. Thế giới: Mianma, Ôxtrâyliá, Tân Calêđôni (đảo), Juan Phecnandê (đảo), Hoa Kỳ, Đảo. Easter Island, Chilê, Achentina, Braxin, Nam Phi [3].

Vùng phân bố gốc dự kiến: Nam Mỹ [3].

GORDIODRILUS ELEGANS BEDDARD, 1892

Mẫu vật quan sát:

Lào Cai: Bát Xát, đất ẩm, 20-3-1992;

Lạng Sơn: Hữu Lũng, đất ẩm, 8-1980: 27C+1A;

Sơn La: Thị xã Sơn La, bờ đường, 8-4-1993; Sông Mã, nông trường, 23-7-1981: 1C;

Hòa Bình: Kim Bôi, đất ẩm, 5-8-1980: 1C+2A.

Quảng Ninh: Thành phố Hạ Long, đất vườn, 8-1979: 18C+1A; Hà Lâm, đất cát pha, 7-8-1979: 9C+9A; Hoàng Tân (đảo), rãnh nước rửa, 11-2-1987: 5C+2A; Thanh Lân (đảo), vườn, 16-10-1990: 27C+20A.

Thành phố Hà Nội: Sóc Sơn, Việt Long, trắng cỏ, 11-3-1979: 1C; Từ Liêm, Thành trại, vườn chùa, 28-5-1980: 2C+1A;

Hưng Yên: Kim Thi, Ân Thi, sân chuồng trâu cũ, 5-1979: 95C+12A.

Thành phố Hải Phòng: Đảo Cát Bà: thị trấn, vườn, 22-1-1988: 6C+12A; Phù Long, khu dân cư cạnh bờ biển, 28-5-1990: 1C+2A; Trung Trang, bờ ruộng, 23-1-1989: 5C+7A, bờ suối, 24-1-1988: 1C+1A, vườn, 22-1-1988: 6C+12A'

Hà Nam: bờ ruộng, ?-1979: 16C+6A;

Thanh Hóa: đảo Hòn Mê, đất đồi trồng rau, 12-9-1998: 4C.

Nghe An: Diễn Châu, Diễn Đoài, đất ẩm, 28-3-1989; Đô Lương, đồi, 4-7-1979: 16C+17A;

Hà Tĩnh: Nông trường Kỳ Anh, 20-3-1985: 13C+13A.

Quảng Bình: Thị xã Đồng Hới, Đồng Sơn, 16-6-1980, ruộng chân đồi, 13-11-1987, Đức Thủy, 24-8-1980: 1C+5A;

Quảng Trị: Ba đôn, đất trồng, 18-8-1989: 2A;

Thừa Thiên - Huế: Thành phố Huế, Nguyệt Biều, vườn tre, 8-7-1985: 7C; Lăng cô, chân núi phía bắc Hải Vân, 18-4-1980: 4C+2A.

Thành phố Đà Nẵng: Bán đảo Sơn Trà, gốc chuối, 16-9-1994: 12C+10A; Hòa Vang, Hòa Nhơn, vườn, 3-12-1988: 1C+1A;

Quảng Nam: Tam Kỳ, vườn, 28-1-1998: 12C+10A; Điện Bàn, bờ giếng, 13-5-1980: 6C, trại nuôi lợn, 7-1989: 1C+9A; Tiên Phước, thị trấn Tiên Kỳ, bãi cỏ, 28-9-1988: 3C, vườn sắn, 28-1-1988: 1C;

Quảng Ngãi: Đức Phổ, Phố Thạch, Dốc ổi, rãnh nước rửa, 16-4-1995, Phố Khánh, 10-4-1995; Mộ Đức, Diêu Tạch, 15-4-1995; Lý Sơn (đảo), vườn mít, 6-10-1990: 2C;

Bình Định: Cù Lao Xanh, ruộng cạn, 4-4-1988: 4C+4A; vườn, 11-5-1985: 7C+25A;

Gia Lai: Buôn Lưới, Kông Hà Nùng, nương ngô, 19-8-1980: 5A.

Đắk Lắk: sân trại chăn nuôi, 1989: 6C.

Bình Thuận: Trung Phong, xí nghiệp muối Vĩnh Hảo, 6-4-1995.

Khánh Hòa: Thành phố Nha Trang, vườn, gốc ổi, 22-2-1995; Tây Sơn, Ủy ban Huyện, bãi cỏ, 8-1984: 9C+3A; Hòn Tre (đảo), vườn, 6-1989: 68C+4A;

Lâm Đồng: Thành phố Đà Lạt, Xuân Thọ, Tố Sơn, rãnh nước rửa, 10-4-1995; Đức Trọng, rãnh nước rửa, 9-4-1995;

Biến dị cá thể: Loài có 3 dạng hình thái: dạng *ucinus* với 3 đôi tuyến tiền liệt đổ ra ngoài ở đốt XVII, XVIII và XIX, với rãnh tinh kéo dài từ lỗ tuyến tiền liệt XVII đến XIX; dạng *peguanus* với 2 đôi tuyến tiền liệt đổ ra ngoài ở đốt XVII và XVIII với rãnh tinh nối lỗ tuyến tiền liệt XVII đến XVIII và dạng *travancorensis* với 2 đôi tuyến tiền liệt đổ ra ngoài ở XVIII và XIX với rãnh tinh nối lỗ tuyến tiền liệt XVIII và XIX. Ba dạng này có thể gặp ngay trong cùng một mẫu lượm và có cả các dạng trung gian (dạng *ucinus* tiêu giảm 1 tuyến tiền liệt ở phía trước hoặc phía sau, ở bên phải hoặc bên trái).

Hiện tượng gặp chung trong cùng một mẫu lượm và sự có mặt của các dạng trung gian

chứng tỏ dạng *peguanus* và *travancorensis* là 2 cực của biến dị cá thể của dạng *ucinus*. Quan sát 1655 cá thể lượm từ khu vực phía nam miền Trung nước ta, Huỳnh Thị Kim Hồi [4] đã thống kê được 1602 cá thể thuộc dạng *peguanus* (chiếm 96,8%), 44 cá thể thuộc dạng *ucinus* (chiếm 2,7%) và 9 cá thể thuộc dạng *travancorensis* (chiếm 0,5%).

Phân bố: Trong nước: Gặp khắp nơi trong đất ẩm của sinh cảnh nhân tác. Thế giới: Mianma, Ấn Độ, châu Phi, Puerto Rico (đảo), Bónaca (đảo), Đominica [4]

Vùng phân bố gốc dự kiến: châu Phi [3].

NEMATOGENIA PANAMAENSIS (EISEN, 1900)

Ocnerodrilus (Nematogenia) lacum var. *panamaensis* Eisen, 1900.

Mẫu vật quan sát:

KonTum: Thị xã Kon Tum, đất vườn, 24-12-1994: 5C;

Gia Lai: Thị xã Pleiku: nhà khách UB tỉnh, vườn rau, 2-12-1979: 2C+3A, Cầu Hội Phú, đất trồng rau ven suối, 3-12-1979: 14C+16A; bờ đường, 4-12-1979: 4C+2A; Trạm khí tượng, 30-11-1979: 33C+40A; nông trường Biển Hồ, 28-11-1979: 1A;

Đắk Lắk: Thị xã Buôn Ma Thuật, đất vườn, 23-12-1994: 1A; thị trấn Gia Nghĩa, Đắk Nông, vườn quanh nhà, 25-5-1979: 115C+107A; Cư M'gar, rẫy cà phê, 24-12-1994: 2A; nông trường Bầu Cạn, vườn dong riềng, 29-11-1979: 1C+18A;

Lâm Đồng: Đơn Dương, cạnh bể nước, 8-4-1995: 2C+2A; Đức Trọng, cạnh bể nước, 19-4-1995: 5C; Thành phố Đà Lạt, Viện Vacxin, bờ rãnh nước, 9-4-1995: 45C+213A, Nam Hồ, cạnh bể nước, 10-4-1995: 1A, Nam Hồ, phường 2, vườn rau, 10-4-1995: 45C+120A, Phân viện Sinh học, đất trồng chuối, 10-4-1995: 30A, bãi rác Vườn Hồng, 10-4-1995: 4A; Xuân Thu, Tỷ Sơn, rãnh nước rửa, 10-4-1995: 8C;

Bình Thuận: Đức Linh, Đức Chính, bờ rãnh nước, 5-4-1995: 6A; Tuy Phong, Phước Thế, Đại Hòa, rãnh nước rửa, 6-4-1995: 1A.

Biến dị cá thể: Gặp 2C thiếu túi nhận tinh (1C ở Cư M'gar, 24-12-1994 và 1C ở Đức Linh,

5-4-1995) và 1C có túi nhận tinh ít phát triển (Đà Lạt, 10-4-1995).

Phân bố: Trong nước: Đất trồng ẩm, đất ven nguồn nước (bờ sông, bờ suối, bờ ruộng, bờ giếng, nơi rửa bát...) vùng đồi núi và cao sơn nguyên (độ cao 50 - 1500 m) ở các tỉnh phía Nam miền Trung (từ Gia Lai, Kon Tum đến Bình Thuận). Thế giới: Xrilanca, Philipin, Ghinê, Libêria, Nigêria, Camorum, Côngô, Còxta Rica, Panama, Vênêxuêla, Bahama [3].

Vùng phân bố gốc dự kiến: nhiệt đới châu Phi.

***OCNERODRILUS OCCIDENTALIS* EISEN, 1878.**

Mẫu vật quan sát:

Hưng Yên: Ân Thi, 19-5-1979: trại trâu, đất ẩm, 20C+3A, rãnh nước rửa, 42C+42A; Nhân Vũ, đất vườn, 20-5-1979: 11C;

Thành phố Hà Nội: Từ Liêm, ruộng cạn, 2-12-1981: 2A; phân ủ được 2 tháng, 11-6-1979: 3A;

Rừng quốc gia Cúc Phương: vườn quanh nhà khách trung tâm, 26-7-1979: 6C;

Thanh Hóa: đảo Hòn Mê, chân ngọn hải đăng, 12-9-1998: 2C+2A.

Nghệ An: Nghi Lộc, Nghi Phong, Trường Cao Đẳng, vũng nước cạn, 4-9-1979: 74C+25A; Đô Lương, thị trấn, vườn, 4-7-1979: 7C+4A;

Quảng Bình: Đồng Hới, Đức Thủy, đất đồi, cạnh bể nước, 24-8-1980: 9C; Trảng Bức, 14-8-1980: 2A;

Thừa Thiên - Huế: Lăng Cô, đất cát, 18-4-1980: 2C;

Quảng Ngãi: Thị xã, vườn trường Cao đẳng Sư phạm, 5-5-1985: 3C; Đức Phổ, đất ẩm cạnh bể nước, 16-4-1995: 1A;

Bình Định: Thành phố Quy Nhơn, vườn nhà khách Ủy ban tỉnh, 27-11-1979: 1C;

Phú Yên: Đèo Cả, rãnh nước rửa, 1-4-1995: 2C+4A; hợp tác xã Hòa Bình I, sân chuồng lợn, 15-11-1989: 1A; thị xã Tuy Hòa, cạnh bể nước, 12-4-1995: 1C;

Khánh Hòa: Thành phố Nha Trang, sân chuồng lợn, 8-1995: 34C+5A; Phước Sơn, bờ giếng, 11-4-1995: 1C; Phú Tân, Tuy Hòa, rãnh nước rửa, 12-4-1995: 1C;

Đắc Lắc: Khu bảo tồn Yokdon, bờ ruộng, 10-10-1989: 1C+1A;

Ninh Thuận: Ninh Sơn, rãnh nước rửa, 7-4-1995: 1C; Ninh Hải, bờ ruộng, 8-4-1995: 37C+5A, bờ đường làng, 8-4-1995: 1A, đất hoang, 8-4-1995: 2C;

Bình Thuận: Thị xã Phan Thiết, nhà khách Tỉnh ủy, rãnh nước rửa, 2-4-1995: 27C+2A, chân cầu thị xã, bờ rãnh nước; 2-4-1995: 60C+35A; Tuy Phong, Vĩnh Hảo, Xí nghiệp muối, cạnh bể nước, 6-4-1995: 2A; Tánh Linh, Đồng Kho, 4-4-1995: sân chuồng lợn, 76C+1A; rãnh nước rửa, 2C+1A; Lạc Tánh, Lâm Trường, rãnh nước rửa, 5-4-1995: 6C; Đức Bình, bờ ruộng, 4-4-1995: 1C; Đức Linh, Đức Tài, bờ giếng, 5-4-1995: 8C; Đức Chính, sân chuồng lợn, 5-4-1995: 6C; Nam Chính, rãnh nước rửa, 5-4-1995: 21C; Đức Linh, 5-4-1995: Đức Tài, bờ giếng, 8C; Đức Chính, sân chuồng lợn, 6C; Nam Chính, bờ rãnh nước, 21C; Bắc Bình, cạnh bể nước, 3-4-1995: 4C+1A.

Biến dị cá thể: Trong nhiều lô mẫu thường gặp các cá thể có phần trước đai tái sinh ngắn, các cá thể tiêu giảm tuyến tiền liệt và tiêu giảm phần cuối của ống dẫn tinh.

Phân bố: Trong nước: đất ven nguồn nước tạm (bờ giếng, đất cạnh bể nước, rãnh nước rửa ven chuồng lợn...), ruộng cạn, đất trồng ẩm vùng đồng bằng và đồi núi của cả nước. Thế giới: Nhật Bản [2]; Trung Quốc: Giang Tô, Triết Giang, Hải Nam [1]; Lào: Viên Chăn, núi Khao Khoai [6]; Mianma [3]; Ấn Độ; Pakixtan; Xrilanca; Xingapo, Philipin và nhiều nước ở châu Á, châu Phi, châu Mỹ. Loài này di nhập vào nhiều vùng trên thế giới [3].

Vùng phân bố gốc dự kiến: nhiệt đới châu Mỹ [3].

Vai trò thực tiễn: Vật chủ trung gian lan truyền bệnh giun phổi lợn *Metastrongylus* ở các tỉnh phía nam miền Trung nước ta [7].

Một cách tổng quát, có thể thấy các loài trong họ này thường gặp trong đất ẩm nước quanh năm, phần lớn (nếu chưa kể *Malabarisa levis* và *Thatonia exilis* chưa rõ vùng phân bố gốc) là các loài nhập nội vào Việt Nam, tuy nhiên ở Việt Nam phạm vi phân bố có khác nhau. Nếu lấy đèo Hải Vân làm ranh giới tự nhiên giả định, *Thatonia exilis* và *Malabarisa*

levis chỉ mới gặp ở phía Bắc, *Nematogenia panamaensis*, *Eukeria saltensis*, *Eukeria kukenthali* chỉ mới gặp ở phía Nam còn *Ocnerodrilus occidentalis* và *Gordiodrilus elegans* gặp trong phạm vi cả nước.

Sau đây là đặc điểm chẩn loại họ *Ocnerodrilidae* và khóa định loại các loài đã gặp ở Việt Nam.

Đặc điểm chẩn loại *Ocnerodrilidae*

Không có manh tràng. Tim cuối trong đốt XI. Thân nguyên (holoic), không có nang chứa. Mỗi đốt có 4 đôi tơ. Túi nhận tinh ở trước các đốt tinh. Lỗ đực và lỗ cái nằm trong vùng đai. Tuyến trứng trong đốt XIII với ít sợi trứng. Tuyến tiền liệt dạng ống.

Khóa định loại các loài trong họ *Ocnerodrilidae* đã gặp ở Việt Nam

1. Tuyến canxi không tạo thành túi là nhánh của thực quản. Có một dạ dày cơ trong đốt VII.....2
 - Tuyến canxi tạo thành túi là nhánh của thực quản. Không có hoặc có 1-2 dạ dày cơ trong các đốt VII-VIII.....3
2. Có 2 đôi lỗ túi nhận tinh ở 7/8 - 8/9.....*Thatonia exilis*
 - Có 1 đôi túi nhận tinh ở 8/9 *Malabararia levis*
3. Lỗ đực và lỗ tuyến tiền liệt chung nhau trên đốt XVII.....4
 - Lỗ đực trên đốt XVIII. Có 1, 2 hoặc 3 đôi lỗ tuyến tiền liệt trên các đốt XVII-XIX hoặc tiêu giảm 1-2 đôi trong các đốt đó.....5
4. Lỗ đực nằm trên gờ ngang hình thoi. Đai chiếm đốt XIII-XX..*Nematogenia panamaensis*

- Lỗ đực không nằm trên gờ ngang. Đai chiếm đốt XIV-XVIII.....

-*Ocnerodrilus occidentalis*
5. Có một tuyến canxi trong đốt IX và 1-3 đôi tuyến tiền liệt đổ ra ngoài trên các đốt XVII-XIX.....*Gordiodrilus elegans*

- Có một đôi tuyến canxi trong đốt IX và 2 đôi lỗ tuyến tiền liệt trên đốt XVII và XIX.....6

6. Lỗ nhận tinh ở trong khoảng tơ b-c. Không có nhú phụ hình bầu dục trên đường bụng đốt XXI.....*Eukeria saltensis*

- Lỗ nhận tinh ở trong khoảng tơ a-b. Thường có một nhú phụ lớn hình bầu dục trên đường bụng đốt XXI.....*Eukeria kukenthali*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen Y., 1938: Contr. Biol. Lab. Sci. Soc. China (Zool.), 12, 10: 375-427.
2. Easton E. G., 1981: Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.), 4(2): 33-65.
3. Gates G. E., 1972: Trans. Am. Phil. Soc., 62(7): 262-275.
4. Huỳnh Thị Kim Hối, 1996: Khu hệ giun đất phía nam miền Trung Việt Nam. Luận án Phó Tiến sĩ Sinh học: 1-115.
5. Jamieson B. G. M., 1970: Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.), 20: 133-172.
6. Samphon Keungphachanh, 1990: Khu hệ giun đất nước CHDCND Lào. Tóm tắt Luận án Phó Tiến sĩ Sinh học: 1-24.
7. Nguyễn Đức Tân, Bùi Lập, 1995: Khoa học kỹ thuật Thú y: 2(2): 6-9.

THE OLIGOCHAETE FAMILY OCNERODRILIDAE BEDDARD, 1891 IN VIETNAM

THAI TRAN BAI

SUMMARY

Based upon the materials collected in many regions of Vietnam during 1980-1995, 7 species of *Ocnerodrilidae* are noted and a taxonomic key to these species is given.

Key to the species of *Ocnerodrilidae* in Vietnam

1. Extramural calciferous glands lacking. One gizzard in VII.....2

(Xem tiếp trang 20)

TUYỂN TRÙNG SỐNG TỰ DO Ở VÙNG NƯỚC LỢ CỦA CÁI MÉP - SÔNG THỊ VẢI

ĐOÀN CẢNH

Viện Sinh học nhiệt đới

NGUYỄN VŨ THANH

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Trong vòng 10 năm trở lại đây, nhiều khu chế xuất, khu công nghiệp cao đặc biệt là các khu công nghiệp hiện đại có vốn liên doanh với nước ngoài đã được xây dựng và phần nhiều trong số đó đã đi vào hoạt động. Bên cạnh những kết quả khá cao về năng suất, chất lượng sản phẩm mà chúng ta đã đạt được, còn tồn đọng lại những vấn đề bức xúc - sự ô nhiễm ngày càng tăng do các chất thải công nghiệp gây ra đối với môi trường sống xung quanh. Ở miền Nam nước ta, khu công nghiệp Đồng Nai được xây dựng dọc theo sông Đồng Nai - Thị Vải, trên chiều dài 25 - 30 km có tới hàng chục nhà máy lớn, nhỏ; trong số đó đáng chú ý là các nhà máy VEDAN, nhà máy nhiệt điện Phú Mỹ, nhà máy cán thép Phú Mỹ, cảng Gò Dầu v.v., hàng ngày một lượng lớn chất thải công nghiệp và sinh hoạt đã thải ra sông Đồng Nai và Thị Vải làm ô nhiễm nặng nguồn nước và môi trường tại vùng này. Việc nghiên cứu môi trường bị ô nhiễm ở thành phố Hồ Chí Minh đã trở nên bức xúc mấy năm nay gần đây, bên cạnh việc xác định mức độ ô nhiễm môi trường bằng các biện pháp hóa lý như xác định hàm lượng các kim loại nặng, các chất chất không hòa tan v.v.; Một số nghiên cứu về ô nhiễm môi trường bằng các sinh vật chỉ thị như sử dụng các loài tảo, vi khuẩn, giáp xác, chân chèo, nhuyễn thể, protozoa và phytolakton để đánh giá mức độ nhiễm bẩn môi trường nước cũng đã được tiến hành. Mấy năm qua trên thế giới, bên cạnh sử dụng các sinh vật chỉ thị truyền thống như đã nêu trên, tuyển trùng sống tự do trong biển, vùng nước nằm cửa sông, các thủy vực nội địa ngày càng được sử dụng nhiều trong việc thăm dò, đánh giá độ nhiễm của môi trường tại các vùng có chất thải công nghiệp như ở Liên bang Nga, Hà Lan, Bỉ, Anh

và một số nước khác. Việc sử dụng tuyển trùng như một sinh vật chỉ thị để kiểm tra đánh giá hiện trạng ô nhiễm các thủy vực ở nước ta chỉ mới được tiến hành trong hai năm qua.

Dưới đây là những kết quả nghiên cứu ban đầu của các tác giả về đa dạng sinh học và sự biến đổi của nó ở các loài tuyển trùng sống tự do vùng nước mặn dưới tác động của chất thải công nghiệp và sinh hoạt ven bờ nhằm góp phần nghiên cứu sự thay đổi của hệ sinh thái vùng nước lợ sông Thị Vải - Đồng Nai bởi sự tác động của con người hiện nay.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Trong tháng 8/1998 đã tiến hành nghiên cứu thành phần loài tuyển trùng sống tự do sông Thị Vải theo lộ trình Cửa Cái Mép - Cảng Thị Vải - Phú Mỹ - VEDAN - Gò Dầu - Suối Cầu Mới và ngược lại, mẫu thu khi nước ròng và khi nước lớn, độ sâu dao động trong khoảng 5 - 14 m tại các điểm N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N7B, N8; xác định tọa độ bằng máy định vị. Dùng gầu thu thu động vật đáy, đào lấy lớp bùn đáy có chiều sâu 5 - 10 cm, cho vào lọ nhựa với dung tích 250 cm³, để bảo quản mẫu trong quá trình di chuyển đã sử dụng dung dịch formalin 4% để định hình. Tuyển trùng được tách lọc bằng phương pháp li tâm (De Grisse, 1969), tiêu bản được xử lý và làm dưới dạng cố định (Seinhorst, 1962). Mẫu vật và các tiêu bản chuẩn được lưu giữ và bảo quản tại Phòng tuyển trùng học Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật và một phần mẫu được bảo quản tại Phân Viện Sinh thái, Tài nguyên và Môi trường, Viện Sinh học nhiệt đới Tp. Hồ Chí Minh.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thành phần loài tuyến trùng sống tự do ở vùng Cái Mép - Thị Vải:

Diodontolaimus sp.
Leptolaimus sp.
Antomicron sp.
Setoplectus sp.
Viscosia sp.
Comesa votadinic Warwick, 1971
Comesa vitia Warwick, 1971
Paracomesoma sp.
Sabatieria sp₁
Sabatieria sp₂
Dorylaimopsis sp.
Vasostoma sp.
Paracanthonchus sp.
Microlaimus sp.
Microlaimus sp.
Daptonema sp₁
Daptonema sp₂
Daptonema sp₃
Daptonema sp₄
Theristus longus Platt, 1973
Theristus sp₁
Theristus sp₂
Theristus sp₃
Paramonohystera sp₁
Paramonohystera sp₂
Metacomesoma sp.
Paracomesoma sp₁
Paracomesoma sp₂
Paramonohystera sp.
Haliplectus dorsalis Cobb et Chitwood,
 1956
Haliplectus sp₁
Paramesonchium sp.
Desmodora sp.
Monhystera sp.
Sphaerolaimus sp.

Subsphaerolaims sp.

Steineria marsiana Alekseev et
 Belogunov, 1972

Spilophorella cadila Gerlach, 1951

Terschlingia longicaudata de Man, 1888

Terschlingia communis de Man, 1888

Terschlingia sp₁

Terschlingia sp₂

Terschlingia sp₃

Pseudocella sp.

Criconemella sp.

Nhận xét:

Các loài tuyến trùng phát hiện được bao gồm 45 loài, thuộc 28 giống, 18 họ và 5 bộ là Tylenchida, Mononchida, Monhysterida, Enoplida và Chromadorida. Trong đó bộ Tylenchida và bộ Mononchida chỉ bắt gặp ở mỗi bộ chỉ với 1 loài, đây là những loài tuyến trùng thường có cuộc sống gắn liền với đất và cây trồng, chúng bắt gặp ở đây sông là do quá trình rửa trôi từ đất và nước mưa. Khu hệ tuyến trùng biển thuộc bộ Chromadorida bao gồm đại diện của 19 loài thuộc 15 giống của 10 họ, chúng chiếm 42,2% tổng số loài bắt gặp ở đây, trong khi đó nhóm tuyến trùng sống ở nước mặn khác Monhysterida chỉ với đại diện của 3 họ, 9 giống và 21 loài đã chiếm 46,6% tổng số loài. Các loài tuyến trùng thuộc bộ Enoplida ở đây chỉ mới bắt gặp đại diện của 2 họ với 3 giống và 3 loài.

2. So sánh hệ số đa dạng sinh học của một số quần xã tuyến trùng tại các điểm thu mẫu:

Độ đa dạng về loài là thuộc tính quan trọng nhất của quần xã. Khi điều kiện ngoại cảnh thuận lợi thì số lượng loài lớn, số lượng cá thể trong loài nhỏ, hệ số đa dạng cao. Khi điều kiện không còn phù hợp nữa thì số lượng các loài giảm, số lượng cá thể từng loài tăng nhanh, đặc biệt với nước thải công nghiệp chưa xử lý và nước thải sinh hoạt thành phố, khu công nghiệp thì độ đa dạng giảm đi rất nhiều, có thể đến 0 đối với rất nhiều quần xã. Sự đa dạng về loài của bất kỳ một quần xã nào đều có quan hệ trực tiếp tới tính ổn định của hệ sinh thái. Độ đa dạng sinh học càng lớn thì tính ổn định, tính bền vững của môi trường càng cao và ngược lại (Odum,

1978). Vì vậy, việc xác định các chỉ số đa dạng sinh học là một trong những phương pháp tốt nhất để phát hiện và đánh giá sự nhiễm bẩn của môi trường xung quanh. Theo Wilh, 1967; Margalef, 1958; Odum, Cantlon, Kornicker, 1960, độ đa dạng về loài (d) của quần xã được tính theo công thức sau:

$$d = \frac{S-1}{\lg N}; \text{ hoặc } d = \frac{S}{\sqrt{N}}; \text{ hoặc } d = \frac{S}{1000}$$

với S là số loài

N là số cá thể

a. Điểm của Cái Mép:

Khu hệ tuyến trùng sống tự do ở khu vực Cửa Cái Mép bao gồm 19 loài, chiếm 42,2% tổng số loài của các khu vực nghiên cứu; các loài ưu thế tại đây là loài *Daptonema* sp., chúng chiếm 44% tổng số cá thể; Các loài *Dorylaimopsis* sp., *Theristus* sp., *Terschlingia longicaudata* và loài *Sabatieria* sp. có số lượng cá thể gần tương đương nhau, không nhiều so với tổng số cá thể của quần xã. Độ đa dạng sinh học được xác định là:

$$d = 19 : 1000 = 0,019.$$

b. Điểm cảng Phú Mỹ:

Khu hệ tuyến trùng sống tự do ở khu vực cảng nhiệt điện Phú Mỹ bao gồm 15 loài, chiếm 33,5% tổng số loài của cả khu vực nghiên cứu; các loài ưu thế là *Daptonema* sp. chiếm 34,5% tổng số cá thể của quần xã; *Terschlingia longicaudata* chiếm 17,5% tổng số cá thể của quần xã là loài *Dorylaimopsis* sp. chiếm 11,9% tổng số cá thể quần xã. Độ đa dạng sinh học được xác định là:

$$d = 15 : 1000 = 0,015$$

c. Điểm cảng Gò Dầu:

Mẫu thu được ở khu vực này rất nghèo nàn, số loài bắt gặp 3 loài, loài chiếm ưu thế là *Terschlingia longicaudata* chiếm 95% tổng số cá thể trong quần xã. Độ đa dạng sinh học được xác định là:

$$d = 3 : 1000 = 0,003$$

d. Điểm cảng VEDAN:

Số loài hiện diện: 3 loài, bao gồm *Terschlingia longicaudata*, *Daptonema* sp. và *Pseudonella* sp.; trong số đó loài ưu thế là loài

Terschlingia longicaudata, chúng chiếm 97% cá thể trong quần xã. Độ đa dạng sinh học được xác định là:

$$d = 3 : 1000 = 0,003$$

e. Điểm Tắc Gia Phương:

Khu hệ tuyến trùng sống tự do ở khu vực Tắc Gia Phương bao gồm 8 loài, chiếm 17,8% tổng số loài của cả khu vực nghiên cứu; các loài ưu thế là *Sabatieria* sp. chiếm 35,6% tổng số cá thể của quần xã; *Paramesonchium* sp. chiếm 20,7% tổng số cá thể quần xã. Độ đa dạng sinh học được xác định là:

$$d = 8 : 1000 = 0,008$$

Nhận xét:

Dưới tác động của các chất thải công nghiệp, chất thải sinh hoạt từ các nhà máy hóa chất và các khu công nghiệp khác dọc hai bờ sông, khu hệ tuyến trùng vùng cửa sông nước lợ Thị Vải - Cái Mép cũng có những thay đổi rất lớn. Khu hệ phong phú với thành phần loài đa dạng được ghi nhận ở vùng nước Cửa Cái Mép, tại đây đã phát hiện được 19 loài tuyến trùng khác nhau, hệ số đa dạng sinh học đạt được giá trị cao nhất (0,019), trong khi đó, tại vùng cửa cống thải của nhà máy VEDAN, số lượng các loài tuyến trùng đã giảm mạnh, hệ số đa dạng sinh học $d = 0,003$. Như vậy qua việc tính hệ số đa dạng sinh học của quần xã tuyến trùng tại VEDAN và khu lân cận chúng ta có thể thấy rằng: Dưới tác động của các chất thải, độ đa dạng sinh học của quần xã tuyến trùng giảm từ 0,019 xuống còn 0,003 ở tại các điểm gần VEDAN như Gò Dầu (0,003). Trong tất cả các mẫu thu ở các điểm đã nghiên cứu có 3 loài tuyến trùng thường xuyên bắt gặp với tần suất cao đó là các loài: *Sabatieria* sp.; *Daptonema* sp.; và *Terschlingia longicaudata* trong đó 2 loài *Daptonema* sp.; và *Terschlingia longicaudata* được các nhà tuyến trùng học coi như những sinh vật chỉ thị tin cậy trong các trường hợp phát hiện và đánh giá mức độ ô nhiễm môi trường ở các thủy vực khác nhau trên thế giới.

III. KẾT LUẬN

1. Thành phần loài tuyến trùng sống tự do vùng cửa sông Cái Mép - Thị Vải bao gồm 45 loài, thuộc 48 giống, 18 họ và 5 bộ là

Tylenchida, Mononchida, Monhysterida, Enoplida và Chromadorida, trong đó Chromadoria với đại diện của 19 loài thuộc 15 giống và 10 họ, chiếm 42,2% tổng số loài bắt gặp ở đây, nhóm tuyến trùng sống ở nước mặn khác Monhysterida bao gồm 3 họ, 9 giống và 21 loài, chiếm 46,6% tổng số loài, trong khi đó đại diện của bộ Enoplida chỉ có 3 loài của 3 giống thuộc 2 họ, chúng chỉ chiếm 6,6% tổng số loài mà thôi.

2. Khu hệ tuyến trùng sống tự do với thành phần loài đa dạng được ghi nhận ở vùng nước Cửa Cái Mép, tại đây đã phát hiện được 19 loài tuyến trùng khác nhau trong tổng số 45 loài; hệ số đa dạng sinh học đạt giá trị cao nhất ($d = 0,019$), trong khi đó, tại vùng cửa cống thải của nhà máy VEDAN, số lượng các loài tuyến trùng đã giảm mạnh, tại đây chỉ phát hiện thấy 3 loài với loài ưu thế là *Terschlingia longicaudata*. Hệ số đa dạng sinh học của quần xã tuyến trùng ở đây rất thấp, ($d = 0,003$). Dưới tác động của các chất thải, độ đa dạng sinh học của quần xã tuyến trùng giảm từ 0,019 xuống còn 0,003 ở tại các điểm gần VEDAN như Gò Dầu (0,003), Phú Mỹ (0,015). Trong tất cả các điểm đã nghiên cứu có 3 loài tuyến trùng thường xuyên bắt gặp với tần xuất cao đó là loài: *Sabastieria* sp.; *Daptonema* sp.; và *Terschlingia longicaudata*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Belogurov O. I., 1980: Two new species of marine nematodes and comments to the genus Dorylaimopsis. Zool. Journal of Acad.

Sci. of Russia. Cankt Peterbourg. LI X, 3: 358-367.

2. Carlo Heip, Magda Vincx and Guido Vranken, 1985: The ecology of marine nematodes. 23: 399-487. Oceanog. Mar. Biol. Ann. Rev.

3. Howard M. Platt and Richard M. Warwick, 1988: Freelifving marine nematodes. Part I, II and III. Published for Linnean society of London and The Estuarine and Brackish-Water Sciences Association. By E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

4. Taslolikhin S. Ya., 1989: Typically fresh-water nematodes-What are they? Zool. Journal of Acad. Sci. of Russia. Cankt Peterbourg. LXVIII, 2: 5-13.

5. Tchesunov A. V., 1980: New data on freelifving nematodes of the superfamily Monhysteroidea of the Caspia sea. Zool. Journal of Acad. Sci. of Russia. Cankt Peterbourg. LIX, 7: 973-985.

6. Tchesunov A. V., 1989: The genus Cyartonema (Nematoda, Chromadoria): Morphometrical diversity, new diagnos and a descreption of the tree new nematodes species from White sea. Zool. Journal of Acad. Sci. of Russia. Cankt Peterbourg. LXVIII, 11: 5-15.

7. Tchesunov A. V., 1997: Marimermithid nematodes: Anatomy, Position in the system, philogeny. Zool. Journal of Acad. Sci. of Russia. Cankt Peterbourg. LXVIII, 76, 11: 1283-1299.

FREELIVING NEMATODES AT THE BRACKISH WATER ESTUARY OF THE THIVAI RIVER (DONGNAI PROVINCE)

DOAN CANH, NGUYEN VU THANH

SUMMARY

45 freelifving nematode species belonging to 28 genera of 5 orders: *Chromadorida*, *Monhysterida*, *Enoplida*, *Mononchida* and *Tylenchida* were reported in a survey of nematodes at the Thivai river estuary during 1998. Among them, 19 species belong to *Chromadoria* and 21 species to *Monhysterida*.

The estuary-mud of the Thivai river is characterized by fine sand; its depth is about 5-14 m. Only three nematode species in this area have a mean abundance: *Sebastiera* sp. (35.6%), *Daptonema* sp. (34.5%) and *Terschlingia longicaudata* (17.5-95%). An industrial sewage water has decreased the nematode density of the Thivai river estuary, but meantime *Terschlingia longicaudata* becomes extremely dominant. The industrial sewage water has decreased the biodiversity index of the nematode population from 0.019 to 0.003-0.015.

Ngày nhận bài: 26-8-1999

HOẠT HÓA GIEN MÃ CHO CHALCONE SYNTHASE BỞI VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM RHIZOBIA VÀ FACTOR NOD

VÕ THƯỜNG LAN

Trường đại học Khoa học tự nhiên - ĐHQG Hà Nội

A. KRAUSE

Đại học Tổng hợp Geneve, Thụy Sĩ

Chalcone synthase là enzym quan trọng nhất trong con đường tổng hợp flavonoid. Enzym này được mã bởi các gen *chs* trong cùng một họ gen. Hoạt động của từng gen trong một họ thay đổi theo các mô tổ chức; phụ thuộc vào thời gian sinh trưởng và phát triển của cây cũng như các tác nhân bên ngoài như ánh sáng, tia UV, các vi sinh vật v.v. (Dixon and Lamb, 1990).

Flavonoid giữ nhiều vai trò khác nhau trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật. Đặc biệt một số hợp chất flavonoid có tác dụng như chất bảo vệ thực vật (phytoalexin) chống lại các tác nhân gây bệnh (Schmidt *et al.*, 1994). Tuy nhiên trong quá trình cộng sinh giữa *Rhizobia* và các cây họ đậu, hoạt động của một số gen *chs* được kiểm soát bởi vi khuẩn và flavonoid do rễ cây tiết ra được xem như tín hiệu hoạt hóa các gen vi khuẩn. Để tìm hiểu rõ hơn vai trò của CHS trong giai đoạn tương tác đầu tiên giữa *Rhizobia* và cây họ đậu, chúng tôi theo dõi hoạt động của các gen *chs* thông qua số lượng ARNm ở lông rễ và rễ cây Đậu đỏ (*Vigna unguiculata*) bị nhiễm *Rhizobium* sp. NGR 234.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Rhizobium sp. NGR234, *E.coli* mang plasmit và thực khuẩn thể phage được nuôi cấy theo Sambrook *et al.* (1989). Hạt đậu được rửa sạch, vô trùng vỏ; gieo nảy mầm và nhiễm với vi khuẩn theo phương pháp của Krause và Broughton (1992). Lông rễ nhiễm với *Rhizobium* hoặc xử lý với factor Nod hoặc một số hormone sinh trưởng được thu hoạch theo phương pháp của Krause (1994). Lá non, nụ hoa, lông rễ, rễ và nốt sần được sử dụng để tách chiết ARN tổng số.

Ngân hàng cDNA được xây dựng từ ARNm tách chiết ở lông rễ cây Đậu đỏ nhiễm với NGR234. Sau 3 lần sàng lọc 10^6 dòng cDNA của ngân hàng này với mỗi *chs*-cDNA (1,3 kb) của cây *Antirrhinum majus* (điều kiện lai ở 62°C với 3xSSC, 0,02% (w/v) ficoll, 0,02% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 0,01% (w/v) SDS. Sau đó màng lại được rửa 2 lần với 2xSSC và với 0,1xSSC), các dòng cDNA phân lập được đưa vào vectơ pBluescript II SK(+). Exonuclease III cắt cDNA tạo ra các đoạn ADN nhỏ hơn để dùng vào việc xác định trình tự nucleotit bằng phương pháp Sanger (Sequenase II, USB, Cleveland, OH, USA).

ADN genom cây Đậu đỏ được tách theo phương pháp của Schwarz-Sommer *et al.*, (1984). Các phép lai Southern được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Sambrook *et al.*, (1989).

ARN tổng số được tách chiết từ các tổ chức mô khác nhau như lá non, nụ hoa, lông rễ, rễ và nốt sần cây đậu nhiễm NGR234 theo phương pháp của Chandler *et al.*, (1983). Phép lai Northern được thực hiện ở 42°C trong 50% formamit (Sambrook *et al.*, 1989).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập và xác định dòng cDNA-VuCHS1 mã cho chalcone synthase:

Ba dòng cDNA có kích thước như nhau (~ 1,4 kb) được sàng lọc từ ngân hàng cDNA của lông rễ nhiễm NGR234. Trình tự nucleotit ở hai đầu 5' và 3' của các cDNA này được xác định cho thấy chúng giống nhau hoàn toàn. Vì vậy chỉ một cDNA-VuCHS1 được chọn để nghiên

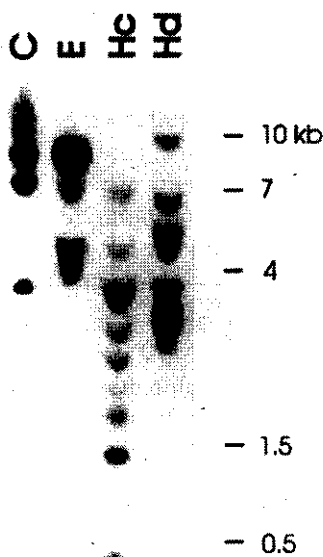
cứu sâu hơn. Clone VuCHS1 gồm 1415 bp tương ứng với khung đọc có 388 amino axit (Số đăng ký VuCHS1 trong ngân hàng dữ liệu là X74821). Trình tự nucleotit cũng như axit amin

của VuCHS1 có độ tương đồng cao với các gen *chs* trong ngân hàng dữ liệu thế giới (bảng 1). Tuy nhiên, độ tương đồng giảm mạnh ở các vùng không dịch mã tại hai đầu 5' và 3'.

Bảng 1

Độ tương đồng giữa VuCHS1 và các gen *chs* của các cây họ đậu

Cây họ đậu	cDNA- <i>chs</i>	Tương đồng ở mức độ ADN, %	Tương đồng ở mức độ protein, %	Tên bài báo liên quan
<i>Glycine max</i>	<i>Gmchs7</i>	87	92	Akada <i>et al.</i> , 1993
<i>Medicago sativa</i>	<i>Mschs9</i>	80	90	Junghans <i>et al.</i> , 1993
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Pvchalcsn</i>	87	95	Ryder <i>et al.</i> , 1987
<i>Pisum sativum</i>	<i>Pschs3</i>	78	90	Ichinose <i>et al.</i> , 1992
<i>Pueraria lobata</i>	<i>Plchs</i>	83	93	Nakajima <i>et al.</i> , 1991
<i>Trifolium subterraneum</i>	<i>Tschs5</i>	80	90	Howles <i>et al.</i> , 1995



Hình 1. Southern blots của ADN genome cây Đậu bồ được cắt bởi các enzym giới hạn khác nhau và được lai với mỗi nguyên vẹn VuCHS1 (*C-CLaI*; *E-EcoRI*; *Hc-HincII*; *Hd-HindIII*)

Tổ chức của các gen *chs* trong hệ gen cây Đậu bồ được xác định bằng phương pháp lai Southern. ADN genom được cắt với các enzym giới hạn khác nhau. Khi mỗi lai là cDNA-VuCHS1 nguyên vẹn, kết quả lai cho thấy các gen *chs* thuộc họ gen gồm nhiều gen (hình 1). Tuy nhiên khi mỗi lai chỉ là một đoạn ADN 200

bp đặc hiệu cho vùng không dịch mã ở đầu 5' và phép lai thực hiện trong điều kiện lai Northern (50% formalin, 42°C), kết quả cho thấy chỉ xuất hiện một băng lai ADN ứng với mỗi mẫu ADN genom cắt bằng một enzym giới hạn. Điều này cho phép kết luận chỉ có một bản sao của VuCHS1 trong hệ gen cây đậu.

2. Hoạt động của *chs* trong các mô tổ chức khác nhau:

Phép lai Northern sử dụng ARN tổng số tách chiết từ lá non, nụ hoa, lông rễ, rễ và nốt sần của cây đậu bồ cho phép nghiên cứu hoạt động đặc hiệu của các gen *chs* phụ thuộc vào mô tổ chức khác nhau. Kích thước 1500 nt của băng lai ARNm cho phép xác định VuCHS1 là một cDNA nguyên vẹn. Số lượng *chs*-ARNm nhiều nhất trong nốt sần và giả nốt sần (tạo ra do nhiễm với *Rhizobia* không có khả năng cố định nitơ ở cây Đậu (hình 2). Ngoài ra số lượng *chs*-ARNm ít hơn được tìm thấy trong nụ hoa và rễ. Điều này cho thấy hoạt động của các gen mã cho *chs* phụ thuộc vào các mô tổ chức khác nhau của cây Đậu.

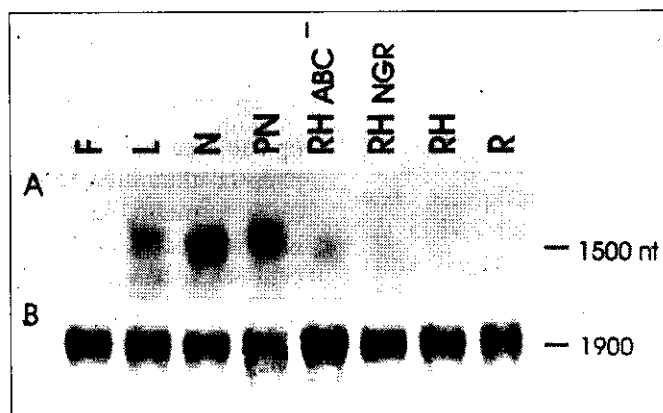
3. Hoạt động của CHS trong giai đoạn tương tác đầu tiên của cây Đậu bồ-NGR234:

ARN tổng số được tách chiết từ lông rễ và rễ nhiễm NGR234 dùng cho phép lai Northern. Số lượng *chs*-ARNm tăng lên trong lông rễ nhiễm vi khuẩn sau 24 giờ (hình 2). Cả loài đại

NGR234 và loài đột biến NGR234 Δ nod ABC (không có khả năng nhiễm do không sản xuất được factor Nod) đều có khả năng hoạt hóa gen *chs*. Đặc biệt loài đột biến có khả năng hoạt hóa mạnh hơn loài đại. Tuy nhiên sau 4 ngày nhiễm, số lượng *chs*-ARNm không phát hiện được trong lông rễ nhiễm loài đại và giảm mạnh đối với lông rễ nhiễm loài đột biến (bảng 2).

Đối với rễ nhiễm loài đại NGR234, số lượng *chs*-ARNm tăng sau 24 giờ và tiếp tục tăng sau 4 ngày nhiễm. Trong khi đó số lượng *chs*-ARNm chỉ tăng nhẹ và không đổi sau khi nhiễm với loài đột biến nodABC- (bảng 2). Kết quả

trên cho thấy hoạt động của *chs* diễn biến khác nhau ở lông rễ và rễ. Quá trình xâm nhập của *Rhizobia* được bắt đầu ở lông rễ. Phải chăng sau khi nhận được các tín hiệu đầu tiên từ vi khuẩn, gen mã cho CHS được kích thích ở lông rễ và tiếp tục hoạt hóa ở rễ tương ứng với giai đoạn hình thành con đường nhiễm và chuẩn bị phân bào nguyên phân trong vỏ rễ tạo nốt sần. Giả thiết này phù hợp với một số kết quả của các tác giả khác (Relic' *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1994). Nếu giả thiết này hợp lý thì trong họ gen *chs*, có gen đặc hiệu riêng biệt cho quá trình cộng sinh với *Rhizobia* hay không?



Hình 2. Hoạt động của gen mã cho CHS trong các mô tổ chức khác nhau và trong rễ nhiễm *Rhizobia*

F-nụ hoa; L - lá non; N-nốt sần; PN-giả nốt sần;

RN NGR-lông rễ nhiễm loài đại NGR234; RH ABC-lông rễ nhiễm loài đột biến;

RH-lông rễ đối chứng (được phun nước); R-rễ cây Đậu 4 ngày tuổi

Bảng 2

Thay đổi số lượng *chs*-ARNm trong rễ là lông rễ nhiễm *Rhizobia*

Mẫu	Lông rễ		Rễ	
	1 ngày	4 ngày	1 ngày	4 ngày
Đối chứng	nd	nd	nd	17%
NGR234	100%	nd	100%	254%
NGR234 Δ nodABC	183%	28%	52%	51%

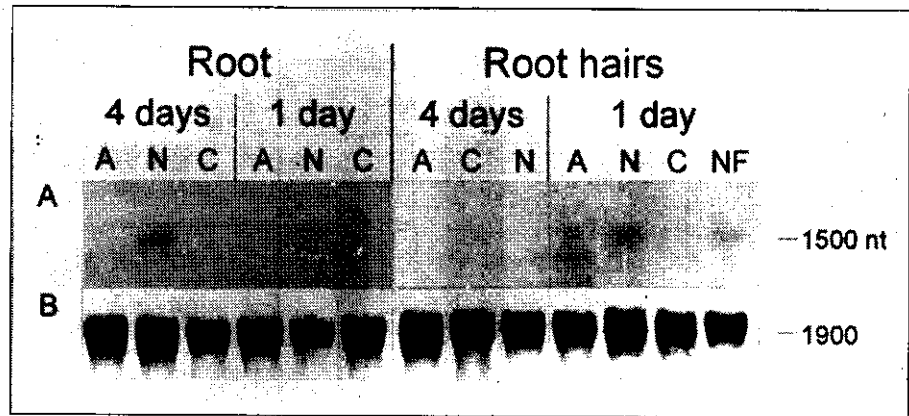
Số lượng *chs*-ARNm xác định được sau 24 giờ nhiễm loài đại được tính là 100%. nd: không phát hiện được

Để làm sáng tỏ phần nào câu hỏi trên, động học hoạt động của gen tương ứng với VuCHS1 trong lông rễ và rễ nhiễm *Rhizobia* được phân tích. Đoạn ADN khoảng 200 bp nằm ở vùng không dịch mã đầu 5' của VuCHS1 được dùng làm mẫu lai đặc hiệu trong các phép lai Northern (hình 3). Kết quả cho thấy số lượng VuCHS1-ARNm chỉ phát hiện được trong rễ sau 4 ngày nhiễm NGR234. Loài đột

biến không có khả năng hoạt hóa VuCHS1. Mặt khác số lượng VuCHS1-ARNm chỉ quan sát được trong lông rễ nhiễm cả hai loài sau 24 giờ. Như vậy hoạt động của VuCHS1 khác với kết quả nhận được với các gen trong họ *chs*. Rõ ràng gen VuCHS1 được hoạt hóa đặc hiệu bởi *Rhizobia* và có một vai trò nhất định trong giai đoạn bắt đầu sự cộng sinh.

Loài đột biến có khả năng kích thích các gen *chs* nói chung và VuCHS1 nói riêng. Tuy nhiên động học hoạt động của các gen này không khác nhau. Điều đó được một số tác giả giải thích khi cho rằng cây phản ứng với loài đột biến *nodABC*- như tác nhân không có lợi cho cây (Estabrook và Sengupta-Gopalan, 1991; Groskopf *et al.*, 1993). Vì không có khả năng tạo factor Nod nên loài đột biến *nodABC*- không thể xâm nhập vào trong lông rễ và rễ. Tuy nhiên *nodABC*- vẫn có thể tạo ra được các tín hiệu khác đặc trưng cho *Rhizobia*, do đó loài này vẫn hoạt hóa VuCHS1.

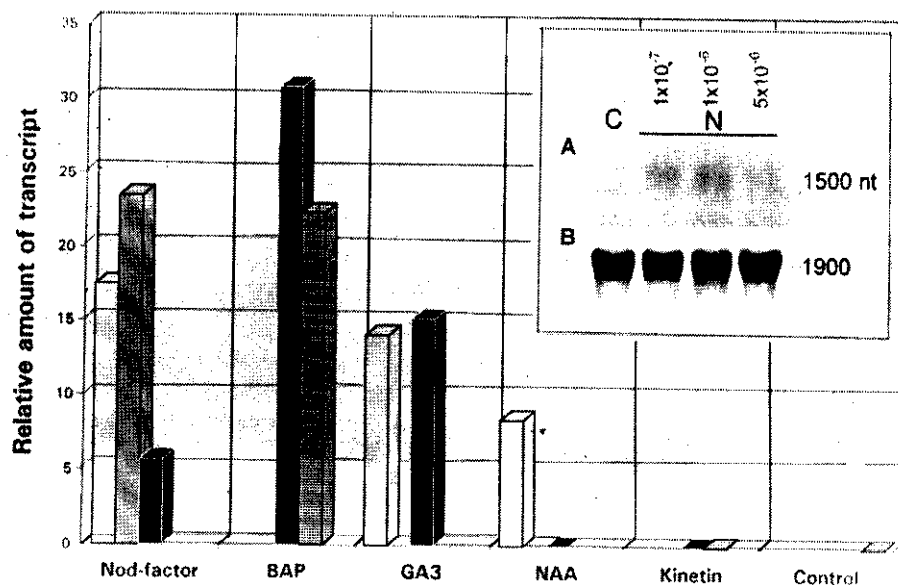
4. Ảnh hưởng của factor Nod và hormon lên hoạt động của *chs*:



Hình 3. Xác định số lượng VuCHS1-ARNm trong lông rễ và rễ cây Đậu bô.
C - lông rễ hoặc rễ đối chứng; N-lông rễ hoặc rễ nhiễm NGR234;
A-lông rễ hoặc rễ nhiễm *nodABC*; NF-lông rễ được phun với factor Nod 10^{-6} M

Factor Nod được xem là phân tử duy nhất giữ vai trò quyết định nhất cho quá trình cộng sinh (Fellay *et al.*, 1995; Spaink *et al.*, 1994). Ở nồng độ $< 10^{-13}$ M, factor Nod NGR234 kích thích sự biến dạng của lông rễ trong khi với nồng độ cao hơn (10^{-6} - 10^{-7} M), xuất hiện các giả nốt sần (Relic' *et al.*, 1994). Vậy factor Nod có điều hòa hoạt động của các gen *chs* hay không? Kết quả trình bày trên hình 4 cho thấy hoạt động của *chs* phụ thuộc vào nồng độ factor Nod. Số lượng *chs*-ARNm nhiều tương ứng với nồng độ factor Nod cao. Sử dụng mẫu lai đặc hiệu 200 bp, factor Nod cũng hoạt hóa gen VuCHS1 tương tự. Như vậy, các gen mã cho CHS được hoạt hóa bởi factor Nod. Kết quả này phù hợp với một số tác giả khác (Kondorosi *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1994).

Ngoài ra hoạt động của các gen mã cho CHS cũng chịu sự điều khiển của các hormon BAP, GA3, NAA (hình 4). Điều lý thú là kinetin không có ảnh hưởng đến hoạt động của *chs*. Tuy nhiên cả hai hormon BAP và kinetin đều có khả năng gây ra giả nốt sần trên rễ cây Đậu bô (Relic' *et al.*, 1994).



Hình 4. Hoạt động của các gen *chs* trong lông rễ được phun với factor Nod và hocmon BAP (6-benzylaminopurine), GA3 (gibberellic) và NAA (naphtaleneacetic acid) ở các nồng độ khác nhau (cột đầu ứng với nồng độ 10⁻⁷ M; cột hai 10⁻⁶ M; cột ba 5 × 10⁻⁶ M)

III. KẾT LUẬN

Từ kết quả nhận được về hoạt động của các gen *chs* trong quá trình tương tác giữa *Vigna unguiculata*-NGR234, chúng tôi có một số kết luận sau:

- Các gen *chs* nằm trong một họ gen. Hoạt động của chúng được hoạt hóa bởi vi khuẩn cố định đạm *Rhizobium* sp. NGR234.

- Trong họ gen *chs* có các gen đặc hiệu (VuCHS1) được kiểm soát bởi vi khuẩn. Hoạt động của gen này phù hợp với quá trình diễn biến hình thành con đường nhiễm và cấu tạo nốt sần.

- Factor Nod kích thích hoạt động của các gen *chs*. Cường độ hoạt hóa tỷ lệ với nồng độ factor Nod.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akada S., Kung S., Dube S., 1993: Plant Physiol., 102: 321-323.
2. Dixon R. A., Lamb C. J., 1990: Annu. Rev. Plant physiol., Plant Mol. Biol., 41, 339-367.
3. Estabrook E. M., Gopalan C. S., 1991: Plant Cell, 3, 299-308.

4. Fellay R., Rochepeau P., Relic' B., Broughton W. J., 1995: Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathologica, Biochemical, Genetic and Molecular bases, 1, 199-220.

5. Grosskopf E., Ha D. T. C., Wingender R., Röhrig H., Szecsi J., Kondorosi E., Schell J., Kondorosi A., 1993: Mol. Plant-Microbe Interact, 6, 173-181.

6. Howles Pa., Arioli T., Weinman JJ., 1995: EMBAL Data Library Release 42, Accession No. L24517.

7. Iichinose Y. X., Kawamata S., Yamada T., AN C., Oku H., 1992: Plant Mol. Biol., 18: 1009 - 1012.

8. Junghans H., Dalkin K., Dixon R. A., 1993: Plant Mol. Biol., 22, 239-253.

9. Kondorosi E., Schultze M., Savoure A., Hoffmann B., Dudits D., Pierre M., Allison L., Bauer P., Kiss G. B., Kondorosi A., (1993): Advances in Mol. Genet. Plant-Microbe Interact., 143-150. E. W. Nester and D.P.S. Verma (eds).

10. Krause A., Broughton W. J., 1992: Mol. Plant-Microbe Interact., 5, 96-103.

11. Krause A., Sigrist C. J. A., Dehning I., Sommer H., Broughton W. J., 1994: Mol. Plant-Microbe Interact., 7, 411-418.
12. Lamb C. J., Lawton M. A., Dron M., Dixon R. A., 1989: Cell, 56, 215-224.
13. Lamb C. J., 1994: Cell, 76, 419-422.
14. Lawson CGR, Djordjevic MA., Weinmam JJ., Rolfe BG., 1994: Mol. Plant-Microbe Interact 7: 498-507.
15. Long S. R., 1989: Cell, 56, 203-214.
16. Jakajima O., Akiyama T., Hakamatsuka T., Shibuya M., Noguchi H., Ebizuka Y., Sankawa U., 1991: Chem. Pharm., Bull., 39: 1911-1913.
17. Relic' B., Fellay R., Lewin A., Perret X., Price N. P. J., Rochepeau P., Broughton W. J., 1993: New Horizons in Nitrogen Fixation. Palacios R., Mora J. and Newton W. E. (eds). Dordrecht, Kulwer Academic Publishers, 183-189.
18. Relic' B., Perret X., Estrada-Garcia M. T., Kopcinska J., Golinowski W., Krishnana H. B., Pueppke S. G., Broughton W. J., 1994: Mol. Microbiol., 13, 171-178.
19. Ryder TB., Hedrick SA., Bell JN., Liang X., Clouse SD., Lamb CJ., 1987: Mol. Gen. Genet., 210: 219-233.
20. Schmidt PE., Broughton W. J., Werner D., 1994: Mol. Plant-Microbe Interact 7: 384-390.

INDUCTION OF CHALCONE SYNTHASE EXPRESSION BY *RHIZOBIA* AND NOD FACTORS IN ROOT-HAIRS

VO THUONG LAN, A. KRAUSE

SUMMARY

Molecular analysis showed that in *Vigna unguiculata*, chalcone synthase (CHS) is encoded by a gene family. The inoculation with *Rhizobium* sp. NGR234 or with the Nod-mutant NGR Δ *nodABC* induced, within 24 hrs the accumulation of *chs*-mRNAs in roots and root-hairs. Four days after the inoculation with the wild-type however, the CHS transcript levels increased in roots but decreased in root-hairs. The use of a region unique to the 5' end of a specific CHS gene (VuCHS1) showed that increases of transcript levels in root-hairs 24 hrs after the inoculation were specific to this transcript. Rhizobial Nod-factors induced the accumulation of transcript indicating that these compounds might be part of the signal transduction pathway leading to CHS expression in response to the inoculation of plant roots by *rhizobia*.

Ngày nhận bài: 2-6-1999

NHÂN BẢN PHÔI BÒ HÀ - ẤN BẰNG CẤY NHÂN TẾ BÀO SINH DƯỠNG

BÙI XUÂN NGUYỄN, LÊ VĂN TY, BÙI LINH CHÌ, NGUYỄN HỮU ĐỨC,
ĐỖ QUỲNH SƠN, NGUYỄN THÙY ANH, NGUYỄN THỊ ƯỚC

Viện Công nghệ sinh học

Công nghệ nhân bản động vật có vú từ tế bào sinh dưỡng đã được Tiến sĩ Wilmut và cs thực hiện thành công lần đầu tiên vào năm 1997 [1]. Trong công trình nghiên cứu này, tác giả đã cấy nhân tế bào tuyến vú được phân lập từ cừu cái Finn Dorset vào 227 trứng đã loại nhân của giống cừu Scotlen mặt đen (scottish blackface), sau đó dùng xung điện để kích thích và thu được 19 phôi phát triển đến giai đoạn phôi dâu-phôi nang. Kết quả của thí nghiệm này là sự ra đời của cừu Doilly nổi tiếng.

Ngay sau công bố của Tiến sĩ Wilmut, việc nghiên cứu nhân bản động vật đã được nhanh chóng triển khai tại Pháp, Mỹ, Nhật Bản, Canada, Úc, Tân Tây Lan, Nam Triều Tiên, Trung Quốc ... [2]. Theo các công trình được công bố gần đây, việc nhân bản phôi bằng cấy nhân đã được thực hiện thành công với tế bào da và cơ [4, 5, 6, 7] tế bào thần kinh [6], tế bào cận noãn [3, 6].... Kết quả nhân bản động vật cũng đã được khẳng định thêm ở các loài bò [3, 4, 5], dê [7] và chuột nhắt [6]. Tỷ lệ trứng cấy nhân phát triển tới giai đoạn phôi dâu-phôi nang đã được nâng cao hơn nhiều so với thí nghiệm đầu tiên của Wilmut. Trong các nghiên cứu trên bò của Tsunoda và cs [3] tỷ lệ trứng cấy nhân phát triển tới giai đoạn phôi dâu-phôi nang đã đạt được mức tỷ lệ phôi dâu-phôi nang thu được bằng thụ tinh ống nghiệm (45 - 50%). Đặc biệt, trong thí nghiệm nhân bản chuột nhắt của Wakayama và cs, việc nhân bản lặp lại tới 3 thế hệ đã được thực hiện thành công và các chuột con ra đời bằng phương pháp này đều phát triển bình thường [6].

Tại Việt Nam, việc nghiên cứu nhân bản động vật có vú đang được tiến hành tại Phòng Sinh học Sinh sản và Phát triển, Viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia. Trên cơ sở các quy trình công

nghệ nuôi thành thực trứng và thụ tinh ống nghiệm đã được nghiên cứu có kết quả trong giai đoạn 1991-1997 (thực hiện với sự hỗ trợ của Chương trình Công nghệ sinh học 1991-1995 và Chương trình Nghiên cứu cơ bản 1996-2000), các thí nghiệm cấy nhân tế bào sinh dưỡng đã được triển khai từ năm 1998. Trong bài này, chúng tôi sẽ giới thiệu một số kết quả nghiên cứu nhân bản phôi đã được thực hiện thành công với tế bào sinh dưỡng từ da tai của bò Hà - Ấn.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tổng hợp quy trình nhân bản với các bước chuẩn bị tế bào sinh dưỡng (tế bào Cho), chuẩn bị trứng không chứa nhân (trứng Nhận), cấy nhân và nuôi phôi được nêu ở sơ đồ 1.

1. Chuẩn bị tế bào Cho:

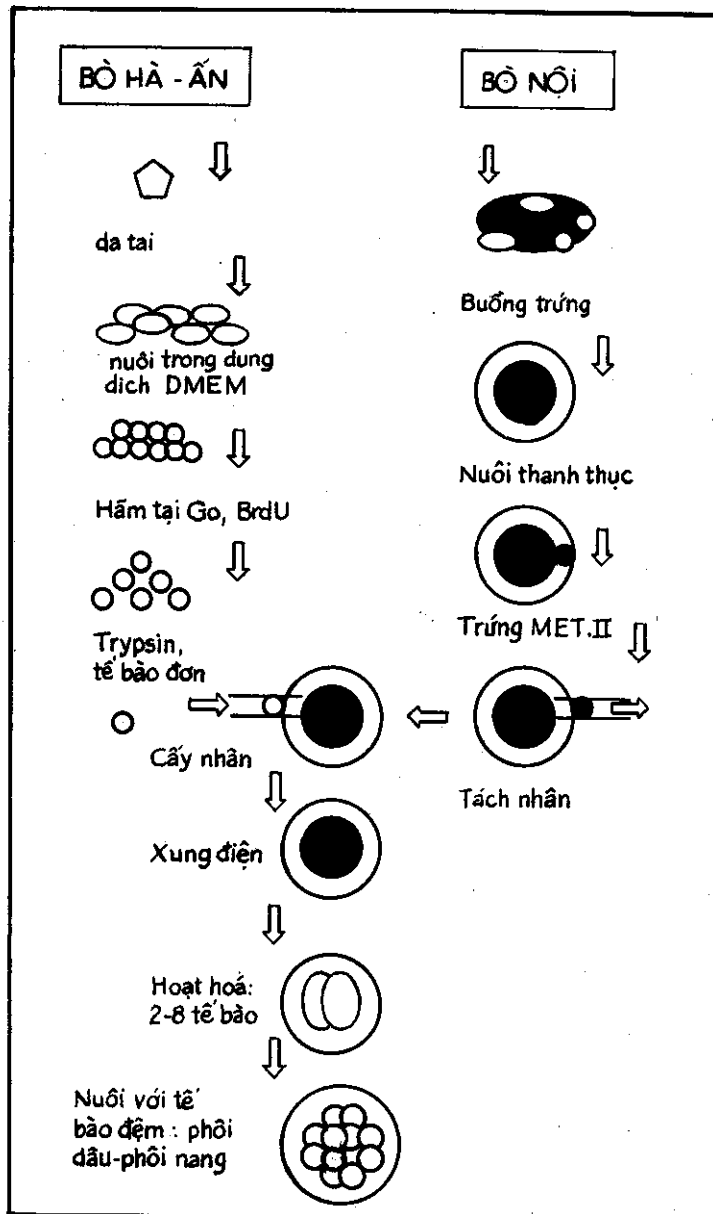
Tế bào cơ được phân lập và nhân lên từ mảnh da tai ($0,5 \times 0,5$ cm) của bò sữa lai Hà Ấn (F_2) và nuôi trong dung dịch DMEM cải tiến ở điều kiện 38°C , 5% CO_2 trong vòng 7-10 ngày, sau đó dùng dung dịch trypsin (0,25%) để tách rời các tế bào khỏi đáy buồng nuôi và chia thành các lô nhỏ để nuôi tiếp trong điều kiện tương tự trong thời gian từ 2 tới 4 ngày. Lặp lại các quá trình trên cho tới khi số lượng tế bào đã đạt mức cần thiết (50 - 100 triệu/bò) thì tách thành các lô nhỏ để chuẩn bị cấy nhân hoặc tiến hành đông lạnh và bảo quản ở -196°C . Mức độ ổn định về cấu trúc và số lượng nhiễm sắc thể của tế bào được kiểm tra bằng phương pháp nhuộm với Giemsa [8]. Các lô tế bào đủ tiêu chuẩn được sử dụng để nuôi tiếp trong môi trường nghèo huyết thanh cho tới khi khảo sát kháng thể kép và chất đánh dấu 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) cho kết quả hơn 90% số tế bào ở giai đoạn G_0 - G_1 .

2. Chuẩn bị trứng nhận:

Buồng trứng các giống bò nội được thu từ các lò mổ tại Hà Nội. Tổ hợp noãn và tế bào cận noãn (COC) được hút ra từ các nang có kích thước lớn hơn 1 mm và được chuyển vào nuôi thành thực trong môi trường TCM 199 cải tiến trong thời gian 24 giờ [9]. Kết hợp xử lý 0,5% hyaluronidase (Sigma) và pipet có khe hẹp để tách trứng khỏi các lớp tế bào cận noãn và chọn các trứng phát triển tới giai đoạn Metaphase II để tách nhân. Thao tác loại nhân được thực hiện bằng phương pháp cơ học với sự hỗ trợ của kính hiển vi thao tác (Alcatel) và các kim giữ (rộng 160 μm), kim cắt và kim hút (rộng 20 μm). Kết quả tách nhân được kiểm tra bằng phương pháp nhuộm mạnh cắt với Hoest 34322 và quan sát sự hiện diện của đĩa Metaphase dưới kính hiển vi huỳnh quang.

3. Cấy nhân và tạo phôi:

Chọn các lô tế bào Cho ở giai đoạn Go và dùng trypsin (0,25%) để xử lý tách rời tế bào, sau đó dùng kim tiêm (14 - 15 μm) để hút từng tế bào và cấy vào các trứng đã loại nhân. Chuyển các trứng đã cấy nhân vào buồng xung điện (L = 0,8 mm) và kích thích bằng trực tiếp (200 - 1500 V/cm, 20 - 25 μs). Sau khi xung điện, chọn các trứng có dấu hiện gắn tế bào và đưa vào nuôi trong môi trường nuôi có chứa Cycloheximide, sau đó chuyển qua môi trường nuôi phôi bình thường trong vòng 2 ngày và môi trường nuôi trên lớp tế bào biểu mô chuột trong 6 - 8 ngày [9].

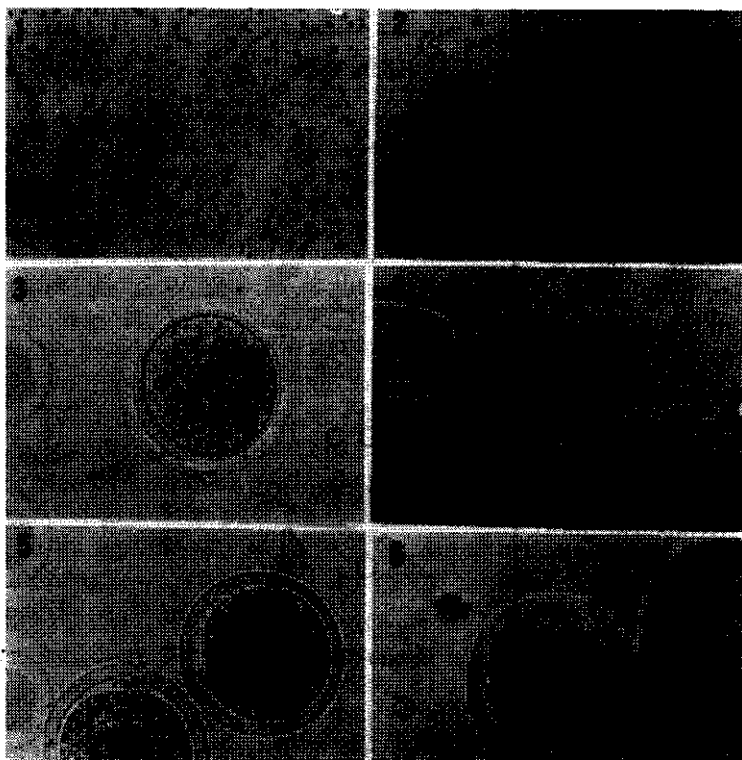


II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy 100% số mảnh cắt da tai có khả năng bám đáy đĩa nuôi và bắt đầu phân chia sau 7 - 10 ngày. Kiểm tra nhiễm sắc thể đồ của các tế bào ở thế hệ thứ 8 đến 16 cho thấy trên 98% số tế bào có nhiễm sắc thể đồ bình thường ($2n = 60$). Khoảng 1000 - 1500 triệu tế bào đã được nhân lên ở các thế hệ thứ 4 và thế hệ thứ 12 và được đông lạnh để bảo quản ở -196°C . Kết quả nuôi cấy tế bào đông lạnh sau giải đông cho thấy trên 60% tế bào có khả năng phân chia tiếp (hình 1). Kiểm tra trạng thái nhân thể bào bằng kháng thể kép anti-5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) cho thấy tỷ lệ tế

Sơ đồ 1. Quy trình tạo phôi nhân bản bằng công nghệ cấy nhân tế bào sinh dưỡng của bò Hà-Ấn vào trứng của bò nội

bào ở giai đoạn Go-G1 dao động từ 10 đến 20% đối với các lô tế bào nuôi bình thường và 80 - 90% đối với các lô tế bào được xử lý bỏ đói (hình 2). Kết quả này cho thấy các điều kiện nuôi trong môi trường nghèo đã đáp ứng được nhu cầu chuẩn bị tế bào làm nguyên liệu cấy nhân.



Hình 1. Tế bào mô được nhân in vitro từ mảnh da tai bò Hà - Ấn;

Hình 2. Tế bào mô bị hãm ở giai đoạn G0-G1: nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể ADN đặc hiệu (BrdU) cho kết quả âm tính;

Hình 3. Trứng bò phát triển tới giai đoạn Metaphase II sau 24 giờ nuôi thành thực in vitro;

Hình 4. Thao tác ghép nhân;

Hình 5. Trứng sau ghép nhân và kích thích xung điện;

Hình 6. Trứng phát triển đến giai đoạn phôi dâu-phôi nang vào ngày thứ 7 sau cấy nhân.

Kết quả nghiên cứu nuôi thành thực trứng cho thấy tỷ lệ trứng có hình thái tế bào cận noãn biểu hiện dấu hiệu thành thực có thể đạt hơn 80% (bảng 1). Kết quả quan sát trứng đã tách khỏi các tế bào cận noãn cho thấy tỷ lệ trứng có cực cấu đạt 81% (bảng 1). Trong số các tế bào trứng phát triển đến giai đoạn Metaphase II, số tế bào có cực cấu rõ và cấu trúc nguyên sinh chất đạt tiêu chuẩn làm trứng nhận đạt 90% (hình 3). Các trứng ở giai đoạn Metaphase II đã được chọn lọc để tách loại nhân và cho kết quả 98% trứng có cấu trúc nguyên sinh chất ở trạng thái bình thường sau thao tác loại nhân. Kiểm tra mảnh cắt qua soi huỳnh quang trong môi trường có Hoest 34322 và qua kỹ thuật nhuộm nhiễm sắc thể cho thấy tỷ lệ trứng rỗng (đã được loại nhiễm sắc thể) đạt 65%.

Bảng 1

Kết quả nuôi thành thực trứng bò nội và cấy nhân tế bào sinh dưỡng của bò Hà-Ấn

Số trứng nuôi thành thực n	Số phát triển tới Metaphase II n (%)	Số trứng cấy và ghép nhân n	Số được ghép nhân n (%)	Số phân chia 1-3 lần n (%)	Số phôi dâu phôi nang n (%)
294	238(81,0)	78	61 (78,2)	38 (48,7)	20 (25,6)

78 trứng đã được sử dụng để cấy nhân. Quan sát hình thái dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 400 lần cho thấy 61 trứng có cấu trúc nguyên vẹn và biểu hiện kết quả ghép dương tính sau lần xung điện thứ 3 (bảng 1, hình 5) và 38/61 trứng đã phân chia tới giai đoạn 4 - 8 tế bào vào ngày thứ 2 sau cấy nhân. 20 phôi đã phát triển tiếp đến giai đoạn phôi dâu-nang sau 6-7 ngày nuôi cấy invitro (bảng 1, hình 6). Quan sát cấu trúc tế bào, số lượng tế bào và tốc độ phân chia của phôi ở các thời điểm từ ngày 1 đến ngày thứ 6-8 cho thấy các phôi thu được bằng nhân bản có biểu hiện phát triển bình thường như các phôi được tạo ra bằng cách gây rụng trứng nhiều hoặc bằng thụ tinh ống nghiệm.

Với kết quả nghiên cứu của công trình này, lần đầu tiên ở Việt Nam, chúng ta đã thực hiện thành công thí nghiệm nhân bản phôi động vật có vú từ tế bào sinh dưỡng. Đây là công nghệ sinh học đang được nhiều phòng thí nghiệm và công ty công nghệ Y-Sinh trên thế giới và trong khu vực đầu tư nghiên cứu để triển khai ứng dụng trong giai đoạn 2000. Các kết quả nghiên cứu đã đạt được mở ra triển vọng phát triển ứng dụng công nghệ cấy nhân tế bào sinh dưỡng và tế bào phôi để hiện đại hóa công tác tạo giống gia súc và để bảo vệ đa dạng sinh học động vật ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wilmut I Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S., 1997: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*; 385: 810-813.
2. Wolf D. P., Meng L., Ely J. J., Stouffer R. R., 1998: Recent progress in mammalian cloning. *J Assist Reprod Genet*; 15: 235-239.
3. Kato Y., Tetsuya T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J-Y, Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y., 1998: Eight calves cloned from Somatic cells of a Single Adult. *Science*; 282: 2095.
4. Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F. A., Robl J. M., 1998: Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Sciences*; 280: 1256-1258.
5. Vignon X., Chesne P., Le Bourhis D., Flechon J. E., Heyman Y., Renard J. P., 1998: Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *CR Acad Sci II*; 321: 735-745.
6. Wakayama T., Perry A. C., Zuccotti M., Johnson K. R., Yanagimacji R., 1998: Fullterm development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*; 394: 369-374.
7. Yann Echelard and Framingham., 1999: *Biotechnology*; 17: 456-461.
8. Wang H. C. and Fedoroff S., 1972: Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biol. (Lond)*; 235: 52.
9. N. T. Ước, L. V. Ty, N. H. Đức, N. K. Tích, D. Đ. Long, H.N. Sơn, B. L. Chi, B. X. Nguyễn, 1999: Sản xuất phôi bò nội bằng thụ tinh ống nghiệm. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc lần thứ 3, Hà Nội: 934-936.

CLONING OF HA-AN BOVINE EMBRYOS BY NUCLEAR TRANSFER WITH ADULT SOMATIC CELLS

BUI XUAN NGUYEN *et al.*

SUMMARY

The production of bovine embryos by nuclear transfer with adult somatic cells was investigated. Fibroblast cells were obtained from the ear of Ha-An bovine and were multiplied by in vitro culture in DMEM for several passages. The immature oocytes of local bovine were obtained from the follicles of slaughter house-derived ovaries and were matured in the TCM-199 medium at 39°C in 5% CO₂. Oocytes with a first polar body were mechanically enucleated at 22-24 hrs after maturation and the chromosome removal was confirmed by the observation with Hoechst 33342 dye under ultraviolet light. A single cell was introduced into an enucleated oocyte through a slit in the zona pellucida and then electrically fused and

activated with direct current (DC) in the Zimmerman fusion medium. The fused oocytes were cultured in CR1-aa medium containing the cyclohexamide and then in the cyclohexamide-free medium and in the CR1-aa medium supplemented with mouse fetal fibroblasts. The rate of the successful enucleation and the fusion were respectively 90 and 78.2%. From fused oocytes, 48.7% were cleaved and 25.6% were developed to morula-blastocysts.

Key words: bovine, embryos, nuclear transfer, somatic cells.

Ngày nhận bài: 4-6-1999

(Tiếp theo trang 5)

THE OLIGOCHAETE FAMILY OCNERODRILIDAE BEDDARD, 1891 IN VIETNAM

THAI TRAN BAI

- Extramural calciferous glands present. No gizzard, one or two gizzards in VII, VIII.....3
- 2. Quadrithecal, pores at 7/8-8/9..... *Thatonia exilis*
- Bithecal, pores at 8/9..... *Malabaria levis*
- 3. Common openings of male and prostatic pores on XVII.....4
- Male pores on XVIII. One, two or three prostatic pores on XVII-XIX.....5
- 4. Male porophores on transversely elliptical disc. Clitellum on XIII-XXI..... *Nematogenia panamaensis*
- Male porophores not on transversely elliptical disc. Clitellum on XIV-XVIII.. *Ocnerodrilus occidentalis*
- 5. Calciferous gland unpaired, ventromedian in IX. 1-3 pairs of prostates opening on XVII-XIX.....
- *Gordiodrilus elegans*
- Calciferous gland paired, lateroventral in IX. 2 pairs of prostates opening on XVII and XIX.....6
- 6. Spermathecal pores in b-c. No genital marking on ventral line of XXI..... *Eukerria saltensis*
- Spermathecal pores in a-b. Genital marking usually having on ventral line of XXI.. *Eukerria kukenthalii*

Ngày nhận bài: 10-6-1999

ĐÁNH GIÁ GENOM CỦA MỘT SỐ DÒNG ĐẬU TƯƠNG ĐỘT BIẾN BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH TÍNH ĐA DẠNG CỦA ADN ĐƯỢC NHÂN BẢN NGẪU NHIÊN

CHU HOÀNG MẬU, NÔNG THỊ MAN

Trường đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

LÊ XUÂN ĐẮC, ĐINH THỊ PHÒNG, LÊ TRẦN BÌNH

Viện Công nghệ Sinh học

Khi đánh giá các giống cây trồng được tạo ra bằng các phương pháp chọn giống truyền thống người ta thường dựa chủ yếu vào sự biểu hiện các đặc điểm hình thái, năng suất và chất lượng của giống. Tuy nhiên, bản chất sinh học phân tử của các tính trạng chưa được nghiên cứu nhiều, vì vậy trong một vài năm gần đây trên thế giới và ở Việt Nam các nhà chọn giống đã ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để đánh giá bộ gen của thực vật, trong đó có kỹ thuật phân tích tính đa dạng của ADN được nhân bản ngẫu nhiên [*Random amplified polymorphic DNA (RAPD)*]... [1, 2, 4, 9, 10].

Những nghiên cứu gần đây cho thấy RAPD là một phương pháp có hiệu quả trong việc xác định kiểu gen genotyp, phân tích quần thể và nguồn gốc loài, nghiên cứu di truyền và lập bản đồ di truyền [7, 8]. Bài báo này đề cập đến những kết quả ứng dụng kỹ thuật RAPD vào công tác tạo giống đậu tương bằng phương pháp đột biến thực nghiệm nhằm đánh giá tính đa dạng sinh học trong phân tử ADN của các dòng đột biến tạo cơ sở cho quá trình chọn lọc những dòng có triển vọng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng 6 dòng đột biến được tạo ra từ giống đậu tương địa phương Lạng Sơn có ký hiệu là ML10, ML10, ML48, ML59, ML61, ML70, ML81 và đối chứng (giống gốc).

Mỗi dòng đậu tương đột biến và đối chứng chọn 300 hạt. Hạt đậu chọn để nghiên cứu đều chắc mẩy và có khả năng nảy mầm. Hạt được rửa sạch, khử trùng bằng cồn cho nảy mầm trên

đĩa petri, giữ ẩm bằng hai lớp giấy lọc. Khi được 3 ngày tuổi mầm dài 1-2 cm, thu lấy mầm và sử dụng 2-3 gam mầm để tách chiết ADN.

-Quy trình tách chiết ADN tổng số theo phương pháp của Foolad và cộng sự (1995) [3] có cải tiến.

Hóa chất sử dụng tách ADN bao gồm: Tris-base 1 M (pH 8,0); BME 14 M; NaCl 5 M; SDS 5%; EDTA 0,5 M pH 8,0; Clorofom: Isoamyl ancol (24 : 1); STAB; Isopropancol; etanol, TE (10 mM Tris-base + 1 mM EDTA).

Xác định hàm lượng ADN trên máy quang phổ model 825-2A của hãng Hewlett Packard. Kiểm tra chất lượng tách chiết phân tử ADN thu được thông qua điện di trên gel agarose 0,8%.

Phương pháp RAPD được thực hiện theo mô tả trong [3]. Thông thường đối với một đối tượng, phải tiến hành sàng lọc để chọn một số loại môi thích hợp [1]. Ở đậu tương chúng tôi tiến hành thí nghiệm sàng lọc với 10 môi ngẫu nhiên có độ dài 10 nucleotit có ký hiệu như sau: 142, 143, 159, RA31, RA36, RA40, RA45, RA46, RA50. Các môi ngẫu nhiên trên được tổng hợp nhờ máy Gene Assembler (Pharmacia) tại Viện công nghệ sinh học. Trình tự các môi được thiết kế dựa trên tài liệu của Monna và cộng sự [6].

Phản ứng RAPD được thực hiện trong 25 μ l dung dịch chứa 1xbuffer PCR; 1,9 mM $MgCl_2$; 100 μ M dNTP; 200 nM primer; 0,625 đơn vị *Taq* polymerase; 200 ng ADN mẫu. Sau đó tiến hành nhân bản trong máy PCR-Thermal Cycler PTC-100™ Programmable Thermal Controller

(MJ Research, Inc.,).

Chu trình nhiệt của phản ứng RAPD là: 1 chu kỳ 94°C 1 phút; 45 chu kỳ 92°C 1 phút, 35°C 1 phút, 72°C 2 phút; 1 chu kỳ 72°C 10 phút và lưu giữ ở 4°C.

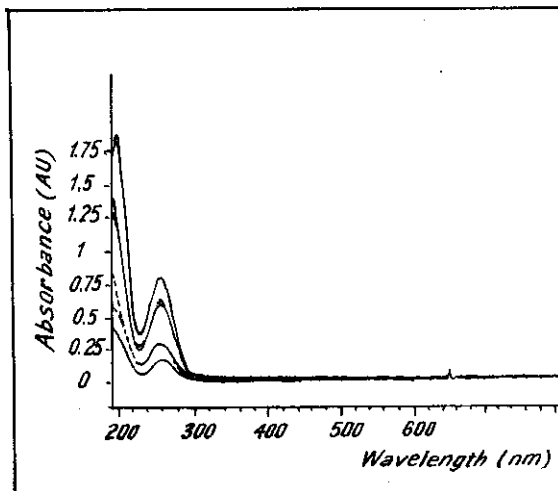
Sản phẩm RAPD được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5% trong đệm TBE. Nhộm gel bằng Ethidium bromid 0,5 µg/ml trong 15 phút, rửa sạch, soi và chụp ảnh dưới ánh đèn cực tím (Bio-Rad). Sự xuất hiện hay không xuất hiện của các phân đoạn ADN khi điện di sản phẩm RAPD của các dòng đột biến và đối chứng với các đoạn mỗi ngẫu nhiên được tập hợp thành bảng để phân tích số liệu theo nguyên tắc là số 1: xuất hiện phân đoạn ADN và số 0: không xuất hiện phân đoạn ADN. Các số liệu này được xử lý trên máy vi tính theo chương trình NTSYS pc version 2.0 (Applied Biostatistics Inc., USA, 1998), để lập ra biểu đồ so sánh sự khác nhau giữa các dòng đột biến với nhau và so với đối chứng ở mức phân tử.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

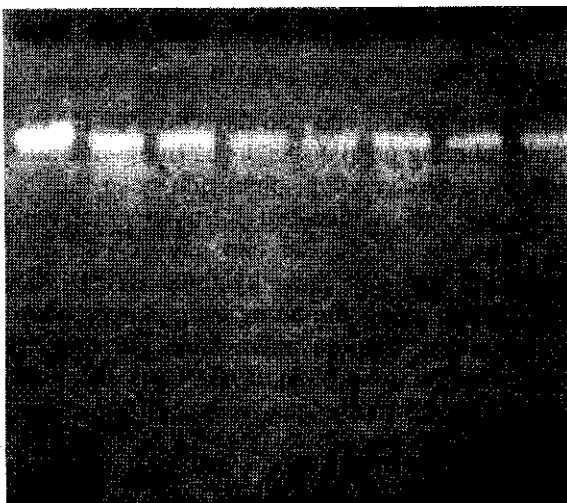
1. Tách chiết và tinh sạch ADN từ các dòng đậu tương đột biến và đối chứng:

Sáu dòng đột biến ML10, ML48, ML 59, ML61, ML70, ML81 có nguồn gốc từ giống đậu tương địa phương Lạng Sơn (đối chứng) đã được tiến hành tách chiết ADN từ mầm có độ dài 1-2 cm. Kiểm tra chất lượng tách chiết phân tử ADN cũng như việc xác định hàm lượng ADN của các dòng đột biến và đối chứng chúng tôi nhận được kết quả hình 1 và hình 2. Qua kết quả này chúng tôi thường thấy các mẫu ADN đều có chất lượng tốt đảm bảo cho những nghiên cứu tiếp theo. Cụ thể phổ hấp thụ ADN, của các dòng đột biến và đối chứng chỉ có một đỉnh duy nhất là 260 nm (hình 1) và hình ảnh điện di ADN trên gel agarose cho thấy một băng chính tập trung gần giống truyền mẫu (hình 2).

Kết quả tính toán cho thấy từ 2-3 gam mầm gây ngẫu nhiên từ mỗi dòng và đối chứng, chúng tôi đã thu được lượng ADN trong dung dịch tách chiết từ 1529 ng/µl đến 7912 ng/µl.



Hình 1. Phổ hấp thụ ADN tách chiết từ mầm đậu tương



Hình 2. Hình ảnh điện di ADN tách chiết từ mầm đậu tương

Thứ tự các mẫu thí nghiệm

1. ADN-λ chuẩn; 2. Đối chứng; 3. ML81;
4. ML10; 5. ML61; 6. ML70; 7. ML48;
8. ML59

2. Phân tích sự đa hình ADN của các dòng đột biến và đối chứng bằng kỹ thuật RAPD:

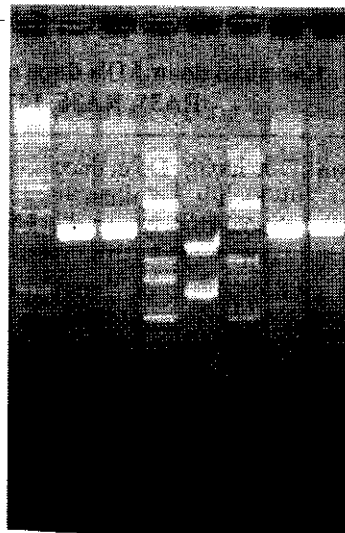
Sử dụng mười đoạn mỗi ngẫu nhiên có độ dài 10 nucleotit để phân tích mức độ thay đổi di truyền của các dòng đậu tương đột biến. Kết quả nhận được 3 trong số 10 đoạn mỗi có biểu hiện đa hình. Kết quả phân tích sản phẩm điện di phản ứng RAPD của các dòng đột biến và đối chứng với 3 mẫu RA31, RA36 và 142 được trình bày ở bảng 1.

Môi RA31

Kết quả điện di sản phẩm RAPD của các dòng đột biến với môi RA31 (hình 3) ít nhất có 22 phân đoạn ADN được nhận bản, kích thước các phân đoạn ADN được ước lượng từ 0,6-0,8 kb. Số phân đoạn ADN của các dòng đột biến và đối chứng dao động từ 8-14. Nét đặc biệt với đoạn môi RA31 là có phân đoạn ước tính khoảng 1,5 kb được nhận lên rất lớn ở đối chứng và các dòng ML81, ML10, ML59, ML48. Dòng ML61 có phân đoạn ADN hiển thị rất rõ trên băng điện di với độ dài ước tính khoảng 1,49 kb mà các dòng đột biến khác và đối chứng không có. Dòng ML61 có đặc điểm khác với các dòng đột biến khác và đối chứng là không phân cành ở đầu tương liên quan đến phân đoạn ADN được nhận có kích thước khoảng 1,49 kb, cần có những nghiên cứu sâu hơn để làm sáng tỏ điều này. So với đối chứng và các dòng đột biến khác thì hai dòng đột biến ML10 và ML70 có các phân đoạn mới xuất hiện với độ dài ước tính khoảng 2,0 kb; 1,9 kb; 1,4 kb; 1,38 kb; 1,35 kb và 0,83 kb. Đồng thời, ba dòng ML10, ML61, ML70 không xuất hiện 4 phân đoạn ADN với độ dài ước tính từ 5,1-8,0 kb.

Môi RA36

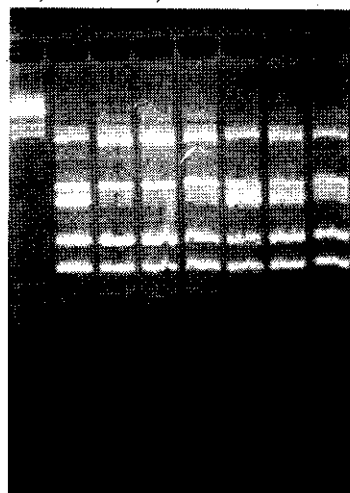
Kết quả phân tích điện di sản phẩm RAPD với đoạn môi RA36 (hình 4), cho thấy các dòng đột biến và đối chứng có số phân đoạn ADN được nhận từ 9-14 trong khoảng độ dài ước tính từ 0,5-2,5 kb. Các dòng đột biến ML81, ML10, ML61, ML59 xuất hiện mới phân đoạn ADN mới có kích thước khoảng 0,5 kb.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm RAPD của các dòng đột biến và đối chứng với môi RA31

Thứ tự các mẫu thí nghiệm

1. Thang ADN chuẩn: ADN thực khuẩn lambda được cắt bằng *EcoR I*+*Hind III*;
2. Đối chứng; 3. ML81; 4. ML10; 5. ML61; 6. ML70; 7. ML48; 8. ML59



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm RAPD của các dòng đột biến và đối chứng với môi RA36

Thứ tự các mẫu thí nghiệm

1. Thang chuẩn: ADN thực khuẩn lambda được cắt bằng *Hind III*; 2. Đối chứng; 3. ML81; 4. ML10; 5. ML61; ML70; 7. ML48; 8. ML59

Các phân đoạn ADN được nhân bản ngẫu nhiên trong phản ứng RAPD với các môi
RA31, RA36, 142 ở các dòng đậu tương đột biến và đối chứng

Các đoạn môi	Ước lượng kích thước, kb	Đoạn được nhân	Các dòng đột biến và đối chứng						
			Đối chứng	ML81	ML10	ML61	ML70	ML59	ML48
RA31	8,0	1	1	1	0	0	0	1	1
	7,0	2	1	1	0	0	0	1	1
	6,0	3	1	1	0	0	0	1	1
	5,1	4	1	1	0	0	0	1	1
	5,0	5	0	0	1	1	1	0	0
	4,9	6	1	1	1	1	1	1	1
	4,8	7	0	0	1	1	1	0	0
	2,5	8	0	0	1	0	1	0	1
	2,0	9	0	0	1	0	1	0	0
	1,9	10	0	0	1	0	1	0	0
	1,5	11	1	1	1	1	1	1	1
	1,49	12	0	0	0	1	0	0	0
	1,48	13	0	0	0	1	0	1	1
	1,43	14	1	1	1	0	1	0	0
	1,40	15	0	0	1	0	1	0	0
	1,38	16	0	0	1	0	1	0	0
	1,35	17	0	0	1	0	1	0	0
	1,33	18	0	1	1	1	0	1	1
	1,20	19	0	1	0	1	0	0	1
	0,98	20	0	0	1	0	1	1	0
	0,83	21	0	0	1	0	1	0	0
	0,60	22	0	1	0	0	0	1	1
RA36	2,5	1	0	0	1	1	0	0	0
	2,4	2	0	0	1	1	0	0	0
	2,3	3	1	1	1	1	1	1	1
	2,0	4	0	1	1	1	0	0	1
	1,9	5	1	1	1	1	1	1	1
	1,8	6	0	1	1	1	0	0	0
	1,7	7	1	1	1	1	1	1	1
	1,5	8	1	1	1	1	1	1	1
	1,4	9	1	1	1	1	1	1	1
	1,35	10	1	1	1	1	1	1	1
	1,30	11	0	1	0	1	1	1	1
	1,0	12	1	1	1	1	1	1	1
	0,9	13	1	1	1	1	1	1	1
	0,7	14	1	1	1	1	1	1	1
	0,5	15	0	1	1	1	0	1	0
	2,7	1	0	0	0	0	0	1	0
	2,6	2	0	1	1	1	0	1	1
	2,5	3	1	1	1	1	1	1	0
	1,4	4	0	0	0	0	1	0	1
	1,3	5	0	0	0	0	1	1	1
	1,2	6	1	0	0	1	0	1	0
	1,1	7	0	0	0	1	0	0	0
Tổng số phân đoạn được nhân		44	18	25	30	27	26	25	25

Môi 142

So với các môi RA31 và RA36 thì đoạn môi 142 có số phân đoạn ADN được nhân ít nhất, dao động từ 2-4 trong khoảng kích thước từ 1,1-2,7 kb. Dòng đột biến ML61 xuất hiện mới phân đoạn ADN ước tính khoảng 1,1 kb; còn dòng ML59 xuất hiện mới phân đoạn ADN ước tính khoảng 2,7 kb.

3. So sánh sự khác nhau giữa các dòng đột biến và đối chứng ở mức phân tử:

Dựa trên sự xuất hiện hay biến mất các phân đoạn ADN từ hình ảnh điện di trên gel 1,5% agarose đã thống kê ở bảng 2 (1 = xuất hiện; 0

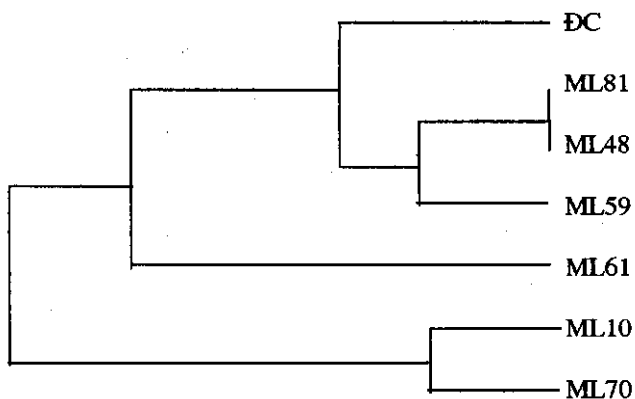
= không xuất hiện), các số liệu này được xử lý bằng chương trình phân tích NTSYS pc version 2.0 trên máy vi tính, kết quả nhận được hệ số đồng dạng di truyền ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy hệ số giống nhau của 6 dòng đột biến và với đối chứng dao động từ 0,43-0,86. Chín cặp có hệ số từ 0,5-0,69, bảy cặp có hệ số từ 0,7-0,77, hai cặp có hệ số từ 0,81-0,86. Trong đó cặp ML48 và ML81 có hệ số đồng dạng lớn nhất (0,86); còn cặp ML59 và ML10 có hệ số thấp nhất (0,43). Từ kết quả về hệ số đồng dạng di truyền của các dòng đột biến và đối chứng, chương trình xử lý NTSYS pc 2.0 đã thiết lập sơ đồ phả hệ ở hình 5.

Bảng 2

Hệ số đồng dạng di truyền của các dòng đột biến và đối chứng

Dòng đột biến và đối chứng	Đối chứng	ML81	ML10	ML61	ML70	ML59	ML48
Đối chứng	1,0000000						
ML81	0,7954545	1,0000000					
ML10	0,5000000	0,5681818	1,0000000				
ML61	0,5681818	0,7272727	0,7045455	1,0000000			
ML70	0,5909091	0,4772727	0,7727273	0,5227273	1,0000000		
ML59	0,7954545	0,7727273	0,4318182	0,5909091	0,5227273	1,0000000	
ML48	0,7500000	0,8636364	0,4772727	0,6918182	0,5227273	0,8181818	1,0000000



Hệ số

Hình 5. Biểu đồ so sánh các dòng đột biến và đối chứng ở mức độ phân tử khi sử dụng 3 đoạn môi RA31, RA36, 142

Sơ đồ hình 5 cho thấy các dòng đột biến chọn lọc khác nhau và khác với đối chứng. Hai

dòng ML81 và ML48 giống nhau nhiều hơn cả nhưng vẫn có hệ số sai khác là 0,14 (1-0,86).

Dòng ML59 có hệ số sai khác với dòng ML48 là 0,18 (1-0,82) và khác với dòng ML81 0,23 (1-0,77); Ba dòng ML48, ML81, ML59 khác đối chứng với hệ số là 0,22 (1-0,78); dòng ML61 khác đối chứng và các dòng ML59, ML48, ML81 trung bình là 0,356. Dòng ML10 khác với dòng ML70 với hệ số là 0,23 (1-0,77), hai dòng này khác với đối chứng và khác các dòng đột biến khác nhiều hơn cả (1-0,53 = 0,47) cho nên được xếp riêng vào một nhánh. Như vậy, ứng dụng phương pháp đột biến thực nghiệm kết hợp với quá trình phân lập và chọn lọc các biến dị qua nhiều thế hệ đã tạo ra các dòng đột biến khác nhau và khác với giống gốc không chỉ ở những đặc điểm hình thái [5], mà còn ở mức phân tử.

III. KẾT LUẬN

- Đã tách chiết ADN của những dòng đậu tương nghiên cứu. Lượng ADN và độ tinh sạch đảm bảo cho việc thực hiện phản ứng RAPD và các nghiên cứu khác về ADN.

- Phân tích hiện tượng đa hình các phân đoạn ADN của các dòng đột biến và đối chứng bằng kỹ thuật RAPD cho thấy các đoạn môi RA31, RA36 và 142 có biểu hiện đa hình. Cụ thể đã xuất hiện mới một số phân đoạn ADN được nhân bản ngẫu nhiên hoặc một số phân đoạn ADN bị mất đi. Hiện tượng đa hình này chứng tỏ đã có sự thay đổi đáng kể trong genom của các dòng đột biến.

- Sơ đồ phả hệ biểu thị hệ số đồng dạng của 6 dòng đột biến và giống đậu tương địa phương Lạng Sơn được thiết lập với 5 nhóm xuất hiện ở mức độ sai khác từ 14% đến 47%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Trần Bình, 1997: Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng.

NXB Nông nghiệp, tr. 38-61.

2. Phan Văn Chi, Nguyễn Bích Nhi, Nguyễn Thị Ty, Tống Quỳnh Mai, 1997: Tạp chí di truyền học và ứng dụng số 4, tr. 15-18.

3. Foolad M. R., Siva A. and Rodriguer L.R., 1995: Applications of polymerase chain reaction (PCR) to plant genome analysis, in: Tissue and organe culture. Fundamental methods. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, p. 281-298.

4. Long Mao, 1995: Molecular Markers and Their Applications in Rice and Wheat. Dissertation for a degree of Doctor of Philosophy, p. 70-78.

5. Chu Hoàng Mậu, Đoàn Bích Liên, Nông Thị Man, Đào Việt Bắc, Lê Trần Bình, 1998: Tạp chí di truyền học và ứng dụng số 1, tr. 6-10.

6. Monna L., 1996: Determination of RAPD markers in rice and their conversion into sequence tagged sites (STSs) and STS-Spe primer. DNA Research 1, 139-148.

7. Vierling R., Nguyen H. T., 1992: Use of RAPD marker to determine the genetic relationships of diploid wheat genotypes. Theor Appl. Genet. 84, 835-838.

8. Weslh J., McClelland M., 1991: Fingerprin-ting genome using PCR with arbitrary primer. Nucleic acids Res. 18, 7213-7218.

9. Nguyễn Văn Uyển, 1995: Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật. Nhà xuất bản Nông nghiệp H. Tập I, tr. 48-60, tập II tr. 56-63.

10. Yu J., Nguyen H. T., 1994: Genetic varia-tion detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). Theor Appl. Genet, 87, 668-672.

(Xem tiếp trang 32)

ĐẶC ĐIỂM SINH THÁI, SINH HỌC CỦA LOÀI CHÂN KHỚP *RAILLIETIELLA ORIENTALIS* (HETT, 1915) SAMBON, 1922 (*PENTASTOMIDA*) KÝ SINH Ở RẮN

ĐẶNG TẤT THỂ

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Raillietiella orientalis là loài Chân khớp ký sinh thuộc lớp Pentastomida lần đầu tiên được nghiên cứu ở Việt Nam. Đây là loài ký sinh rất nguy hiểm đối với nhiều loài rắn, đặc biệt là một số loài rắn đang nhân nuôi phổ biến hiện nay như rắn Hồ mang (*Naja naja*), rắn Ráo trâu (*Ptyas mucosus*) v.v. *R. orientalis* có khả năng gây dịch ở quy mô lớn và giết chết hàng loạt vật chủ trong điều kiện nuôi nhốt. Vì vậy, nghiên cứu một số đặc điểm sinh thái, sinh học của *R. orientalis* để tạo cơ sở khoa học cho các biện pháp phòng trừ chúng là hết sức cần thiết và cấp bách, góp phần phát triển nghề nhân nuôi và bảo tồn bò sát, đáp ứng nhu cầu hiện tại cũng như lâu dài. Nhóm ký sinh này còn xa lạ với nhiều người, sinh thái, sinh học của chúng vẫn chưa được biết rõ, nên nghiên cứu này còn góp phần giới thiệu và bổ sung thêm hiểu biết về chúng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng phương pháp mổ khám toàn diện vật chủ để thu thập mẫu vật. Dùng phương pháp gây nhiễm nhân tạo ký sinh trùng cho vật chủ để nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, sinh thái. Động vật thí nghiệm được chuẩn bị như sau: Rắn Hồ mang (*Naja naja*) được ấp nở từ trứng và gây nhiễm ký sinh trùng khi rắn đạt 3-5 tháng tuổi. Mổ khám 1/3 số Cóc (*Bufo melanostictus*) thí nghiệm để kiểm tra Cóc không nhiễm *R. orientalis*. Động vật thí nghiệm được nuôi dưỡng đảm bảo không bị nhiễm *R. orientalis* ngoài ý muốn trong quá trình thí nghiệm. Trứng *R. orientalis* lấy từ tử cung con cái ký sinh ở rắn Hồ mang. Sau khi gây nhiễm, định kỳ mổ khám vật chủ để theo dõi sự phát triển của *R. orientalis*. Xét nghiệm trứng *R. orientalis* trong phân rắn để xác định thời gian chín sinh dục. Phân tích và xử lý theo phương pháp toán sinh học các số liệu quan sát, xét nghiệm và thống kê nhằm thiết lập mối tương

quan giữa một số yếu tố môi trường, vật chủ và quần thể ký sinh. Ảnh hưởng qua lại giữa vật chủ và ký sinh trùng được nghiên cứu qua bệnh lý, bệnh tích của vật chủ và sự phát triển của ký sinh trùng.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Sự ký sinh và di chuyển của *R. orientalis* trong cơ thể vật chủ chính:

Mổ khám 111 rắn Hồ mang thu thập từ tự nhiên (bảng 1), có 44 rắn (39,64%) nhiễm 274 cá thể *R. orientalis* với cường độ nhiễm từ 1-50 cá thể (TB: 6,2 cá thể/rắn). Mổ khám 39 rắn Hồ mang nuôi nhốt tập trung (bảng 2), có 37 rắn (94,87%) bị nhiễm 996 cá thể *R. orientalis* với cường độ nhiễm từ 2-222 cá thể (TB: 27 cá thể/rắn). Phân tích tỷ lệ nhiễm và độ tuổi của *R. orientalis* theo cơ quan vật chủ từ bảng 1 và bảng 2 cho thấy:

- *R. orientalis* trưởng thành ký sinh ở cơ quan hô hấp của vật chủ (khí quản, phổi, túi phổi). Một số cá thể trưởng thành ở dạ dày và ruột có thể do rắn nuốt xuống khi chúng di chuyển lên miệng rắn. Tuy nhiên vị trí ký sinh và sự di chuyển của *R. orientalis* còn phụ thuộc vào tuổi và mật độ của vật ký sinh. Khi tỷ lệ và cường độ nhiễm của rắn cao thì tỷ lệ và cường độ nhiễm theo các cơ quan đều cao hơn nhiều, nghĩa là rắn bị nhiễm đồng thời nhiều cơ quan, đặc biệt là cường độ ấu trùng ở ruột và thận tăng rất cao.

- Ấu trùng *R. orientalis* phân bố ở tất cả các cơ quan bị nhiễm, nhưng khi tỷ lệ ấu trùng tăng lên cao thì các cơ quan không thuộc hệ hô hấp như dạ dày, ruột, thận sẽ bị nhiễm ấu trùng với tỷ lệ và cường độ cao hơn rõ rệt. Ấu trùng chui lủi vào sâu trong những mô mềm tạo ra rất nhiều các vết sẹo hoặc nhú sẹo trên bề mặt mô.

Bảng 1

Tỷ lệ nhiễm và độ tuổi của *R. orientalis* theo cơ quan của rắn Hồ mang sống trong tự nhiên

Cơ quan bị ký sinh	Số cá thể rắn nhiễm <i>R. orientalis</i>	Số lượng cá thể <i>R. orientalis</i>			Tỷ lệ (%) / tổng số <i>R. orientalis</i>
		Trưởng thành	Non	Ấu trùng	
Khí quản	2	1	2	0	1,09
Phổi	15	24	22	18	23,36
Túi phổi	25	127	67	4	72,26
Dạ dày	2	1	1	0	0,73
Ruột	3	1	1	5	2,57
Tỷ lệ (%)		56,20	33,94	9,85	

Bảng 2

Tỷ lệ nhiễm và độ tuổi của *R. orientalis* theo cơ quan của rắn Hồ mang nuôi nhốt tập trung

Cơ quan bị ký sinh	Số cá thể rắn nhiễm <i>R. orientalis</i>	Số lượng cá thể <i>R. orientalis</i>			Tỷ lệ (%) / tổng số <i>R. orientalis</i>
		Trưởng thành	Non	Ấu trùng	
Khí quản	4	9	0	0	0,90
Phổi	31	80	157	37	27,51
Túi phổi	23	224	144	99	46,89
Dạ dày	8	8	14	3	2,51
Ruột	9	2	13	124	13,96
Thận	8	0	6	76	8,23
Tỷ lệ (%)		32,43	33,53	34,04	

2. Hoạt động dinh dưỡng, bài tiết:

R. orientalis trưởng thành và non dinh dưỡng bằng máu của vật chủ. Khi hút máu ký sinh trùng thường cắn phần đầu vào mô phổi. Lượng máu bị hút khá nhiều, vì ruột của *R. orientalis* rất to và dài. Sau khi hút máu, *R. orientalis* thường di chuyển xuống túi phổi (do màng phổi kéo dài ra) nằm ở cuối phổi và máu trong ống ruột chuyển dần sang màu cafe. Hoạt động hút máu bắt đầu rất sớm, khi chiều dài cơ thể *R. orientalis* khoảng 1,5-1,7 mm, tương ứng với 60-70 ngày tuổi. Ấu trùng không có hoạt động hút máu, có lẽ chúng dinh dưỡng bằng chất dịch cơ thể vật chủ.

Hoạt động bài tiết rõ nhất là sự thải phân của *R. orientalis*, có thể thấy nhiều đám phân nhớt, màu cafe nằm rải rác ở khí quản, phổi và túi phổi của rắn bị nhiễm với cường độ cao. Một số cá thể *R. orientalis* trưởng thành không có máu trong ống ruột, chứng tỏ hoạt động hút và tiêu hóa máu của chúng có thời gian gián đoạn dài.

3. Hoạt động sinh sản:

R. orientalis phân tính, tỷ lệ cá thể đực và cái thường biến động tùy từng vật chủ, nhưng thống kê trên tất cả các vật mẫu thu được cho thấy tỷ lệ cá thể đực chiếm 57,32% và tỷ lệ cá thể cái là 42,68%. Tử cung của *R. orientalis* là

một ống lớn, gần như thẳng, chạy dài gần suốt cơ thể và không phân hóa chức năng theo từng phân đoạn. Trong tử cung luôn tồn tại đồng thời 3 dạng trứng: trứng non, trứng đang phát triển và trứng chín (chứa ấu trùng hoàn chỉnh). Tỷ lệ trứng chín biến động từ 25%-45%. Đặc biệt, tử cung có sự vận động nhu động rất mạnh cả về biên độ cũng như tần số, làm cho trứng ở các giai đoạn phát triển khác nhau được phân bố đều trong toàn bộ tử cung. Có thể *R. orientalis* có tập tính đẻ trứng ở phía trên khí quản của vật chủ, vì số lượng trứng của chúng trong phổi và túi phổi rất ít và một vài cá thể cái trưởng thành thường di chuyển lên phía trên khí quản vật chủ. Kết quả xét nghiệm trứng *R. orientalis* trong phân rắn cho thấy chúng chỉ đẻ ra trứng chín và đẻ rất ít trong mùa lạnh. Khả năng sinh sản của *R. orientalis* rất lớn, theo J. Riley (1982) một cá thể *R. orientalis* trưởng thành chứa trung bình khoảng 200.000 trứng.

4. Sự phát triển và thời gian chín sinh dục của *R. orientalis*:

Trứng non xuất hiện trong tử cung của cá thể cái sau khoảng từ 90 đến 120 ngày, nhưng trứng chín chỉ xuất hiện sau gây nhiễm từ 170

đến 190 ngày. Như vậy cần ít nhất khoảng 70 ngày để trứng non phát triển thành trứng chín.

Khả năng sống sót của trứng chín rất cao, sau 60 ngày nuôi trong điều kiện nhiệt độ từ 27 đến 34°C vẫn có trên 50% số trứng chín còn tồn tại trong môi trường đất ẩm và môi trường nước, đặc biệt còn tới khoảng 70% số trứng chín còn tồn tại sau 5 ngày để trên phiến kính khô. Gây nhiễm trứng *R. orientalis* (nuôi trong môi trường đất ẩm, biên độ nhiệt từ 27 đến 34°C) cho vật chủ trung gian là cóc và kết quả (bảng 3) cho thấy: trứng có khả năng nở rất sớm, chỉ sau khoảng một ngày hoặc sớm hơn. Tỷ lệ trứng nở tăng lên gần gấp đôi sau 5 ngày, từ 6,89% lên 13,43%. Nhìn chung, tỷ lệ và cường độ nhiễm *R. orientalis* của cóc thấp, nên có thể cóc không phải là vật chủ trung gian thích hợp nhất của chúng. Nhận xét này cũng phù hợp với kết quả xét nghiệm cóc sống trong tự nhiên, chỉ có 2/500 cóc nhiễm từ 1-2 ấu trùng *R. orientalis*. Gây nhiễm trứng *R. orientalis* (sau 3 ngày nuôi trên đất ẩm) cho 3 rắn hổ mang cũng chỉ cho tỷ lệ trứng nở hơn 9%. Như vậy, cũng có thể nghĩ rằng tỷ lệ trứng nở thấp là một đặc điểm sinh học của ký sinh trùng này.

Bảng 3

Ảnh hưởng của thời gian đối với khả năng nở của trứng

Số cóc gây nhiễm	Thời gian nuôi trứng, ngày	Số trứng gây nhiễm	Số cóc nhiễm ấu trùng	Tỷ lệ nhiễm (%)	Số ấu trùng thu được	Tỷ lệ trứng nở (%)
9	1	450	3	3/9	31	6,89
7	5	350	3	3/5	47	13,43
10	15	500	4	4/10	61	12,20
26		1300	11	45,83	139	10,69

Ấu trùng sinh trưởng và phát triển tương đối chậm. Ấu trùng tuổi một có kích thước cơ thể trung bình $0,209 \times 0,102$ mm, sau 30 ngày phát triển chỉ đạt kích thước $0,506 \times 0,293$ mm và khi 45 ngày tuổi cũng chỉ dài hơn 1 mm.

Để xác định sức sống của ấu trùng sau khi thoát khỏi cơ thể vật chủ, chúng tôi tiến hành nuôi ấu trùng trong dung dịch sinh lý, ở điều kiện nhiệt độ từ 27 đến 35°C. Kết quả cho thấy

khả năng sống của ấu trùng phụ thuộc vào tuổi của chúng, ấu trùng tuổi một chỉ sống từ 2 đến 3 ngày, nhưng ấu trùng 45 ngày tuổi sống được từ 10 đến 12 ngày. Kết quả gây nhiễm ấu trùng 45 ngày tuổi cho rắn hổ mang cho thấy: tỷ lệ phát triển của ấu trùng trong cơ thể vật chủ chính rất cao (gần 85%), nhưng sức sống của chúng giảm nhanh theo thời gian ở ngoài vật chủ, chỉ còn gần 14% phát triển được sau 48 giờ (bảng 4).

Khả năng phát triển của ấu trùng *R. orientalis* khi ở ngoài vật chủ

Số rắn gây nhiễm, con	Thời gian nuôi ấu trùng, giờ	Số ấu trùng gây nhiễm	Số rắn nhiễm ký sinh trùng, con	Số cá thể <i>R. orientalis</i> thu được	Tỷ lệ phát triển (%)
3	4	90	3	76	84,44
3	48	50	3	7	13,72

Sau khi mất gai xâm nhập, ấu trùng cảm nhiễm sẽ chuyển sang giai đoạn non. Lúc đầu cơ thể non có khoảng trên 10 đốt, không còn các tế bào mầm và chúng đã bắt đầu hoạt động hút máu. Túi chứa tinh, túi phóng tinh và gai giao phối xuất hiện ở con đực khoảng 90 ngày tuổi, khi chiều dài cơ thể lớn hơn 3,5 mm. Túi chứa tinh phát triển khá to và chuyển sang màu trắng đục sau khoảng 120-135 ngày, khi chiều dài cơ thể con đực đạt từ 4,5 đến 5,5 mm, có thể đây là thời gian chín sinh dục của cá thể đực. Túi nhận tinh, buồng trứng xuất hiện khi chiều dài cơ thể con cái khoảng 5,7 mm. Tử cung có trứng non khi cơ thể dài khoảng 10-15 mm và ở độ tuổi khoảng 130 ngày. Trứng chín xuất hiện trong tử cung khi chiều dài cơ thể đạt từ 20 đến 30 mm. Thực nghiệm cho thấy trong mùa nóng từ tháng 5 đến tháng 11, cá thể cái đẻ trứng vào khoảng 180 ngày sau gây nhiễm.

5. Đặc điểm cấu trúc quần thể *R. orientalis* ở rắn hổ mang nuôi nhốt tập trung và trong tự nhiên:

Rắn hổ mang nuôi nhốt tập trung theo phương thức sau: Rắn được nhốt chung trong một diện tích nuôi hẹp khoảng 300 m², mật độ khoảng 2-3 rắn/m². Xung quanh chuồng nuôi có hệ thống rãnh chứa nước thường xuyên. Thức ăn của rắn chủ yếu là cóc (*Bufo melanostictus*). Rắn nuôi được bắt từ tự nhiên, trọng lượng ban đầu khoảng từ 0,2 đến 0,3 kg. Thời gian nuôi rắn từ 6 đến 12 tháng. Không có bất cứ một xử lý vệ sinh phòng dịch nào trước khi thả rắn vào chuồng nuôi. Rắn hổ mang tự nhiên được thu thập ở nhiều địa phương thuộc các tỉnh phía Bắc và mổ khám trong một vài tuần sau khi thu thập nhằm tránh nhiễm *R. orientalis* trong thời gian giam giữ rắn.

Tỷ lệ, cường độ nhiễm và tỷ lệ độ tuổi của

quần thể *R. orientalis* ở rắn hổ mang nuôi nhốt tập trung và thu thập từ tự nhiên trình bày trong mục 1 và bảng 1, 2 cho thấy:

- Tỷ lệ độ tuổi ấu trùng *R. orientalis* ở rắn nuôi nhốt tập trung cao hơn nhiều (34,04%) so với rắn trong tự nhiên (9,85%). Ngược lại, tỷ lệ *R. orientalis* trưởng thành ở rắn nuôi nhốt tập trung lại thấp hơn (32,43%) so với rắn trong tự nhiên (56,20%).

- Đặc điểm cấu trúc thành phần tuổi của quần thể *R. orientalis* ở rắn nuôi nhốt tập trung cho thấy rắn bị nhiễm ngày càng nhiều ấu trùng từ môi trường ngoài. Tỷ lệ ấu trùng cao trong mùa nóng, phản ánh mùa lây nhiễm chính của *R. orientalis*.

6. Tác hại của *R. orientalis* đối với vật chủ:

Do kích thước cơ thể lớn, móc bám to khỏe nên hoạt động di chuyển, neo bám của ký sinh trùng trong một cơ quan khá nhạy cảm là hệ hô hấp gây hai đáng kể cho vật chủ. Một số trường hợp các cá thể cái có kích thước lớn gây tác hại quản và mũi rắn, làm cho vật chủ chết đột ngột. Ấu trùng *R. orientalis* tuy có kích thước nhỏ nhưng ký sinh ở nhiều nội quan, đặc biệt chúng có tập tính chui rúc gây tổn thương cho mô vật chủ. Gây hai nghiêm trọng nhất của *R. orientalis* là hoạt động hút máu và bài tiết. Khi hút máu, ký sinh trùng gây ra các vết thương chảy máu khá nặng, *R. orientalis* hút nhiều máu của vật chủ và thải ra một lượng phân khá lớn. Rắn nhiễm nhiều ký sinh trùng này sẽ gây yếu, ít hoạt động, ít ăn mồi, thờ nhanh và thường có tiếng "ho". Khi rắn bị suy yếu, mất sức đề kháng sẽ tạo cơ hội cho sự nhiễm khuẩn phổi và dẫn đến cái chết. Vì vậy, phổi rắn khi chết thường có nhiều mủ và dính chặt vào thành cơ thể. Mùa phát bệnh của rắn nuôi nhốt tập trung vào giữa hè, nặng nhất vào mùa thu.

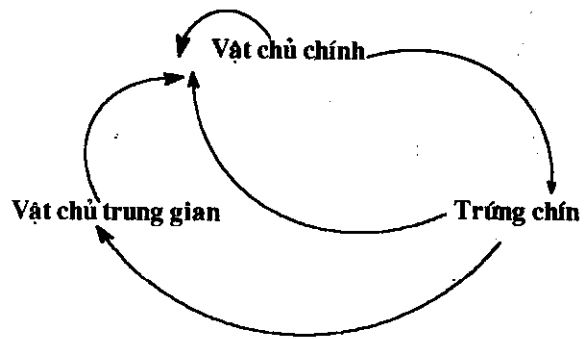
7. Vòng đời và con đường lây truyền của *R. orientalis*:

Vấn đề vòng đời, vật chủ trung gian và con đường lây truyền của *R. orientalis* cho đến nay vẫn chưa rõ ràng và còn nhiều ý kiến mâu thuẫn. Các nhà nghiên cứu trên thế giới cho rằng *R. orientalis* có vòng đời gián tiếp, lây truyền qua vật chủ trung gian và vật chủ chứa (gồm một số loài bò sát và lưỡng cư), hoặc tự nhiễm (auto-reinfection) bởi ấu trùng của chúng cho chính vật chủ đang ký sinh (A. Fain (1964), N.P. Salazar (1964) (theo J.H. Ali *et al.*, 1982), D. E. Deakins (1973).

Mổ khám 500 con cóc (*Bufo melanostictus*) được sử dụng làm thức ăn duy nhất cho số rắn hổ mang nuôi nhốt đã mổ khám, kết quả chỉ gặp 2 cóc bị nhiễm tổng cộng 3 ấu trùng *R. orientalis*. Tỷ lệ và cường độ nhiễm ấu trùng của cóc rất thấp như vậy là không phù hợp với tỷ lệ và cường độ nhiễm *R. orientalis* rất cao của rắn hổ mang. Vì vậy, có thể khẳng định rằng *R. orientalis* còn có con đường lây truyền khác nữa cho vật chủ chính. Để chứng minh cho giả thiết này, chúng tôi đã gây nhiễm cho 3 rắn hổ mang khoảng 500 trứng của *R. orientalis* sau 3 ngày nuôi trên môi trường đất ẩm. Kết quả thu được 47 cá thể ký sinh, từ non cho đến trưởng thành, ở cả 3 rắn thí nghiệm. Đây là thực nghiệm đầu tiên chứng minh *R. orientalis* có vòng đời trực tiếp.

Rắn hổ mang có chứa ấu trùng của *R. orientalis*, vì vậy chúng có vai trò như một vật chủ trung gian. Chúng tôi đã tiến hành gây nhiễm nhân tạo cho 2 rắn hổ mang với 50 ấu trùng *R. orientalis* thu được ở thận của rắn hổ mang khác. Kết quả đã thu được 11 cá thể ký sinh gần 120 ngày tuổi.

Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã phác họa vòng đời và con đường lây truyền *R. orientalis* như sơ đồ 1. Đối với rắn nuôi nhốt tập trung, con đường lây truyền trực tiếp của *R. orientalis* là chủ yếu, nên chúng có khả năng gây dịch. Có thể con đường lây truyền qua vật chủ chính chứa ấu trùng *R. orientalis* cũng rất đáng kể, vì nhiều loài rắn có thức ăn là các loài rắn khác hoặc chính đồng loại của chúng. Ngoài ra, một số tác giả khác trên thế giới còn cho rằng nhiều loài rắn có vai trò như vật chủ chứa của *R. orientalis*.



Sơ đồ 1. Vòng đời và các con đường lây truyền của *R. orientalis*

III. KẾT LUẬN

- *R. orientalis* trưởng thành ký sinh ở đường hô hấp, ấu trùng và con non ký sinh ở đường hô hấp và các nội quan trong khoang bụng vật chủ, chủ yếu ở thận và ruột. Hoạt động dinh dưỡng, bài tiết và di chuyển của ký sinh trùng gây tác hại chính cho vật chủ.

- Trứng *R. orientalis* có khả năng tồn tại lâu dài ngoài môi trường, ở nhiệt độ từ 27 đến 34°C, trên 50% số trứng chín còn tồn tại sau 2 tháng nuôi trong nước và trên đất cát ẩm và khoảng 70% số trứng còn tồn tại sau 5 ngày để khô trong không khí.

- Rắn hổ mang nuôi nhốt có tỷ lệ và cường độ nhiễm *R. orientalis* cao, đặc biệt là tỷ lệ ấu trùng và con non rất cao so với rắn sống tự nhiên và ngày càng cao theo thời gian nuôi nhốt. Mùa nóng là mùa lây nhiễm chính của *R. orientalis*.

- Lần đầu tiên vòng đời trực tiếp của *R. orientalis* được chứng minh bằng thực nghiệm. Trong vòng đời trực tiếp, giai đoạn ấu trùng kéo dài khoảng 70 ngày và *R. orientalis* đạt đến trưởng thành khoảng 180 ngày tuổi.

- Cóc (*Bufo melanostictus*) là vật chủ trung gian của *R. orientalis* và vật chủ chính đóng vai trò như vật chủ trung gian trong lây truyền *R. orientalis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ali J. H., Riley J. and Self J. T., 1982: A revision of the taxonomy of *Raillietiella boulengeri* (Vaney and Sambon, 1910) Sambon,

1910 *R. orientalis* (Hett, 1915) Sambon, 1922 and *R. agcoi* Tintangui and Masilungan, 1956 (Pentastomida: Cephalobaenida). Systematic Parasitology 4, 285-301.

2. Deakins D. E., 1973: Occurrence of encysted larval *Raillietiella* (Pentastomida) in an adult femal. Tran. Amer. Micros. Soc., 92(2): 287-288.

3. Đặng Tất Thế, 1999: Loài chân khớp *Raillietiella orientalis* (Hett, 1915) Sambon,

1922 (lớp Pentastomida) ký sinh ở rắn Việt Nam. Tạp chí Sinh học, tập 21, số 2B: 150-152.

4. Đặng Tất Thế, 1999: Hình thái, sinh thái, sinh học loài *Raillietiella orientalis* (Hett, 1915) Sambon, 1922 (Pentastomida) ký sinh ở rắn. Luận văn thạc sĩ.

5. Fain, A., 1961: Les Pentastomides de L'Afrique Centrale. Musee Royal de L. Afrique Centrale. Sciences Zoologiques No. 92: 9-15.

ECOLOGICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *RAILLIETIELLA ORIENTALIS* (HETT, 1915) SAMBON, 1922 (PENTASTOMIDA) PARASITIZING IN SNAKES

DANG TAT THE

SUMMARY

Raillietiella orientalis (Hett, 1915) Sambon, 1922 is a first parasite belonging to *Pentastomida* founded and researched in Vietnam. At the temperature from 27° to 34°C, more of 50% of its ripe eggs exist after 2 months reared in water and humid soil. The cobra in captivity is infected by *R. orientalis* with high rate and intensity, specially very high for the larvae. Definitive hosts of *R. orientalis* act like an intermediate host in transmission of *R. orientalis*. This is the first time that the direct life-cycle of *R. orientalis* is experimentally proven.

Ngày nhận bài: 24-4-1999

(Tiếp theo trang 26)

GENOMIC ASSESSMENT OF SOME SOYBEAN MUTANT LINES BY THE RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA TECHNOLOGY (RAPD-TECHNOLOGY)

CHU HOANG MAU, et al.

SUMMARY

The assessment of genome of some soybean mutant lines and the control by random amplified polymorphic DNA technology (RAPD technology) used the total genomic DNAs isolated from the seedlings of soybean. The segregation with 10 arbitrary primers showed 3 that of 10 primers (RA31, RA36, 142) generated polymorphic DNAs.

The significant differences between soybean mutant lines such as ML10, ML10, ML48, ML59, ML61, ML70, ML81 and original soybean seed were shown by the study of DNA polymorphism at molecular level using RAPD technology.

The appearance of 5 plant groups with difference from 14% to 47% has been compared with similar coefficient of soybean mutant lines.

Ngày nhận bài: 5-4-1999

VỀ PHERÔMÔN CỦA LOÀI XÉN TÓC RÂU VÀNG *PACHYTERIA FASCIATA* FAB. (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE) HẠI CÂY HỒNG XIÊM Ở TỈNH THỪA THIÊN-HUẾ

LÊ TRỌNG SƠN

Trường đại học Khoa học-Đại học Huế

Loài xén tóc râu vàng (*Pachyteria fasciata* Fab.) thuộc họ Xén tóc (Cerambycidae), bộ Cánh cứng (Coleoptera) hiện đang là đối tượng phá hại rất nghiêm trọng trên cây Hồng xiêm (*Manikara sapota* Linn.) ở Thừa Thiên- Huế. Nhân dân địa phương gọi chúng là "sùng đục thân" vì ấu trùng của loài xén tóc này đục sâu vào thân, cành làm cho cây bị héo, gãy và chết hàng loạt. Loài này có hai mùa xuất hiện và phá hoại trầm trọng nhất là vào tháng IV-VI và IX-X hàng năm. Những người làm vườn ở Thừa Thiên-Huế đã sử dụng nhiều loại thuốc hóa học rất độc hại nhưng hiệu quả phòng trừ không cao [2].

Việc nghiên cứu về pherômôn hấp dẫn sinh dục của loài này là một hướng mới có nhiều triển vọng nhằm phục vụ cho biện pháp đấu tranh sinh học, góp phần nâng cao hiệu quả phòng trừ và bảo vệ môi trường.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng 50 cá thể xén tóc đực và 50 cá thể xén tóc cái trưởng thành, khỏe mạnh. Dụng cụ nghiên cứu pherômôn là khứu giác kẻ cải tiến [1].

1. Xác định sự tiết pherômôn của con đực và con cái:

+ Dùng mẫu vật sống làm môi thử: chọn các con đực và cái khỏe mạnh, nhốt cách lý 24 giờ trước khi thí nghiệm (với mục đích làm tăng nồng độ của pherômôn trong mỗi cá thể). Sau đó lần lượt lấy con đực nhốt vào đĩa petri, đưa vào khứu giác kẻ cải tiến để hấp dẫn con cái và ngược lại.

+ Dùng môi thử là giấy thấm có chứa pherômôn được tinh khiết từ con cái (hoặc con đực). Quan sát phản ứng trả lời của xén tóc đực

(hay cái) trong 120 phút (là khoảng thời gian cần thiết để theo dõi hoạt động của chúng khi có tác động của pherômôn [6]).

2. Xác định vị trí của tuyến tiết pherômôn trên cơ thể xén tóc:

+ Trên cơ thể con đực: môi thử là giấy thấm có chứa pherômôn của các phần cơ thể (đầu, ngực, bụng) của xén tóc đực: con đực được nhốt riêng trong 24 giờ trước khi làm thí nghiệm, sau đó cắt cơ thể thành các phần đầu, ngực, bụng, lần lượt dùng các phần này để tinh chiết pherômôn thí nghiệm. Giấy thấm có pherômôn con đực được thí nghiệm cho 24 con cái, chia làm 3 lô. Quan sát phản ứng trả lời của con cái trong 120 phút. Tính giá trị trung bình.

+ Trên cơ thể con cái: bố trí thí nghiệm như của con đực, thay dịch chiết pherômôn là con cái và mẫu sống thí nghiệm là con đực [3].

3. Xác định vị trí phân bố của cơ quan nhận cảm pherômôn trên cơ thể xén tóc:

+ Trên con đực: dùng 24 con đực khỏe mạnh, nhốt riêng 24 giờ trước khi làm thí nghiệm. Chia làm 6 lô. Tiến hành cắt râu và cho thí nghiệm với con cái khỏe mạnh, nguyên vẹn có khả năng tiết pherômôn. Tính giá trị trung bình.

+ Trên con cái: thay đối tượng cắt râu là con cái, còn đối tượng hấp dẫn là con đực [5].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Sự tiết pherômôn ở xén tóc (Bảng 1)

Theo thiết kế sơ đồ thí nghiệm, khi sử dụng chất hấp dẫn nếu mẫu thử đi đến mức I lớn hơn 50% thì được cho là phát huy tác dụng. Như vậy

II + mức III + mức IV)%-50%. Chỉ số này cho ta biết mỗi thử có sức hấp dẫn (nhận giá trị dương) và có độ lớn là bao nhiêu? Yêu cầu của thí nghiệm là xác định về mặt định tính có hay không sự hấp dẫn của pherômôn sinh dục, nên chỉ xem kết quả thu được nếu là dương thì chứng minh được pherômôn tiết ra có tác dụng hấp dẫn, còn khi chỉ số này nhận giá trị âm thì ghi nhận không có sức hấp dẫn.

Qua kết quả thu được, sau khi phân tích, đánh giá, chúng tôi đưa ra kết luận như sau:

Chỉ số hấp dẫn của con đực sống: $m_1(\%) = 50\%$

Chỉ số hấp dẫn của dịch chiết pherômôn con đực: $m_2(\%) = 33,3\%$

Như vậy chỉ số hấp dẫn của con đực đối với con cái là:

$$A_m = (m_1 + m_2)/2 = (50,0 + 33,3)/2 = 41,65\%$$

Tương tự chỉ số hấp dẫn của con cái là: $f_1(\%) = 35,7\%$

Chỉ số hấp dẫn của dịch chiết pherômôn con cái: $f_2(\%) = 33,4\%$

Và chỉ số hấp dẫn của con cái đối với con đực là:

$$A_f = (f_1 + f_2)/2 = (35,7 + 33,4)/2 = 34,55\%$$

So sánh với kết quả của lô đối chứng A = -12,55% chúng tôi kết luận rằng đối với loài *P. fasciata* Fab. cả con đực và con cái đều tiết pherômôn hấp dẫn lẫn nhau, khả năng hấp dẫn của con đực đối với con cái mạnh hơn (hình 1).

Bảng 1

SIT	Môi	Số con	NĐD	NKT	ĐT	M.1	M.2	M.3	M.4
1	Con đực	18	0	0	0	0	0	37,50	62,50
2	D/c con đực	16	0	16,70	0	16,70	50	0	16,60
3	Con cái	17	0	0	14,30	14,30	0	0	71,40
4	D/c con cái	16	0	16,60	0	0	33,50	0	50,10
5	Đối chứng	18	30	26,25	6,30	0	6,25	31,25	0

Ghi chú:

NĐD: Tỷ lệ % cá thể đi đến nhánh đối diện

NKT: Tỷ lệ % cá thể đi đến nhánh kiểm tra

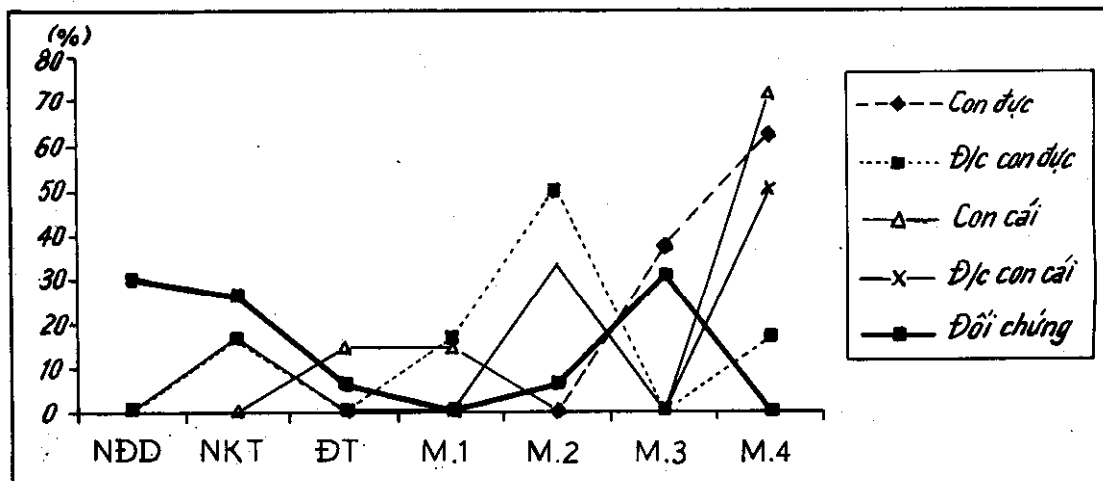
ĐT: Tỷ lệ % cá thể đi đến điểm thả

M.1: Tỷ lệ % cá thể đi đến mức 1

M.2: Tỷ lệ % cá thể đi đến mức 2

M.3: Tỷ lệ % cá thể đi đến mức 3

M.4: Tỷ lệ % cá thể đi đến mức 4



Hình 1. Đồ thị biểu diễn khả năng tiết pherômôn của *xén tóc*

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Doppelreiter (1995) trên loài xén tóc *Hypotrypes bajulus* [3] là ở chỗ: cả con đực và con cái cùng tiết ra pherômôn hấp dẫn lẫn nhau, tuy nhiên kết quả của chúng tôi ngược lại với kết quả thí nghiệm của Doppelreiter là khả năng hấp dẫn con cái đối với con đực mạnh hơn.

Midori Fukaya (1993) nghiên cứu ở loài *Psacotha hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae) đã chứng minh pherômôn tiếp xúc (contact pheromon) chỉ do con cái tiết ra [6]. Còn loài

Midoglus fryanus (Coleoptera: Cerambycidae) được Jose Maricio S. Bento xác định là chỉ có con cái tiết pherômôn [5].

Nghiên cứu ở loài sâu đục thân như (*Xylotrichus pyrhoderus*) (Coleoptera Cerambycidae) và những loài gần gũi trong giống này, Jose Maricio S. Bento nhận thấy con đực tiết ra pherômôn có khả năng hấp dẫn con cái trong một giới hạn rộng. Còn đối với loài *Hylotrpes baulus* (Coleoptera: Cerambycidae) thì cả con đực và con cái đều tiết ra pherômôn nhưng khả năng hấp dẫn con đực mạnh hơn [4]

2. Vị trí phân bố của tuyến tiết pherômôn trên cơ thể xén tóc (bảng 2):

STT	Môi	Số con	NĐD	NKT	ĐT	M.1	M.2	M.3	M.4
1	Đầu đực	8	0	0	0	0	62,50	12,50	25,00
2	Ngực đực	8	0	0	0	0	17,50	50,00	32,50
3	Bụng đực	8	12,50	25,00	0	0	50,00	12,50	0
4	Đầu cái	7	0	0	0	0	0	25,00	75,00
5	Ngực cái	7	0	0	0	0	0	24,50	75,50
6	Bụng cái	7	0	0	66,70	0	0	0	33,70

Chúng tôi nhận thấy nhánh kiểm tra và nhánh đối diện có rất ít con đi đến, chúng tỏ các phần đầu, ngực, bụng đều có khả năng chứa tuyến tiết pherômôn gây nên sự hấp dẫn. Tỷ lệ phần trăm ở các mức I, II, III IV cho thấy các con thử nghiệm đi thối và đứng lại ở đó. Đồng thời cũng qua kết quả ở bảng 2 cho thấy không có sự khác biệt thực sự ý nghĩa giữa phần đầu và ngực, nhưng có sự khác biệt lớn đối với phần bụng.

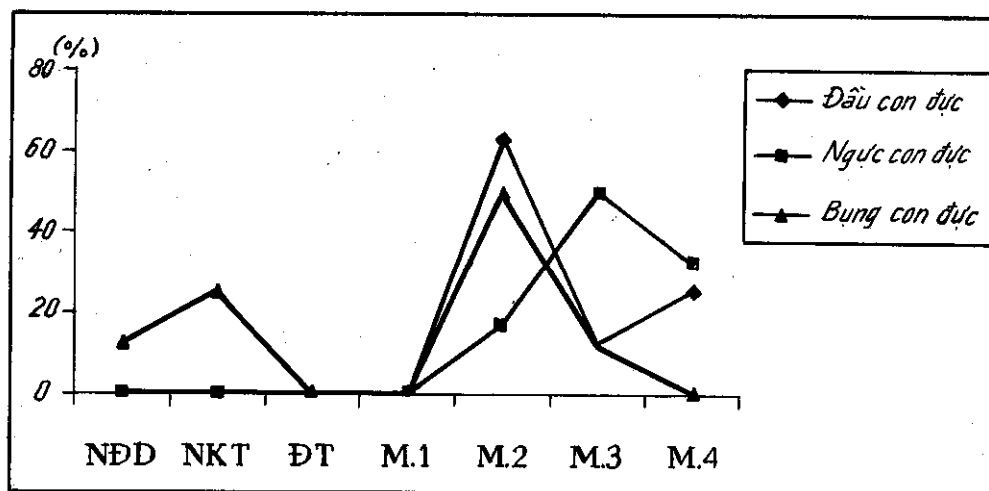
Kết quả thí nghiệm của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Jose Marigio S. Bento (1993) trên loài xén tóc *Midoglus fryanus* (Coleoptera: Cerambycidae): loài xén tóc này có vị trí phân bố chủ yếu của tuyến pherômôn ở phần ngực và đầu [5].

Tuyến pherômôn ở loài *Hylotrpes baulus* (Coleopteraoptera: Cerambycidae) được một số

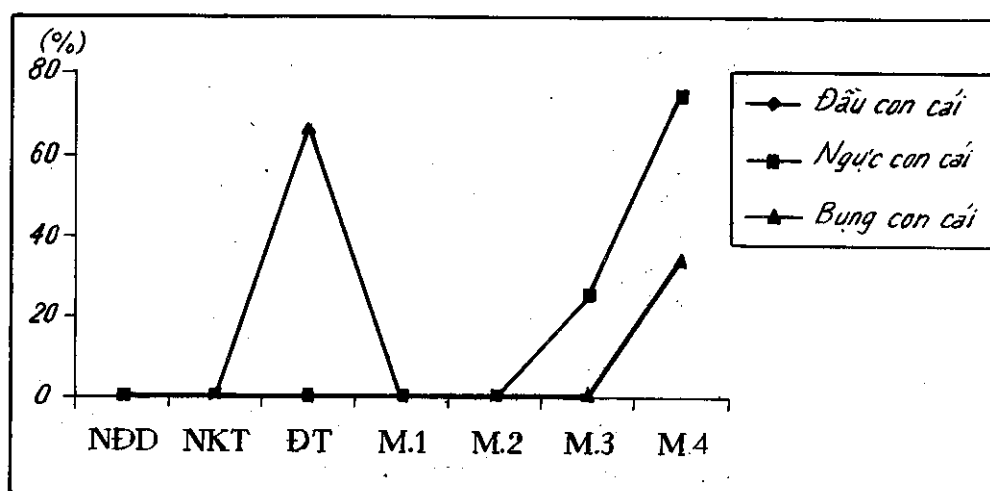
tác giả định vị là trên đốt ngực đã giải phẫu và xác định được cấu tạo hóa học của pherômôn loài này là hydroxy-2 hexano [3].

Jose Maricio (1993) khi nghiên cứu sự phản ứng của con đực đối với con cái của loài *Midoglus fryanus* đã quan sát thấy con cái kh tiết pherômôn ngoài thực địa chỉ để lộ phần đầu và ngực trên mặt đất và các tác giả này cho rằng vị trí của tuyến pherômôn phân bố chủ yếu trên đầu và ngực [4].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy số con thử nghiệm đến gần mức III, mức IV trong các lần thí nghiệm với môi là chất tiết từ phần đầu và ngực. Điều này cho phép nghĩ rằng tuyến tiết pherômôn của loài xén tóc này phar bố chủ yếu ở hai phần đầu và ngực. Riêng phần bụng tuyến phân bố rất ít hoặc không có (hình 2).



A (con đực)



B (con cái)

Hình 2. Đồ thị biểu diễn vị trí tiết pheromon ở xén tóc (A: con đực, B: con cái)

3. Về vị trí phân bố của cơ quan nhận cảm đối với pherômôn của xén tóc:

STT	Môi	Số con	NĐD	NKT	ĐT	M.1	M.2	M.3	M.4
1	Con đực	4	0	41,60	33,40	25,00	0	0	0
2	Con cái	4	0	50,00	50,00	0	0	0	0

Kết quả thí nghiệm ở bảng 3 cho thấy những con thử nghiệm sau khi đã cắt râu, không nhận cảm đủ thông tin về pherômôn từ phía đối phương. Cũng từ đó nhận xét ban đầu của chúng

tôi là cơ quan nhận cảm pheromon chủ yếu phân bố trên râu.

Kết quả chúng tôi cũng phù hợp với thí nghiệm của Quao Wang (1994) thực hiện cắt râu và phá hỏng mắt, cắt bỏ xúc biện hàm con đực và loài xén tóc *Paraglenea fortunii* (Coleoptera: Cerambycidae). Kết luận của Quao Wang cho thấy râu là cơ quan duy nhất cảm nhận pheromôn ở loài này và việc cắt bỏ râu đã làm giảm mạnh khả năng nhận cảm đối với pheromôn [7].

Khi nghiên cứu ở loài xén tóc *Acaloleta luxuriosa* Bates. (Coleoptera: Cerambycidae), Akusu và Kukubi (1983) cho biết thị giác của xén tóc không đóng vai trò khởi đầu trong việc nhận biết con cái của con đực. Theo Midori Fukaya (1996) đối với loài *Psacotha hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae) thì con đực bị hỏng mắt vẫn đến con cái và giao phối một cách bình thường [5].

III. KẾT LUẬN

1. Đối với loài *Pachytetia fasciata* Fab. cả con đực và con cái đều tiết pheromôn hấp dẫn lẫn nhau, khả năng hấp dẫn của con đực mạnh hơn đối với con cái.

2. Tuyến pheromôn phân bố chủ yếu ở phần ngực và đầu. Riêng ở phần bụng, tuyến phân bố rất ít hoặc không có.

3. Cơ quan nhận cảm pheromôn chủ yếu phân bố trên râu của con đực và con cái: chỉ có 25% được cho là có sự hấp dẫn cả ở con đực và con cái (mức I = 25%) ở thí nghiệm cắt râu. Như vậy tỷ lệ này là rất thấp so với thí nghiệm không cắt râu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bui Cong Hien, 1973: Physiologische

Wirkung and die mogliche biologische bedeutung von pheromonfaktoren and sonstigen auperin-dividuell wirksame Suubstanzen von *Trogoderma granarium* Everts Dissertation Dr. re. Nat.

2. Ngô Tuệ, 1998: Dự án diệt trừ sâu bệnh hại Sápôchè bằng phương pháp sinh học. Tài liệu lưu hành nội bộ. Hội những người làm vườn Huế: 2-14.

3. Doppelreiter, 1992: Contact pheromon of *Hylotripes jubatus* (Coleopter: Cerambycidae). Reproduction, representation et diffusion interdites. Loi du 1 et Jullier 1992.

4. Jose Maricio, S. Bento Francisco Evandro, Albino Terézinha, M. C. Della Lucia and Evaldro E. Vilela, 1992: Field traping of *Midolus fryanus* Westwood (Coleopter: Cerambycidae) using natural sex pheromon. Journal of chemical Ecology, Vol. 18, No. 2, 1992.

5. Jose Maricio, S. Bento Francisco Evandro and Rose T. S. Frightto, 1993: Male respond to natural pheromon of *Midolus fryanus* Westwood (Coleopter: Cerambycidae) female as affect by daily climatic factors. Journal of chemical Ecologist Vol. 19, No. 10, 1992.

6. Midori Fukaya, Tetsuya Yasuda, Sadao Wakamura and Hiroshi Honda, 1996: Reproductive biology of yellow-spotted longicorn beetle (*Psacotha hilaris* (Pascoc)), (Coleopter: Cerambycidae). Identification of contact pheromon on female body surface. Journal of chemical Ecology Vol. 22, No. 2, 1996.

7. Quao Wang, Jin-Song Li, 1992: Sex recognition by male and evidence for a female sex pheromon in *Paraglenea fortunei* (Coleopter: Cerambycidae).

(Xem tiếp trang 43)

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH LÝ, KHẢ NĂNG SỬ DỤNG DẦU DIEZEL VÀ TỔNG HỢP CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN *PSEUDOMONAS* XCK-MX1 PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THẢI NHIỄM DẦU TẠI VÙNG TÀU

ĐẶNG THỊ CẨM HÀ, NGUYỄN QUANG HUY,
PHƯƠNG PHÚ CÔNG

Viện Công nghệ sinh học

Chất hoạt động bề mặt sinh học mới chỉ được biết đến trong một vài thập kỷ gần đây. Chất hoạt động bề mặt sinh học có nhiều ưu điểm, nó được tổng hợp từ các nguồn nguyên liệu rẻ tiền, các phế thải của các ngành công nghiệp, được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp, nông nghiệp. Chất hoạt động bề mặt sinh học sử dụng trong công nghiệp xử lý dầu tràn, nâng cao hiệu suất khai thác dầu, công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm v.v., đặc biệt chất hoạt động bề mặt sinh học có thể bị phân hủy sinh học, không gây ô nhiễm môi trường [9, 10]. Chất hoạt động bề mặt sinh học góp phần thúc đẩy quá trình phân hủy nhiều hợp chất khác nhau đặc biệt là dầu mỏ và các sản phẩm dầu mỏ [8, 9, 10].

Các chi vi sinh vật như *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*... có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học và phân hủy dầu đã được đề cập trong nhiều nghiên cứu [2, 3, 7, 8].

Ở Việt Nam, trong giai đoạn công nghiệp hóa và hiện đại hóa đất nước việc nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật nói chung hay vi khuẩn có hoạt tính phân hủy dầu cao, tạo chất hoạt động bề mặt sinh học nói riêng đang bắt đầu được quan tâm. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu có tính hệ thống về vấn đề này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Đối tượng nghiên cứu là các loài vi khuẩn phân lập tại vùng ô nhiễm dầu ở Vũng Tàu và Bãi Cháy.

- Môi trường nuôi cấy: Môi trường LB (g/L chứa 10 g trypton, 5 g cao nấm men và 10 g NaCl; môi trường khoáng-MSM (g/L) chứa 0,1 g K_2HPO_4 ; 0,4 g $MgSO_4$; 3 g KNO_3 ; 0,7 g Na_2HPO_4 và 10 g NaCl, pH: 7-7,5.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl được tiến hành trên môi trường khoáng chứa 5% dầu diezen là nguồn năng lượng và carbon duy nhất [7].

- Khả năng phát triển của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp pha loãng đếm khuẩn lạc hay đo mật độ quang học ở bước sóng 660 nm.

- Khả năng sử dụng dầu và các thành phần dầu diezen theo phương pháp sắc ký khí và sắc ký trên cột silicagen oxit nhôm theo phương pháp Nelson 87.

- Thử hoạt tính chất hoạt động bề mặt sinh học được tổng hợp trên các môi trường theo phương pháp của M. Morikawa và cộng sự [4].

- Phân loại vi khuẩn theo phép thử sinh học API-20NE và so sánh trình tự gen 16S ARN.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập và một số đặc điểm hình thái sinh lý của chủng vi khuẩn XCK-MX1:

Tại các địa điểm ô nhiễm dầu ở Vũng Tàu và Bãi Cháy, chúng tôi đã phân lập được một số chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng dầu diezen và dầu thô. Khuẩn lạc của cả 9 chủng vi khuẩn đều có hình que, ngắn. XCK-MX1 trên môi trường thạch tạo khuẩn lạc có sắc tố xanh nhạt khác so với 8 chủng còn lại (bảng 1).

Kết quả bảng 1 cho thấy trong số 9 chủng vi khuẩn đã phân lập được, XCK-MX1 có khả năng sử dụng dầu diesel và dầu thô cao nhất. Qua các kết quả trên chúng tôi chọn XCK-MX1 cho các nghiên cứu tiếp theo.

XCK-MX1 là vi khuẩn Gram âm hình que, có 1 tiêm mao và đường kính khuẩn lạc từ 1,2 đến 2,5 mm. Các kết quả về kiểu hình, đặc điểm sinh lý hóa (theo phép thử API-20NE) cho thấy

XCK-MX1 có độ tương đồng tới 96,8% với với loài *Pseudomonas aeruginosa* [7, 8]. XCK-MX1 trong các nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy và cộng sự đã được phân loại theo khóa phân loại hiện hành và đọc trình tự gen 16S ARN cho thấy nó thuộc chi *Pseudomonas* với tỷ lệ tương đồng với loài *Pseudomonas aeruginosa* là 97% [7, 8].

Bảng 1

Một số đặc điểm hình thái, sinh lý của các chủng vi khuẩn phân lập ở Vũng Tàu, Bãi Cháy

STT	Ký hiệu	Nơi phân lập	Đặc điểm khuẩn lạc		Khả năng sử dụng	
			Hình dạng	Sắc tố	Diesel	Dầu thô
1	BT2-MX1	Vũng Tàu	Que, ngắn	Không	++	++
2	BS-MX1	Vũng Tàu	Que, ngắn	Không	++	++
3	XCK-MX1	Vũng Tàu	Que, ngắn	Xanh nhạt	+++	+++
4	TĐ-MX1	Vũng Tàu	Que, ngắn	Không	++	++
5	4PS	Bãi Cháy	Que, ngắn	Xanh đậm	+	++
6	16PS	Bãi Cháy	Que, ngắn	Xanh đậm	++	++
7	21PS	Bãi Cháy	Que, ngắn	Xanh đậm	++	++
8	QN1	Bãi Cháy	Que, ngắn	Xanh sáng	++-	++-
9	QN	Bãi Cháy	Que, ngắn	Xanh	++-	++-

Chú thích: (+): Khả năng sử dụng kém
(++): Khả năng sử dụng tốt

(++): Khả năng sử dụng dầu trung bình
(+++): Khả năng sử dụng dầu mạnh

Trong điều kiện tự nhiên nhiều yếu tố môi trường có ảnh hưởng đến quá trình phát triển và phân hủy dầu của các nhóm vi sinh vật.

Mặc dù vi sinh vật có khả năng sử dụng cacbuahydro đã được phân lập từ môi trường có nhiệt độ thấp từ -1°C đến nhiệt độ cao trên 70°C, nhưng nhiệt độ tối ưu cho quá trình chuyển hóa sinh học dao động trong khoảng 18-30°C. Đối với các sản phẩm dầu mỏ, theo R. Atlas nhiều chi vi khuẩn có khả năng sử dụng dầu phát triển tối ưu khoảng nhiệt độ từ 20 đến 40°C [1].

Bảng 2

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của chủng XCK-MX1

Nhiệt độ (°C)	4	20	30	40	55
Khả năng phát triển	-	+	+++	++	-

Chú thích: (-): Không phát triển
(+): Phát triển yếu

(++): Phát triển bình thường
(+++): Phát triển mạnh

Kết quả bảng 2 cho thấy XCK-MX1 có thể phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ trung bình từ 20 đến 40°C, nhiệt độ tối ưu là 30°C. Như vậy XCK-MX1 thuộc nhóm vi khuẩn ưa nhiệt trung bình. Hầu hết các loài thuộc chi *Pseudomonas* đều nằm trong nhóm vi khuẩn ưa nhiệt trung bình.

Các yếu tố môi trường khác như nồng độ muối NaCl và pH môi trường cũng có ảnh hưởng tới sự phát triển của vi sinh vật [1].

Bảng 3

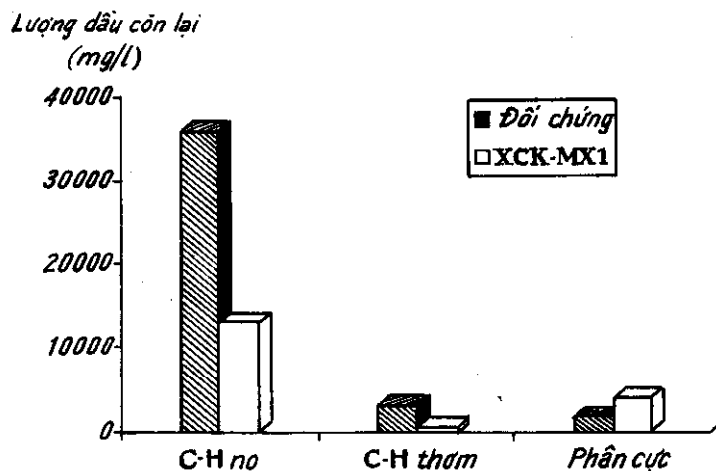
Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl và pH môi trường

Ảnh hưởng của nồng độ NaCl		Ảnh hưởng pH môi trường	
Nồng độ NaCl (%)	Khả năng phát triển (tế bào/ml)	Độ pH	Khả năng phát triển (tế bào/ml)
0	10^{12}	2	—
1	8×10^{12}	5	10^7
3	$4,2 \times 10^{10}$	7	6×10^{12}
5	12×10^9	8	7×10^{11}
7	2×10^8	9	3×10^7
10	12×10^7	12	—
20	—		

Chú thích: (—) Không phát triển

Từ kết quả bảng 3 cho thấy XCK-MX1 có thể phát triển tối ưu trong điều kiện pH môi trường từ 7 đến 8 và nồng độ muối NaCl từ 0 đến 1%. Ở nồng độ muối NaCl trên 1%, số lượng tế bào giảm chứng tỏ XCK-MX1 phù hợp với các số liệu thu thập từ môi trường nơi phân lập chủng XCK-MX1. So với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hoài Hà và cộng sự, loài vi khuẩn *Pseudomonas* sp. H2 có khả năng phân hủy dầu diesel [6] thì XCK-MX1 có cùng nhiệt độ phát triển thích hợp là 32°C và nồng độ muối thấp hơn 1%.

2. Khả năng sử dụng các thành phần của dầu diesel:



Hình 1. Thành phần nhóm của dầu diesel sau 10 ngày nuôi cấy XCK-MX1

Trong nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy và cộng sự, XCK-MX1 có khả năng phân hủy dầu thô loại nhẹ [7]. Khả năng sử dụng các thành phần trong dầu diesel như cacbua-hydro no, cacbua-hydro thơm, các thành phần phân cực của XCK-MX1 được trình bày qua hình 1. Sau 10 ngày nuôi cấy trong môi trường khoáng có bổ sung 5% dầu diesel là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất, XCK-MX1 đã sử dụng 64% tổng số cacbua-hydro no, 87% cacbua-hydro thơm và không sử dụng thành phần phân cực (hình 1). Theo những công bố gần đây, số loài vi sinh vật có thể sử dụng thành phần phân cực của dầu không nhiều. Theo K. Venkateswaran loài *Pseudomonas* sp. UN3 đã phân hủy 10% resin sau 5 ngày nuôi cấy và 30-35% tổng số resin có trong môi trường sau 15-30 ngày [11].

Khả năng sử dụng dầu diesel của XCK-MX1 cao hơn so với một số chủng trong chi *Pseudomonas* đã công bố [5, 6].

Trong thành phần dầu cũng như các sản phẩm của dầu, hàm lượng cacbua-hydro thơm đơn nhân và đa nhân dao động trong khoảng từ 0 đến 8%, nó là một nhân tố gây ô nhiễm môi trường, gây bệnh đối với người và động vật. Nhiều loài vi khuẩn trong đó có các loài thuộc chi *Pseudomonas* có khả năng sử dụng được cacbua-hydro thơm đơn nhân cũng như đa nhân [1]. Khả năng sử dụng cacbua-hydro thơm có trong dầu diesel của XCK-MX1 được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4

Khả năng sử dụng cacbua-hydro thơm trong dầu diesel của XCK-MX1

Phân bố nguyên tử cacbon	Hàm lượng dầu thu hồi (mg/L)		Khả năng sử dụng (%)
	Đối chứng	XCK-MX1	
C ₁₁ -C ₁₆	137	8	94
C ₁₇ -C ₂₁	1164	145	87
C ₂₂ -C ₂₅	1224	184	84
> C ₂₅	446	53	88

Sau 10 ngày nuôi cấy, XCK-MX1 đã sử dụng trên 87% cacbua-hydro thơm và loài này sử dụng cacbua-hydro thơm có nguyên tử cacbon từ C₁₇ đến C₂₁ nhiều hơn các phân đoạn khác trong dầu diesel (bảng 4). Theo Nguyễn Hoài Hà và cộng sự, loài *Pseudomonas* sp. H2 sau 10 ngày nuôi cấy đã sử dụng được trên 80% cacbua-hydro thơm có trong dầu thô [6].

3. Khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng XCK-MX1 trên môi trường LB:

Nhiều loài vi khuẩn sử dụng dầu có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học [1, 3, 5, 8]. Trong nghiên cứu của Nguyễn Bá Hữu và Đặng Thị Cẩm Hà chủng vi khuẩn 2Cg phân lập từ vùng ô nhiễm Nhà Bè - Thành phố Hồ Chí Minh có khả năng sử dụng dầu diesel

và tạo chất hoạt động bề mặt sinh học ở nồng độ dầu từ 0,8 đến 60% [5].

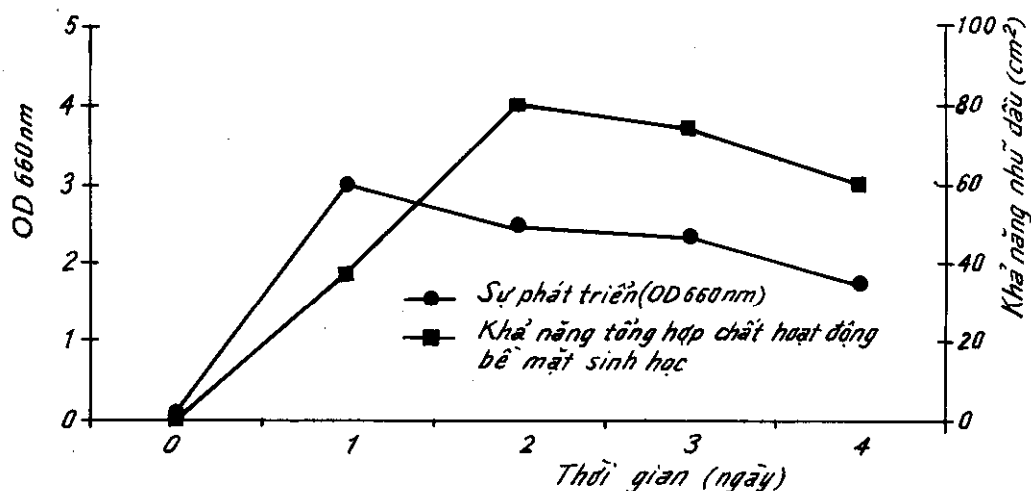
Trong các nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy và cộng sự, XCK-MX1 khả năng phân hủy dầu thô cao nhất trong môi trường giàu chất biển (Marine Broth-Difco 2216) [7, 8]. Trong các môi trường này, XCK-MX1 tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học ngay khi không được bổ sung dầu. XCK-MX1 khi nuôi cấy trong môi trường LB đã tổng hợp được khối lượng chất hoạt động bề mặt sinh học cao nhất. Sau 5 ngày nuôi cấy khối lượng chất hoạt động bề mặt sinh học thu được trên 0,6 g/L (kết quả không trình bày ở đây). Chất hoạt động bề mặt sinh học góp phần nâng cao hiệu suất phân hủy dầu của vi sinh vật.

Động thái sinh trưởng, khả năng tạo chất

hoạt động bề mặt sinh học của XCK-MX1 trên môi trường LB được trình bày qua hình 2. Khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học được xác định bởi mức độ làm nhũ dầu [4].

XCK-MX1 tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học trong giai đoạn phát triển trên môi

trường LB. Khi tốc độ phát triển giảm, khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học cũng giảm theo. Kết quả của Nguyễn Quang Huy và cộng sự cho thấy chất hoạt động bề mặt sinh học do XCK-MX1 tạo ra thuộc nhóm glycolipit, một loại hợp chất ưa nước [8].



Hình 2. Sinh trưởng và tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của XCK-MX1

III. KẾT LUẬN

- Trong số 9 chủng vi khuẩn phân lập ở các vùng ô nhiễm dầu tại Vũng Tàu và Bãi Cháy, chủng XCK-MX1 có khả năng sử dụng dầu diezen cao nhất và tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học.

- Chủng vi khuẩn XCK-MX1 là vi khuẩn Gram âm, thuộc chi *Pseudomonas* có khả năng phát triển trong khoảng nhiệt độ từ 28 đến 40°C, pH môi trường 7-8 và nồng độ muối NaCl từ 0 đến 1%.

- Sau 10 ngày nuôi cấy trong môi trường khoáng có bổ sung 5% dầu diezen làm nguồn cacbon và năng lượng duy nhất chủng XCK-MX1 đã sử dụng được 64% cacbuahydro no, 87% cacbuahydro thơm và không sử dụng thành phần phân cực.

- Chủng XCK-MX1 tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học thuộc nhóm glycolipit trên môi

trường LB và khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học tỷ lệ với tốc độ sinh trưởng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Atlas R. M., 1981: Microbiol Rev.: 180-209.
2. Banat I. M., 1995: Acta Biotechnol. 15(3): 251-267.
3. Desai J. D. and Banat I. M., 1997: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61(1): 47-64.
4. Morikawa M., et al., 1993: J. Fermen. Bioeng. 76: 280-283.
5. Nguyễn Bá Hữu và Đặng Thị Cẩm Hà, 1997: Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học: 291-301.
6. Nguyễn Hoài Hà và cộng sự, 1998: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, số XXXVI, 6B: 100-107.

7. Nguyễn Quang Huy và cộng sự, 1999: Biochem. Biotechnol. 53: 90-117.
Tập chí Sinh học 21(2): 21-26.
10. Patel R. M. and Densai A. J., 1997: J. Basic. Microbiol. 37(4): 281-286.
8. Nguyen Quang Huy, *et al.*, 1999: J. Biosci. and Bioeng. 88(1): 100-102.
11. Venkateswaran K., *et al.*, 1995: Can J. Microbiol. 41: 418-424.
9. Ochsner U. A., *et al.*, 1995: J. Adv. Microbiol. 41: 418-424.

**SOME PHYSIOLOGICAL PROPERTIES, THE DIESEL OIL DEGRADING AND
BIOSURFACTANT PRODUCING CAPACITIES OF THE *PSEUDOMONAS* STRAIN
XCK-MX1 ISOLATED FROM THE OIL CONTAMINATED WASTE WATER
IN VUNGTAU AREA**

DANG THI CAM HA, *et al.*

SUMMARY

From 9 bacterial strains which were isolated from the oil-contaminated wastewater in Vungtau and Baichay areas, one strain showed a highest diesel oil degrading capacity. It was identified as *Pseudomonas* sp. by morphological, biochemical characteristics and 16S RNA studies and it was named *Pseudomonas* sp. XCK-MX1. The best temperature, pH, and the NaCl concentration of the media for its growth were 30°C, pH 7 and 1% NaCl respectively. After 10 days of inoculation in salt media containing 5% diesel oil as sole of energy and carbon sources the train XCK-MX1 has utilized 64% of alkane and 87% aromatic hydrocarbons. It was not able to utilize polar components in diesel oil. Strain XCK-MX1 in LB media, it showed its ability to produce biosurfactant in stationary phase.

Ngày nhận bài: 6-2-1999

(Tiếp theo trang 37)

**SOME STUDY PHEROMONE IN *PACHYTERIA FASCIATA* FAB. (COLEOPTER:
CERAMBYCIDAE) DESTRUCTIVE SAPODILLA TREES IN THUA THIEN-HUE PROVINCE**

LE TRONG SON

SUMMARY

Pachyteria fasciata Fab. (Coleopter: Cerambycidae) is a sapodilla pest restricted to Asia that is becoming more important due to the inefficacy of control methods against it. The larvea bore into the plan body and the available insecticides can not give adequate protection. So, the search for altermate control strategies is mandatory. However, the literature on bioethological studies of the species is scarce. This work investigate the attraction of adult males and females each other that is mediated by a sex pheromone that remains to be identified. We were to determine the females and mates produces a sex pheromone attracted each other and males were more attractive thant the females. Dissected thoraces of adult males and females were more attractive than other body parts.

Ngày nhận bài: 30-8-1999

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, SINH HỌC, SINH THÁI CỦA HAI LOÀI BỌ MẮT VÀNG *CHRYSOPA* sp. VÀ *ANKYLOPTERYX* sp. (CHRYSOPIDAE) TRÊN VẢI THIÊU ĐÔNG TRIỀU, QUẢNG NINH

NGUYỄN XUÂN THÀNH

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Việc bảo vệ và khai thác một cách hợp lý nguồn tài nguyên sinh vật của quốc gia cần phải được quan tâm một cách đúng mức vì tài nguyên này ngày càng bị cạn kiệt, và nhiều loài có nguy cơ bị tuyệt chủng. Để thực hiện được vấn đề này thì việc điều tra xác định sự phân bố, tính đa dạng về thành phần loài, nghiên cứu những đặc điểm cơ bản về sinh học, sinh thái và đánh giá vai trò tác dụng của chúng trong hệ sinh thái là một việc cấp thiết.

Bọ mắt vàng (Chrysopidae) là những loài côn trùng có ích, chúng được sử dụng như một vũ khí lợi hại để tiêu diệt các loại sâu hại bảo vệ cây trồng [1-7]. Sự có mặt của chúng trên các sinh quần đã giúp chúng ta giảm thiểu được việc dùng chất hóa học độc hại trong bảo vệ thực vật, giảm được chi phí sản xuất, tránh được ô nhiễm môi trường sống đang làm ảnh hưởng đến sức khỏe con người.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thời gian nghiên cứu được tiến hành từ tháng 3 đến tháng 12 năm 1998 tại nông trường Đông Triều, Quảng Ninh.

Việc điều tra thu mẫu được tiến hành bằng vợt côn trùng và tay. Điều tra định kỳ được tiến hành liên tục trong 3 tháng từ tháng 4 đến hết tháng 6. Mỗi đợt điều tra trên 25 cây vải thiêu tuổi 4 và 5. Các lần điều tra cách nhau 5 ngày, vợt xung quanh cây để thu con trưởng thành, sau đó quan sát và thu ấu trùng, trứng, nhộng bằng tay. Điều tra bổ sung vào các tháng trước và sau đó.

Mẫu vật được mô tả trên kính lúp hai mắt MbC10 của Nga. Kích thước được đo bằng kính 8 x 23. Phân loại theo khóa của B. Tjeder 1966.

Các mẫu vật khô và ngâm nước được lưu giữ tại Phòng Sinh thái côn trùng thuộc Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Qua điều tra thu mẫu và phân loại, bước đầu chúng tôi đã xác định được trên vùng trồng vải thiêu Quảng Ninh có hai loại bọ mắt vàng sinh sống. Loài thứ nhất là *Chrysopa* sp. và loài thứ hai là *Ankylopteryx* sp. cả hai loài này đều thuộc phân họ Chrysopinae Esben-Petesen 1918, họ Chrysopidae, bộ Neuroptera.

1. Những đặc điểm hình thái, sinh học của *Chrysopa* sp.:

Con trưởng thành thân mềm mại, có màu xanh nõn chuối, trên dọc sống lưng từ đầu đến hậu môn có vệt vàng. Thân dài 8,5 mm, đôi mắt kép to vàng ánh kim.

Cánh trước với ngọn cánh thuần nhon, cánh màu xanh, trên các gân cánh phân bố lông cứng màu đen. Gân subcosta và gân radius không dính nhau mà chạy gần như song song cho đến ngọn cánh. Cánh trước với hai dãy buồng gradate cells. Buồng mắt cánh (im) hình tam giác, gân ngang r-m rơi ngay vào đỉnh của buồng cánh. Chiều dài cánh trước 14 mm, chiều dài cánh sau 12 mm.

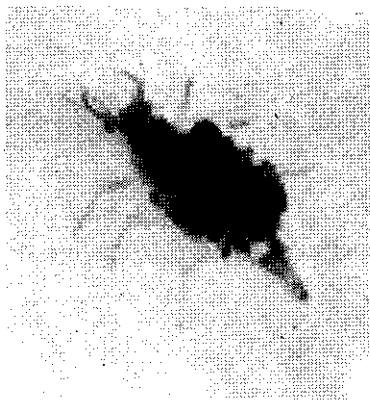
Đầu bình thường không có vết. Râu rần hơn cánh trước, chiều dài của râu đo được 11 mm.

Bàn chân 5 đốt không có gì đặc biệt. Vuốt có màu nâu, hình cong lưỡi liềm.

Chrysopa sp. trưởng thành đẻ trứng rải rác từng quả một, trứng có hình quả nhót, màu



Ảnh 1. Bộ mắt vàng *Ankylopteryx* sp. trưởng thành



Ảnh 2. Ấu trùng bộ mắt vàng *Chrysopa* sp.

xanh, cuống trứng dài và mảnh màu trắng. Vào tháng 5 trứng có thời gian phát triển từ 3 đến 4 ngày, trung bình 3,2 ngày. Theo kết quả điều tra suốt năm 1998 tại Đông Triều, Quảng Ninh cho thấy: vào các tháng mùa đông (12/1998), thời tiết vẫn ẩm áp, nhiệt độ dao động từ 15 đến 20 độ con trưởng thành vẫn dễ trứng bình thường.

Ấu trùng có màu nâu sáng, di động linh hoạt, trên lưng thường xuyên phủ một lớp rác bẩn để ngụy trang tránh kẻ thù. Nuôi ấu trùng bằng rệp vải vào tháng 5 cho thấy ấu trùng phát triển, từ lúc nở cho đến khi nhộng từ 6 đến 8 ngày, trung bình 6,8 ngày. Ấu trùng có 3 tuổi

qua 2 lần lột xác. Tuổi 1 phát triển lâu nhất (3 ngày).

Nhộng hình tròn nằm trong kén trắng, thời gian phát triển vào tháng 5/1998, từ 7 đến 9 ngày, trung bình 8,5 ngày.

Kết quả điều tra cho thấy, trên vải thiếu bộ mắt vàng tồn tại phát triển quanh năm. Trưởng thành ngủ đông vào các tháng lạnh nhất, khi nhiệt độ trung bình ngoài trời 15-16°C.

2. Những đặc điểm hình thái của

Ankylopteryx sp.:

So sánh giữa hai loài *Chrysopa* sp. và *Ankylopteryx* sp. thấy chúng có sự khác biệt hoàn toàn.

Ankylopteryx sp. có màu xanh nhạt hơn so với *Chrysopa* sp.. Trên cánh trước của *Ankylopteryx* sp. có 3 vết màu nâu, nằm ở 3 vị trí khác nhau và có kích thước khác nhau: vết thứ nhất nằm tại khu đuôi gần gân Cu_2 , vết thứ hai nằm giữa khu chính, vết này bé hơn so với 2 vết khác, vết thứ 3 nằm ở gần ngọn cánh, ngang tại Pterostigma.

Trên cánh có nhiều lông cứng dài, rậm, phân bố tại gốc cánh và ngay tại gốc gân costa. Gân costa không uốn nhẹ như ở loài *Chrysopa* sp. mà vươn thẳng lên cùng chiều với đầu tạo thành hình chữ U giữa thân và cánh, làm cho gân nối C và Sc rất dài. Độ dài cánh trước đo được 12,5 mm.

Cánh sau cũng có một vết màu nâu, vết này nằm ngay cạnh mắt Pterostigma. Chiều dài cánh sau đo được 13,5 mm.

Ngoài các vết màu nâu to đậm ra, trên cả hai cánh đều có các vết màu nâu rất mờ nằm ngay tại các điểm nối gân cánh.

Khác với *Chrysopa* sp. buồng cánh (im) của có hình tứ giác giống hình lưỡi mác 4 cạnh.

Thân của *Ankylopteryx* sp. có màu xanh nhạt, ngay tại trên cùng của tấm lưng ngực trước gần với đầu có 2 vết chấm vàng nâu. Chiều dài thân đo được 7,5 mm.

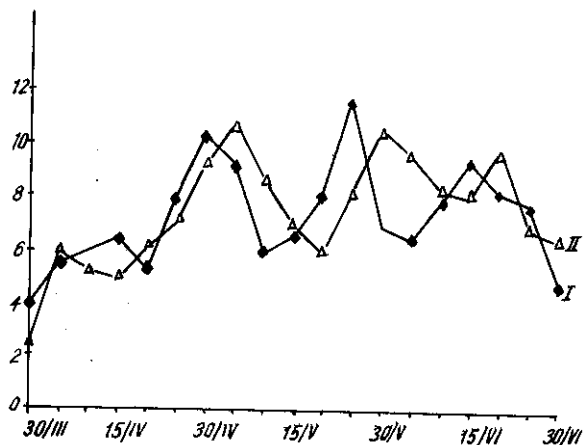
Chân có màu xanh nhạt, mềm mại, dài mảnh, trên có lông tơ dài phủ. Giữa các đốt ống chân có vết màu đen. Đốt bàn và móng chân có màu nâu đen. Vuốt có màu nâu, cong hình lưỡi liềm.

Cũng như *Chrysopa* sp. bộ mắt vàng *Ankylopteryx* sp. tồn tại và phát triển trên vải Đông Triều quanh năm.

3. Biến động số lượng của hai loài bộ mắt vàng:

Điều tra định kỳ, liên tục trong 3 tháng: 4, 5, 6 năm 1998 và điều tra bổ sung và các tháng trước và sau cho thấy: sau khi ngủ đông và các tháng (1, 2) rét lạnh nhất, từ tháng 3 trở đi, bộ mắt vàng trên vải bắt đầu hoạt động trở lại. Mật độ bắt đầu tăng dần từ tháng 4 đến cuối tháng 4, đầu tháng 5. Mật độ của cả 2 loài đều tăng cao. Loài *Chrysopa* sp. có mật độ lên tới 10,2 con trên 25 cây, còn *Ankylopteryx* sp. 10,5 con trên 25 cây vào ngày 5/5/1998. Đỉnh cao thứ hai của cả hai loài vào ngày 25/5/1998 và ngày 30/5/1998. Vào thời điểm này loài *Chrysopa* sp. có mật độ cao nhất là 11,5 và *Ankylopteryx* sp. có mật độ là 10,5. Tháng 6 mật độ của hai loài có giảm xuống đôi chút. Có thể sự giảm sút này là do ảnh hưởng của nhiệt độ thời tiết lên cao. Mật độ của *Chrysopa* sp. lúc này là 9,3 con trên 25 cây.

Điều tra bổ sung vào 5/12/1998 tại đội Triều Dương cho thấy mật độ của cả 2 loài đều như nhau đạt 2 con trên 25 cây. Do điều kiện thời tiết nắng ấm (18-28°C) nên con trưởng thành *Chrysopa* sp. vẫn đẻ trứng bình thường.



I - *Chrysopa* sp.; II - *Ankylopteryx* sp.

Biến động số lượng của hai loài bộ mắt vàng trên sinh quần vải thiều Đông Triều, Quảng Ninh 1998

4. Khóa phân định hai loài phát hiện được tại Đông Triều:

Cơ thể màu xanh nhạt. Costa vươn cao về phía đầu tại phần gốc cánh. Cánh trước to hơn nhiều so với cánh sau, và có 3 vệt nâu. Buồng cánh (im) có hình tứ giác.....*Ankylopteryx* sp.

Cơ thể màu xanh. Costa không vươn cao về phía đầu tại phần gốc cánh, mà thuôn dần về phía ngọn cánh. Trên cánh không có các vệt nâu. Buồng cánh (im) có hình tam giác.....*Chrysopa* sp.

III. KẾT LUẬN

Trên cây vải thiều Đông Triều Quảng Ninh đã phát hiện được 2 loài bộ mắt vàng thuộc phân họ Chrysopinae là *Ankylopteryx* sp. và *Chrysopa* sp..

Cả hai loài tồn tại, phát triển quanh năm trên cây vải. Vào mùa đông khi thời tiết nắng ấm như tháng 12/1998 thì chúng vẫn đẻ trứng bình thường.

Mật độ của cả 2 loài cao nhất vào tháng cuối xuân, đầu hè, khi mật độ thức ăn và các yếu tố sinh thái khác thuận lợi cho chúng. Mật độ cao nhất vào các thời kỳ sau: cuối tháng 4 đầu tháng 5, cuối tháng 5 và từ 15 đến 20 tháng 6.

Đây là hai loài côn trùng ăn thịt sâu hại quan trọng, chúng đã cùng với các đối tượng ký sinh, ăn thịt khác, đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa mật độ chủng quần sâu hại vải, góp phần đáng kể để hạn chế tác hại của sâu gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Xuân Thành, 1984: Dẫn liệu sinh thái học và sinh học của bộ mắt vàng *Chrysopa* sp. (Neuroptera, Chrysopidae) trên đồng day Hải Hưng. Tạp chí Sinh học 6(2): 14-15.
2. Nguyễn Xuân Thành, 1996: Sâu hại bông day và thiên địch của chúng ở Việt Nam, NXB Nông nghiệp Hà Nội, 1996.
3. Tjeder B., 1996: Neuroptera Planipennia - The lace-wings of Southern Africa. South Africa Animal life Uppada: 288-534.
4. Beglarov G. A., Usekove G. A., 1972:

Khả năng sử dụng bọ Mắt vàng *Ch. carnea* để phòng chống rệp trong vùng đất được bảo vệ. Tuyển tập "Biện pháp sinh học phòng chống sâu hại năm" "Kolos".

5. Guxev. G. B., 1971: Triển vọng của việc sử dụng bọ Mắt vàng và các côn trùng ăn thịt sâu hại khác trong việc phòng chống bọ cánh cứng hai khoai tây tại các vùng địa lý khác nhau của Liên Bang Xô Viết, Kisinev.

6. Suvakhina E. Ia., 1974: Bọ Mắt vàng và biện pháp sử dụng chúng trong đấu tranh chống sâu hại nông nghiệp. Tuyển tập "Phương tiện sinh học bảo vệ thực vật" M., "Kolos".

7. Moiseev E. G., 1973: Hiệu quả của bọ Mắt vàng trong phòng trừ rệp rau và cây cảnh

trong nhà kính. Tóm tắt luận án PTS. Nông nghiệp. Đại học Nông nghiệp Leningrat.

8. Lupova E. P., 1966: Tổng kết nghiên cứu bọ cánh lưới (Neuroptera) vùng Trung Á. Tuyển tập "Khu hệ và địa động vật côn trùng vùng Trung Á" Đusanbe. NXB "Donis".

9. Lupova E. P., 1970: Hình thái học và sinh học bọ Mắt vàng *Ch. Dubitans* Mcl. (Neuroptera, Chrysopidae) ở Tadjikistan. Thông báo Khoa học sinh học của Viện hàn lâm Khoa học Tadjikistan, No. 2.

10. Chrysopidae, 1978: Trung Quốc côn trùng đồ sách: 262-265.

11. *Insects of Hawaii*: Vol. 6: 1-152.

SOME MORPHOLOGICAL, BIOLOGICAL, ECOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TWO SPECIES *CHRYSOPE* SP. AND *ANKYLOPTERYX* SP. (CHRYSOPEIDAE) AT RATBUTAN IN DONGTRIEU DISTRICT-QUANGNINH PROVINCE

NGUYEN XUAN THANH

SUMMARY

Data ecological, morphological peculiarities of Green Lacenwings, Chrysopids, Golden Eyes in Dongtrieu, Quangninh.

In the litchi.chinensis Sonn. (Sapindaceae) in Dongtrieu Quangninh two species Golden Eyes have been found. They are *Ankylopteryx* sp. and *Chrysopa* sp. of Subfamily Chrysopinae, Esben-Peterson, 1918. Some ecological and external morphological peculiarities are described. They are good predators of some pest species in the Litchi chinensis. They play an important role in population regulation of the pest species. The number increased and up to high in 30/4, 30/5 and 15/6, after that the number reduced.

Ngày nhận bài: 28-12-1999

SỬ DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC LAL ĐỂ XÁC ĐỊNH NỘI ĐỘC TỔ

LÊ XUÂN TỬ, NGUYỄN TÀI LƯƠNG, LÊ QUANG HUẤN,
NGUYỄN HUY NAM, VŨ VĂN HẠNH

Viện Công nghệ sinh học

Khi nghiên cứu loài sam biển *Lymulus poliphemus*, Levin và Bang, 1976 đã xây dựng phương pháp xác định nội độc tố (lipopolysaccharit, LPS) của vi khuẩn gram âm dựa trên khả năng tạo gel của máu sam khi tiếp xúc với vi khuẩn gram âm, gọi là phương pháp LAL-Test. Đây là một phương pháp xác định nội độc tố (yếu tố gây sốt) nhanh, nhạy và có độ chính xác cao so với phương pháp thử chỉ nhiệt tố trên thỏ. Phép thử chỉ nhiệt tố trên thỏ có thể xác định được lượng nội độc tố từ 1 đến 10 ng End/ml dung dịch, trong khi đó phép thử LAL-Test có thể xác định được một lượng nội độc tố là 0,01 đến 0,1 ngEnd/ml [2].

Xác định nội độc tố (cũng chính là việc xác định sự hiện diện của các vi khuẩn gram âm) trong các loại thực phẩm tươi sống hoặc đã được đóng hộp, xác định sự nhiễm khuẩn của nước uống. Nhiễm độc khuẩn thức ăn là một hội chứng nhiễm độc, nhiễm khuẩn cấp tính do vi khuẩn và độc tố của chúng gây lên. Trong các loại nhiễm độc khuẩn thức ăn, ngộ độc thịt là nguy hiểm hơn cả. Bệnh thường xảy ra sau khi ăn đồ hộp, dăm bông, thịt xông khói, xúc xích lập sườn nhất là các loại thịt hộp, cá hộp. Sự thực đây là một loại bệnh rất nặng do ăn phải thực phẩm bị nhiễm khuẩn *Clostridium botulinum*. Đây là một loại trực khuẩn gram âm, tạo ra bào tử, phát triển mạnh ở môi trường dinh dưỡng trong điều kiện kỵ khí và tiết ra nội độc tố rất độc.

Xác định sự vô khuẩn của các loại thuốc tây nhất là đối với các dịch tiêm truyền trực tiếp vào hệ tuần hoàn của người bệnh đồng thời xác định nhanh sự nhiễm khuẩn của cơ thể thông qua việc xác định nội độc tố trong máu hoặc trong một số dịch cơ thể từ đó cho phép các bác sĩ chẩn đoán các bệnh hiểm nghèo chẳng hạn như bệnh nhiễm trùng huyết, viêm gan B, viêm màng não, bệnh lậu... [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

Theo quy định ban đầu của FDA thì lượng

LPS giới hạn cho phép đối với các loại thuốc tiêm tĩnh mạch khi thử theo LAL-Test là 0,25 EU/ml (25×10^{-12} g End/ml). Tuy nhiên giới hạn này cũng bị các nhà sản xuất phản đối. Theo quy định mới của FDA (công bố tháng 3 năm 1983) thì giới hạn cho phép của LPS trong các loại thuốc được tính theo công thức:

$$K/M = TPD/MRD \text{ (hoặc MHD)}$$

Trong đó:

TPD: liều gây sốt khởi điểm và được xác định là 5 MU/kg

MRD: liều cực đại đối với thỏ

MHD: liều cực đại đối với người

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu và ứng dụng phép thử LAL-Test để thay thế cho phương pháp thử chỉ nhiệt tố trên thỏ có thể nói còn rất mới. Ngay cả việc nghiên cứu công nghệ thu nhận chế phẩm LAL-Test từ loài sam biển *Tachypleus tridentatus*, một loài sam sinh sống ở các vùng biển Việt Nam với trữ lượng lớn cũng chỉ mới được tiến hành nghiên cứu trong một số năm gần đây.

Kết nghiên cứu công nghệ sản xuất LAL và sử dụng chế phẩm này để xác định nội độc tố trong thịt và một số loại thuốc uống là thử nghiệm ban đầu của chúng tôi nhằm hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm, đồng thời khai thác những đặc tính quý báu của chế phẩm LAL trong các lĩnh vực thực phẩm và dược.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Máu sam được hút trực tiếp từ vùng tim (nơi phân cách giữa phần đầu và phần thân) vào bình thủy tinh tráng silicon chứa dung dịch 0,9% NaCl trong chất chống đông có pH bằng 7,2 đến 7,4 (N-etyl-maleimide và hợp chất XBT- một chất chống đông do chúng tôi hợp tác với các n

khoa học Pháp tổng hợp từ các cây dược liệu của Việt Nam). Ở giai đoạn này điều lưu ý nhất là các thao tác phải được tiến hành một cách rất nhẹ nhàng để hạn chế đến mức tối đa hiện tượng vỡ các tế bào máu gây kết dính tế bào và giảm hoạt tính của chế phẩm. Quá trình lấy máu phải được đảm bảo vô trùng, dụng cụ và các loại hóa chất dùng trong tách chiết LAL đều phải được tiệt trùng và không có chỉ nhiệt tố.

Nhiệt độ của dung dịch chất chống đông được làm nóng (40°C). Tỷ lệ chất chống đông so với máu bằng 1/1 (v/v). Mỗi con sam trưởng thành có thể lấy 150-200 ml máu phụ thuộc vào trọng lượng sam và trạng thái sinh lý của sam.

Hỗn hợp máu sam và dung dịch chất chống đông được để lắng ở nhiệt độ lạnh (4°C) trong khoảng 100-110 phút, hoặc ly tâm lạnh ở tốc độ thấp (600 vòng/phút) để thu nhận tế bào. Các tế bào được rửa bằng dung dịch muối NaCl 0,9% và sau đó được thủy giải trong điều kiện nhiệt độ thấp (4°C). Sau đó ly tâm 5000 vòng/phút thời gian là 10 phút để loại bỏ xác tế bào. Để tăng hoạt tính, dịch ly tâm được chiết bằng hệ dung môi hữu cơ (5% benzen trong clorofom) và bổ sung một trong các ion hóa trị 2 sau: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} . Quá trình xử lý như vậy có thể làm tăng hoạt tính của chế phẩm lên khoảng 100 lần.

Chế phẩm sau đó được đông khô và bảo quản ở 4°C . Theo quy trình trên đây chế phẩm LAL thu được có hoạt tính 0,06 EU/ml (tương ứng với 10^{-12} gam End/ml).

Phép thử nội độc tố được thực hiện bằng cách cho 0,1 ml mẫu cần thử vào 0,1 ml LAL trong ống thủy tinh vô trùng không có chỉ nhiệt tố. Các ống đối chứng bao gồm một ống chứa 2 ml LAL và một ống chứa 0,1 ml dung dịch muối loãng và 0,1 ml LAL. Các ống thử đều được ủ ở 37°C thời gian là 60 phút. Kết quả phản ứng được theo dõi và phân loại mức độ và chất lượng gel tạo ra. Các mẫu thử nghiệm được pha loãng dần cho tới khi mẫu pha loãng không tạo gel với LAL. Từ đó tính hàm lượng nội độc tố có trong mẫu dung dịch.

Các mẫu thịt gà, thịt lợn được lấy ngay khi vừa giết thịt và lấy một phần nhỏ (15-20 gam) ở phần giữa khổ thịt, nghiền nhỏ trong điều kiện vô trùng, ngâm trong nước cất không có chỉ nhiệt tố, sau một giờ lấy phần dịch phía trên để

xác định nội độc tố. Mẫu thử đối chứng trong trường hợp này là nước cất sử dụng để chiết mẫu thịt.

Đối với dạng thuốc viên như Hải sâm, Rabiton được hòa tan với một lượng nhỏ nước cất, sau đó ly tâm thu phần dịch ly tâm để thử nội độc tố. Hòa 0,1 ml mẫu cần thử vào ống nghiệm chứa 0,1 ml LAL/các ống đối chứng bao gồm một ống chứa 0,2 ml LAL, một ống chứa 0,1 ml LAL và 0,1 ml nước cất. Tất cả các ống nghiệm được lắc đều và sau đó ủ ở 37°C trong khoảng thời gian là 1 giờ, nội độc tố trong mẫu thử được đánh giá theo mức độ và chất lượng gel hình thành.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả xác định nội độc tố trong thịt lợn được trình bày tại hình 1 và thịt gà được trình bày hình 2 (kết quả thử nghiệm năm 1998) và hình 3, bảng 2, 3 (kết quả xét nghiệm năm 1999). Qua các hình và bảng trên cho thấy trong các mô thịt lợn và thịt gà là có nội độc tố và lượng nội độc tố này đã tồn tại trong các mô cơ ngay khi con vật còn sống chưa bị giết thịt chứ không phải là lượng nội độc tố bị nhiễm trong quá trình giết thịt hoặc chưa bị giết thịt chứ không phải là lượng nội độc tố bị nhiễm trong quá trình giết thịt hoặc trong quá trình lấy mẫu với hàm lượng khác nhau ở các mẫu. Nghĩa là các mẫu thịt lấy từ các địa phương khác nhau có nội độc tố không giống nhau. Phụ thuộc vào nguồn thức ăn và điều kiện nuôi dưỡng như chuồng trại, tình trạng sinh lý của động vật nuôi có ảnh hưởng tới lượng nội độc tố trong máu và trong cơ của động vật. Ở một mức độ thấp ta thấy động vật vẫn khỏe mạnh bình thường, nếu lượng nội độc tố trong máu, trong cơ cao hơn sẽ gây nên hiện tượng sốt (đối với trường hợp các nội độc tố ở dạng tự do, dạng lipopolysaccharit) hoặc mắc bệnh (đối với các trường hợp nội độc tố ở dạng liên kết tức là các trường hợp nhiễm khuẩn).

Theo công bố của Cohen J. Mc Connell J. S. (1984). Mức nội độc tố (LPS) trung bình tồn tại trong huyết tương người là 10 pg/ml (10^{-11} gam End/ml) tuy nhiên, ta biết rằng: Nội độc tố là một tác nhân quan trọng trong nhiều quá trình bệnh lý, với một liều lượng thấp nó gây nên sự tăng nhiệt độ cơ thể, ở liều lượng cao hơn (10^{-6} g

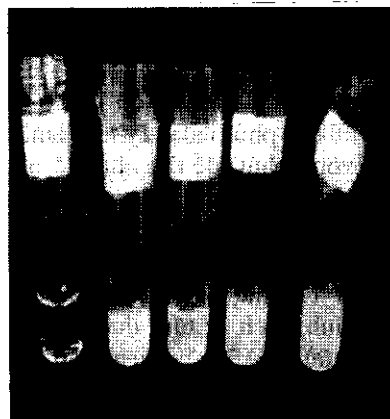
End/ml) xâm nhập vào hệ tuần hoàn sẽ gây nhiễm độc máu và dẫn đến tử vong.

Kết quả xác định nội độc tố trong các mẫu thịt gà, thịt lợn được trình bày tại các hình 1, 2 và 3. Sau khi pha loãng ở mức còn khả năng tạo gel với chế phẩm LAL, lượng nội độc tố trong các mẫu thịt gà và thịt lợn được xác định sơ bộ trong khoảng $0,03-0,06$ EU/ml (3×10^{-12} g End/ml đến 6×10^{-12} g End/ml). Lượng nội độc tố này đã tồn tại trong các mô cơ, tuy nhiên đó là một lượng nội độc tố ở mức độ cho phép.



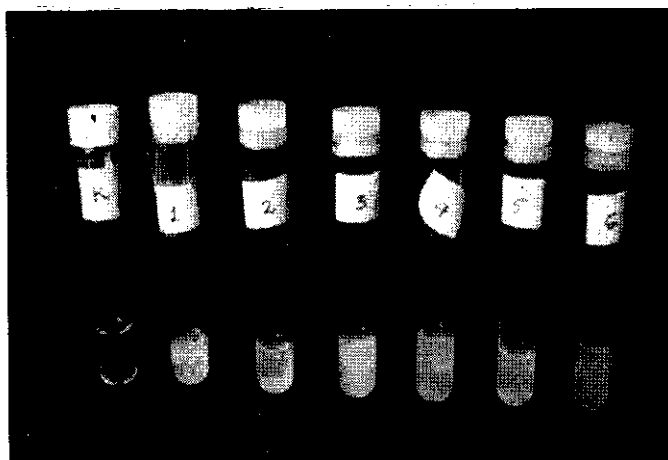
Hình 1. Sự tạo gel của các mẫu thịt gà

Thực tế, LPS (endotoxin) có mặt ở mọi nơi. Do đó các loại thuốc, nhất là thuốc tiêm, dịch truyền phải có biện pháp kiểm tra nghiêm ngặt về độ sạch để đảm bảo thuốc sản xuất ra không chứa nội độc tố. Trong quá trình sản xuất thuốc tất cả các tế bào vi khuẩn có thể được loại bỏ, thuốc có thể kiểm tra là vô khuẩn, tuy nhiên vì đề chí nhiệt tố (LPS) vẫn có thể tồn tại. Vì vậy thuốc sản xuất ra nhất là thuốc sử dụng trực tiếp vào đường tuần hoàn phải được kiểm tra sự có mặt của LPS và quy trình kiểm tra này lâu nay vẫn được tiến hành trên thỏ. Phép thử này rất tốn kém và độ chính xác không cao.



Hình 2. Sự tạo gel của các mẫu thịt lợn

Đối với hai loại thuốc viên: Hải Sâm Rabiton do phòng Công nghệ Enzym sản xuất cũng được xử lý để xác định nội độc tố LPS. Kết quả xác định LPS đối với hai loại thuốc viên Hải Sâm Rabiton được trình bày tại hình 4.



Hình 3. Sự tạo gel của các mẫu thịt gà và thịt lợn ngày 14/9/99

K - Đối chứng, 1. Mẫu thịt gà, 2. Mẫu thịt lợn (mẫu thu tại Hưng Yên) 3. Mẫu thịt gà, 4. Mẫu thịt lợn (mẫu thu tại Hải Dương) 5. Mẫu thịt gà, 6. Mẫu thịt lợn (mẫu thu tại Bắc Ninh)

Sự tạo gel (hình 4) của dịch thuốc và chế phẩm LAL cho phép khẳng định rằng trong các viên thuốc thử nghiệm đều tồn tại LPS và kết quả tính toán cho thấy lượng LPS là 3×10^{-12} g End/ml.

Kết quả xác định nội độc tố trong thịt gà, thịt lợn được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Kết quả xác định nội độc tố trong các mẫu thử bằng phương pháp tạo gel với LAL

Hoạt tính của LAL Các mẫu thử	10^{-12} g End/ml	10^{-12} g End/ml	3×10^{-12} g End/ml	6×10^{-12} g End/ml	10^{-13} g End/ml
Mẫu thịt lợn 1	+	+	+	-	-
Mẫu thịt lợn 2	+	+	+	+	-
Mẫu thịt gà 1	+	+	-	-	-
Mẫu thịt gà 2	+	+	-	-	-
Thuốc Hải Sâm	+	+	-	-	-
Thuốc Rabiton	+	+	-	-	-

(+) Tạo gel; (-) Không tạo gel

Mẫu thịt lợn 1: Mẫu thịt lợn tại vùng Hà Nội ngày 14/10/1998; Mẫu thịt lợn 2: Mẫu thịt lợn tại vùng Thái Nguyên ngày 23/5/1998; Mẫu thịt gà công nghiệp 1: Mẫu thịt gà tại vùng Hà Nội ngày 14/10/1998; Mẫu thịt gà công nghiệp 2: Mẫu thịt lợn tại vùng Thái Nguyên ngày 30/10/1998

Bảng 2

Kết quả xác định nội độc tố trong các mẫu thịt lợn bằng sự tạo gel với LAL

Các mẫu thử		Hoạt tính của LAL			
Nơi thu mẫu	Ngày thu mẫu	10^{-13} g End/ml	10^{-12} g End/ml	3×10^{-12} g End/ml	6×10^{-12} g End/ml
Lĩnh Nam, Thanh Trì, Hà Nội	4/8/99	-	+	+	+
Hà Tây	4/8/99	-	-	+	+
Hưng Yên	14/9/99	-	-	+	+
Bắc Ninh	14/9/99	-	+	+	+
Hải Dương	14/9/99	-	-	+	+
Hải Dương	17/9/99	-	-	+	+
Hưng Yên	17/9/99	-	-	+	+

Bảng 3

Kết quả xác định nội độc tố trong các mẫu thịt gà bằng sự tạo gel với LAL

Các mẫu thử		Hoạt tính của LAL			
Nơi thu mẫu, loại mẫu	Ngày thu mẫu	10^{-13} g End/ml	10^{-12} g End/ml	3×10^{-12} g End/ml	6×10^{-12} g End/ml
Thịt gà ta, Lĩnh Nam, Thanh Trì, HN	4/8/99	-	+	+	+
Thịt gà công nghiệp, Hà Tây	4/8/99	-	+	+	+
Hưng Yên	14/9/99	-	-	+	+
Bắc Ninh	14/9/99	-	-	+	+
Hải Dương	14/9/99	-	-	+	+
Hải Dương	17/9/99	-	-	+	+
Hưng Yên	17/9/99	-	-	+	+

(+) Tạo gel; (-) Không tạo gel

Các loại thuốc tiêm tĩnh mạch thì liều gây sốt khởi điểm (TPD) là 0,2 EU/kg. Liều cực đại đối với thỏ và người được tính theo trọng lượng, đối với người là 25 mg/kg, với thỏ là 10 mg/kg.

Như vậy đối với người thì giới hạn LPS cho phép là: $EU = 5$ EU/kg; $25 \text{ mg/kg} = 0,2 \text{ EU/mg}$ ($2 \times 10^{-11} \text{ g End/ml}$) và đối với thỏ là: $EU = 5 \text{ EU/kg}$; $10 \text{ mg/kg} = 0,5 \text{ EU/mg}$ ($5 \times 10^{-11} \text{ g End/ml}$). Đối chiếu với liều chuẩn do FDA của Mỹ quy định thì hàm lượng LPS trong thuốc Hải Sâm và Rabiton rất thấp ($3 \times 10^{-12} \text{ g End/ml}$), hơn nữa đây là loại thuốc sử dụng theo đường tiêu hóa nên không ảnh hưởng tới sức khỏe của người sử dụng.

III. KẾT LUẬN

1. Chế phẩm LAL khi chưa xử lý loại bỏ tạp chất ức chế chế tạo gel tới khi thử nghiệm với mẫu độc tố của *E. coli* LT:2 có hàm lượng LPS là 10^{-7} g/ml . Tuy nhiên các chế phẩm LAL đã xử lý loại bỏ chất ức chế có hoạt tính rất cao (10^{-10} g/ml đến 10^{-12} g/ml).

2. Trong các mô thịt lợn và thịt gà có nội độc tố ($3 \times 10^{-12} \text{ g End/ml}$ đến $6 \times 10^{-12} \text{ g End/ml}$) và lượng nội độc tố này đã tồn tại trong các mô cơ ngay khi con vật còn sống.

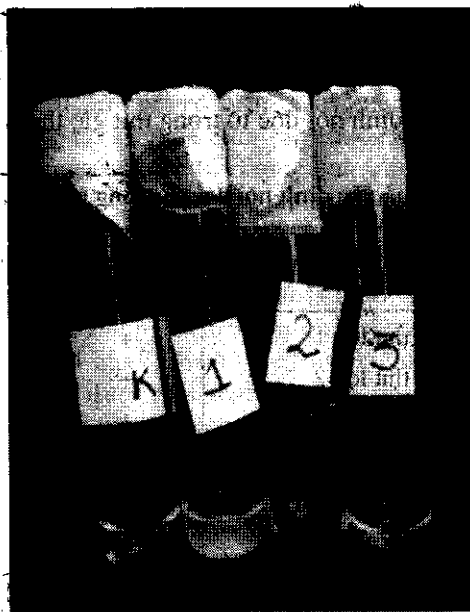
3. Lượng LPS trong mỗi viên thuốc Hải Sâm và Rabiton là rất thấp ($3 \times 10^{-12} \text{ g End/ml}$) so với tiêu chuẩn do FDA của Mỹ quy định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Levin L. and Bang F. B., 1976: The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood, Bull Johns Hopkins Hosp 115: 265-274.

2. Cohen., McConnells J. S., 1984: Observation on the measurement and evaluation of endotoxemia by quantitative limulus lysate microassay. J. Infect Dis. 150(6): 916-24.

3. Nakamura S., Iwanaga S., Harada J.,



Hình 4. Sự tạo gel của các mẫu thuốc Hải Sâm và Rabiton

Niwa M., 1976: A clottable protein (coagulogen) from amoebocyte lysate Japanese horseshoe crab *Typhlops tridentatus*. J. Bio. (80): 1011-1021.

4. Jorgensen J. F., Carvajal H. F., Chip B. E., Smith R. F., 1973: Rapid detection gram-negative bacteria by use of the Limulus Amoebocyte Lysate. App. Micro. 26(1): 38-4.

5. Sullivan J. R., and Watson S. W., 19 Factors affecting the sensitivity of Limulus lysate. App. Micro. 28(6): 1023-1026.

6. U. S. Food and Drug Administration Licensing of *Limulus* amoebocyte lysate, 19 Use as an alternative for rabbit pyrogen in federal register, 42: 57749.

7. Parenteral Drug Association Parenteral Drug Association Response FDA Draft, 1980: Guideline for the Use *Limulus* amoebocyte lysate. Information Bulletin No.3, March.

8. Duner K. I., 1993: A new kinetic single stage *Limulus* amoebocyte lysate method for detection of endotoxin in water and plasma Biochem. Biophys. Methods 26(2-3): 131-14.

9. Pearson F. C., Dubczak J., Weary Bruszer G., Bonohue G., 1985: Detection endotoxin in the plasma of patients with gram negative bacterial sepsis by the Limulus

PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT NHANH VÀ ĐƠN GIẢN ADN TỔNG SỐ TỪ MÔ LÁ LÚA (*ORYZA SATIVA*)

PHAN THỊ BÀY, LÊ THỊ MUỘI, NGUYỄN ĐỨC THÀNH

Viện Công nghệ sinh học

Một số phương pháp của McCouch và cs. (1998), Dellaporta và cs. (1983) và Saghai Maroof và cs. (1984) đã được sử dụng để tách ADN tổng số từ lá lúa. Tuy được cải tiến nhiều, nhưng các phương pháp này còn phức tạp và phải sử dụng một số hóa chất đắt tiền như SDS, phenol đặc biệt phương pháp của McCouch và cs. lượng phenol sử dụng rất đáng kể mà phenol là một chất vô cùng độc hại. Để phát triển các kỹ thuật phân tử ở thực vật nói chung và lúa nói riêng, cần có những phương pháp đơn giản, thuận lợi và phù hợp với từng phòng thí nghiệm nhất là trong điều kiện của Việt Nam. Trong các phương pháp kể trên chúng tôi thấy phương pháp của Saghai Maroof là tương đối phù hợp hơn cả trong điều kiện phòng thí nghiệm của chúng tôi. Dựa trên cơ sở của phương pháp này, chúng tôi đã nghiên cứu phát triển một phương pháp tách ADN vừa đơn giản lại nhanh mà chất lượng ADN vẫn bảo đảm cho các phân tích phân tử.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu dùng để tách ADN có thể là lá của các cây lúa nuôi cấy in vitro, mạ 2-3 tuần tuổi và lá của cây lúa trưởng thành.

Các hóa chất sử dụng gồm Mixed alkytrimetyl-amonium bromid (CTAB), Etylendiamin tetraaxetat (EDTA), Tris-base, và Ribonuclease A của hãng Sigma, Mỹ. 2-mecaptoctanol (BME)-MERCK, isopropanol, phenol của hãng A.R, Trung Quốc.

Mạ và lá của cây trưởng thành được cắt cho vào túi ni lông và cho ngay vào đá. Nếu tiến hành tách chiết ADN ngay thì mẫu được nghiền trong nitor lỏng để nhận được bột lá. Nếu thu mẫu nhiều giữ lại để tách chiết sau thì mẫu phải cho ngay vào nitor lỏng (-196°C), sau đó giữ ở -75°C. Khi dùng đem mẫu nghiền với nitor lỏng.

Để bảo quản và giữ mẫu được lâu hơn, mẫu cần được đông khô. Khi dùng nghiền bằng máy nghiền.

Cho 5 ml dung dịch CTAB 1% trong dịch đệm 100 mM Tris, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM β -mecaptoctanol (pH = 8,0) đã được nóng 60°C vào ống ly tâm 10 ml có chứa 150-200 mg bột lá tươi (50 mg bột lá khô). Lắc kỹ để tạo thành dịch. Ủ 60 đến 90 phút ở 60°C. Trong thời gian ủ, cứ 10 đến 15 phút lại lắc nhẹ một lần.

Hết thời gian ủ ở 60°C, các ống ly tâm chứa mẫu được lấy ra và để nguội ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó thêm 5 ml dung dịch clorofom/rượu isoamyl (24:1). Lắc nhẹ trong 5-10 phút. Ly tâm 2500-3000 vòng trong 10-15 phút ở nhiệt độ phòng. Sau ly tâm, dùng pipet hút lấy dịch trên cho sang ống ly tâm mới rồi bổ sung 5 ml clorofom/rượu isoamyl (24:1), lắc nhẹ trong 5 phút và tiếp tục ly tâm như trên và hút lấy dịch trên. Cho thêm 1/6 thể tích isopropanol và lắc nhẹ. Lúc này đã nhìn thấy ADN kết lại và nổi trong dung dịch. Sau khi ly tâm và loại bỏ thật kiệt dịch trên, ADN được làm khô ở ngay trong phòng hay trong tủ laminair và sau đó được hòa với 500 hoặc 1000 μ l (tùy thuộc vào lượng ADN kết tủa nhận được) đệm TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH = 8,0) trong ống Ependorf 1,5 ml.

ADN nhận được và được hòa tan đều, cho thêm 5 μ l dung dịch 10 mg/ml Ribonuclease A, lắc nhẹ rồi ủ 30 phút ở 37°C. Sau khi ủ, lắc nhẹ với lượng phenol tương đương rồi ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút bằng ly tâm Ependorf. Ly tâm xong, hút lấy dịch trên cho vào ống Ependorf mới. Làm sạch lần nữa bằng cách thay phenol bằng clorofom/rượu isoamyl (24:1) và kết tủa bằng cách cho thêm 10 μ l dung dịch 5 M NaCl và 2 thể tích cồn tuyệt đối lạnh. Lắc đều

và nhẹ rồi ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút để thu ADN. Rửa ADN bằng cồn 76%, làm khô và hòa tan ADN trong 500-1000 μ l đệm TE.

Lấy 5 μ l dịch ADN nhận được cho thêm 1995 μ l đệm TE, kiểm tra độ sạch và nồng độ ADN trên máy đo RNA/DNA (Pharmacia). Để kiểm tra chất lượng ADN, lấy 4-5 μ l dịch ADN nhận được chạy điện di trên gel agarose 0,8%. Có thể chạy cùng với ADN của Lambda ở các nồng độ khác nhau để xác định nồng độ.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phương pháp chúng tôi trình bày ở trên dựa vào cơ sở của phương pháp Saghai-Marooof và cs. (1984) và cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của chúng tôi.

Đối với nguyên liệu để tách ADN, chúng tôi thấy nguyên liệu nuôi cấy in vitro và mạ đều là những nguyên liệu rất tốt để tách ADN. Đối với lá của cây lúa trưởng thành, muốn thu được năng suất cao cần chọn các lá non.

Khâu nghiền mẫu cũng rất quan trọng, nghiền càng kỹ càng tốt. Khi nghiền mẫu tươi lưu ý phải cho thêm nitor lỏng đều đặn, không nên để mẫu bị khô và nghiền thiếu nitor lỏng.

Việc dùng lượng mẫu nhỏ trong ống ly tâm 10 ml tiết kiệm được hóa chất, nhất là hóa chất đắt tiền như CTAB. Lượng ADN thu được vẫn đủ để cho nhiều phân tích phân tử tiếp theo (năng suất trung bình 35 μ g trên 1 g nguyên liệu). Ngoài ra với phương pháp chiết có sử dụng CTAB, không cần đến phenol và SDS (Sodium dodecyl sulfate). Tránh được độc hại và giảm chi phí. Ngoài ra, tránh được tác dụng của phenol lên ADN vì nếu dùng phenol mà các khâu rửa sau không bảo đảm phenol sẽ phá hủy ADN.

Chúng tôi thấy rằng việc xử lý Ribonuclease A ngay sau khi chiết sẽ tổn enzym (đây enzym đắt tiền) nên đã thực hiện bước xử lý n sau khi thu được ADN vào trong một thể tích nhỏ (trong ống ly tâm Ependorf 1,5 ml). Xử lý Ribonuclease A xong, dung dịch ADN đủ tinh sạch bằng phenol (lượng dùng ở đây rất chỉ cần 0,5 đến 1 ml cho một lần tách trong nếu dùng phương pháp của McCouch phải cần đến 15-20 ml cho một lần tách với lượng tương đương) và clorofom/rượu isoamyl kết hợp với ly tâm ở tốc độ cao trong thời gian ngắn tách pha nhanh, tiết kiệm thời gian. Trong số trường hợp chúng tôi không dùng phenol ADN thu được vẫn có chất lượng đảm bảo (ảnh 1), có thể dùng để chạy các phản ứng trùng hợp (PCR) và cắt bằng enzym hạn chế (restriction enzym).



Ảnh 1. ADN tách chiết từ một số giống lúa

Bảng

Một số thông số về ADN được tách bằng phương pháp cải tiến

Mẫu	1	2	3	4	Trung bình
Nồng độ, μ g/ml	80	200	120	160	140
Tỷ lệ 260/280	1,750	1,768	1,840	1,943	1,825
Năng suất μ g/g lá	20	50	30	40	35

Trong bảng 1 là một số chỉ tiêu kỹ thuật của ADN tách từ một giống lúa bằng phương pháp cải tiến của chúng tôi. Qua bảng chúng ta thấy cả về độ sạch (dựa vào tỷ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀) lẫn năng suất, cộng thêm với việc kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8% (ảnh 1), ADN thu được hoàn toàn có thể sử dụng cho các nghiên cứu phân tử tiếp theo.

III. KẾT LUẬN

Bằng việc chọn và cải tiến một số bước, chúng tôi đã xây dựng một phương pháp tách ADN tổng số từ lá lúa nhanh và đơn giản. ADN nhận được có thể sử dụng cho các mục đích nghiên cứu phân tử khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B., 1983: Aplant AND miniprep: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.

2. McCouch S. R., Kochert G., Yu Z. H., Wang Z. Y., Khush G. S., Coffman W. R., Tanksley S. D., 1988: Molecular mapping of rice chromosome. Theor. Appl. Genet. 76: 815-829.

3. Saghai-Marooof M. A., Soliman K. M., Jorgesen R. A., Allard R. W., 1984: Ribosomal ANA specer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. Proc. Acad. Sci. USA, 81: 8014-8018.

SIMPLE AND FAST METHOD FOR THE ISOLATION OF GENOMIC DNA FROM RICE (*ORYZA SATIVA*) LEAVES

PHAN THI BAY, *et al.*

SUMMARY

In this paper, the simple and fast method for the isolation of genomic DNA from rice leaves is described. This method was based on the Saghai-Marooof's method (1984) with slight modifications by reducing the sample weight, Ribonuclease A treatment in small volume and phase separation in high speed. The yield and the quality of the obtained DNA met the standard requirement.

Ngày nhận bài: 10-7-1999

(*Tiếp theo trang 52*)

amoebocyte lysate assay. J. Clin. Microbiol. 21(6): 865-868.

LIMULUS AMOEOCYTE LYSATE ASSAY (LAL-TEST) FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF ENDOTOXIN

LE XUAN TU, *et al.*

SUMMARY

A sensitive method, using the LAL (Limulus amoebocyte lysate), product for detection and quantification of endotoxin in meat and drug has been developed. The assay was based on the gel formation of LAL with the endotoxin. The use of this assay revealed that the concentration of endotoxin in pig and chicken meat are low (3×10^{-12} g End/gam to 6×10^{-12} g End/gam) and in drug Haisam and Rabiton is 3×10^{-12} g End/ml. This concentration is below the maximum permit value of the FDA (Food and Drug Administration) directive for drug of 2×10^{-11} g End/ml.

Ngày nhận bài: 20-8-1999

DANH LỤC CÁC LOÀI CÔN TRÙNG CÁNH CỨNG CHÂN CHẠY THUỘC HỌ CARABIDAE (COLEOPTERA) Ở VIỆT NAM

PHẦN I: PHÂN HỌ CARABINAE VÀ HỌ BRACHINIDAE

LÊ KHƯƠNG THÚY

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Trước đây, tác giả đã xác định được 35 loài thuộc phân họ Carabinae ở Việt Nam (Lê Khương Thúy, 1989). Nay bổ sung một số loài và địa điểm phân bố của chúng.

Chúng tôi cũng xin chân thành cảm ơn các bạn đồng nghiệp và Dr. S. I. Ueno, chuyên gia Nhật Bản đã kiểm tra lại toàn bộ mẫu của phân họ Carabinae và họ Brachidae giúp chúng tôi hoàn thành bài báo này.

I. MẪU VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chúng tôi đã tiến hành sưu tầm và nghiên cứu họ Carabinae từ năm 1978 đến nay trên các địa điểm của cả nước và trên cơ sở phân tích các mẫu vật có tại phòng Bảo tàng Động vật (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật) cùng với việc tham khảo các tài liệu nghiên cứu có liên quan, chúng tôi đưa ra danh lục của phân họ Carabidae và họ Brachinidae ở Việt Nam.

Các tài liệu định loại được sử dụng chủ yếu là Andrewer (1929, 1931), A. Habu (1967) và Ueno (1994).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong bài báo này chúng tôi công bố danh lục phân họ Carabinae và họ Brachinidae ở Việt Nam có 29 giống, 76 loài trong đó đã phát hiện 19 giống mới và 24 loài mới cho khu hệ Carabidae Việt Nam.

Danh lục phân họ Carabinae và họ Brachinidae ở Việt Nam

Phân họ Carabinae

1. **Carabus (Apotomopterus) clermontianus* Breuning

56

Phân bố: Vĩnh Phúc

2. **Carabus (Apotomopterus) tonkinensis* Deuve
Phân bố: Lào Cai

Tộc Siagonini

3. **Siagona sublevis* Chaudoir
Phân bố: Nam Bộ (Cochinchine) [Mission Pavie, 1879-1895].

Tộc Scaritini

4. **Scarites acutidens* Chaudoir
Phân bố: Hà Nội
5. **Scarites dyschromus* Chaudoir
Phân bố: Hà Tây, Nghệ An (Viện BVTV 1976)
6. **Scarites parallelus* Dejean
Phân bố: Cochinchine (Lesne, 1879-1895)
7. *Scarites sulcatus* Olivier
Synonym: *Scarites geryon* Hope, 1831
Scarites chinensis Erichson, 1834
Phân bố: Hà Tây (Viện BVTV, 1976)
8. *Scarites teriricola* Bonelli
Synonym: *Scarites arenarius* Bonelli, 1813
Scarites pacificus Bates, 1873
Phân bố: Hà Nội, Nghệ An
9. **Scarites terricalapacificus* Bates
Phân bố: Bắc Ninh, Hà Nội, Hà Tây
10. *Scarites* sp₁
Phân bố: Hòa Bình
11. *Scarites* sp₂
Phân bố: Gia Lai, Kon Tum
12. **Thlibops paviei* Lesne

- Phân bố: Nam Bộ (Cochinchine) [Mission Pavie, 1879-1895]
13. **Clivina alutacea* Lesne
Phân bố: Nam Bộ (Cochinchine) [Mission Pavie, 1879-1895]
14. **Clivina castanea* Westwood
Synonym: *Eupalamus clivinoides* Schmidt-Göebel
Clivina parryi Putzeys
Clivina lata Putzeys
Phân bố: Bắc Ninh, Hà Nội, Nghệ An, Gia Lai
15. *Clivina extensicollis* Putzeys
Phân bố: Nghệ An, Nghĩa Lộ, Ninh Bình, Thái Bình (Viện BVTV, 1976; Lê Khương Thúy, 1989).
16. *Clivina forcipata* Putzeys
Phân bố: Quảng Ninh, Hà Nội (Mai Quý, 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
17. *Clivina helferi* Putzeys
Synonym: *Clivina grammica* Putzeys
Clivina debilis Bates
Clivina invalida Andrewer
Phân bố: Hà Tây (Lê Khương Thúy, 1989)
18. **Clivina julieni* Lesne
Phân bố: Bắc Bộ, Nam Bộ (Cochinchine) [Mission Pavie, 1879-1895]
19. *Clivina lobata* Bonelli
Synonym: *Clivina anceps* Putzeys
Clivina hydropica Putzeys
Clivina angulari Putzeys
Clivina capitata Putzeys
Clivina divaricata Putzeys
Clivina laeviceps Putzeys
Phân bố: Hà Nội, Hà Tây (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
20. *Clivina pileolata* Bates
Phân bố: Lạng Sơn, Hải Hưng, Ninh Bình (Viện BVTV, 1975; Phạm Văn Lâm, 1997).
21. *Clivina wetswoodi* Putzeys
Synonym: *Clivina wetswoodi* Putzeys
- Clivina castanea* Putzeys
Phân bố: Hà Tây, Quảng Ninh
22. *Clivina* sp.
Phân bố: Quảng Bình
23. *Dischirius mirandus* Bates
Phân bố: Thanh Hóa (Mai Quý và ctv. 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
24. *Dischirius perfectus* Andrewer
Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
25. *Dischirius quadrinotatus* Motschulsky
Phân bố: Vĩnh Phúc (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
26. *Dischirius variabilis* Andrewer
Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
27. **Eobrosicus (Drobrosicus) uenoi* Morita
Phân bố: Lào Cai
28. *Trilophus interpunctatus* Putzeys
Synonym: *Dyschirius schmidtii* Putzeys
Oxydrepanus birmanicus Bates
Oxydrepanus interpunctatus Andrewer
Trilophus interpunctatus Andrewer
Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
- Tộc Bembidiini**
29. **Tachyura* sp.
Phân bố: Gia Lai
30. **Paratachys* sp.
Phân bố: Gia Lai
31. *Tachys brachys* Andrewer
Synonym: *Tachys atomarius* Bates, 1886
Phân bố: Nghệ An, Quảng Ninh (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
32. *Tachys coracinus* Putzeys
Synonym: *Tachys remotiporis* Bates
Phân bố: Ninh Bình (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
33. *Tachys dentatus* Andrewer

- Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
34. *Tachys fasciatus* Motschulsky
 Synonym: *Trechus fasciatus* Motschulsky
Bembidium triangulare Nietner
Tachys triangularis Schaum
Trechus atriceps Macleay
Tachys trechiformis Jordan
Tachys migrator Perringuey
 Phân bố: Hà Tĩnh (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
35. *Tachys fuscicauda* Bates
 Phân bố: Quảng Ninh (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
36. *Tachys haliploides* Bates
 Phân bố: Nghệ An (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
37. *Tachys impressipennis* Motschulsky
 Synonym: *Tachys dohertyi* Jordan
Tachys sinuaticollis Sloane
 Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
38. *Tachys klugi* Nietner
 Synonym: *Bembidion klugi* Nietner
Tachys sulcultatus Putzeys
Tachys egyptus Bates
Tachys klugi Bates
Tachys feanus Bates
 Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
39. **Tachys lacitificus* Bates
 Phân bố: Bắc Ninh, Hà Nội, Hà Tây.
40. *Tachys ochrias* Andrewer
 Phân bố: Lào Cai (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
41. *Tachys poecilopterus* Bates
 Synonym: *Tachys deliciolus* Bates
 Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
42. *Tachys politus* Motschulsky
 Synonym: *Bembidion ebenium* Nietner
Tachys bioculatus Putzeys
 Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
43. *Tachys salemus* Andrewer
 Phân bố: Hà Bắc (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
44. *Tachys truncatus* Nietner
 Synonym: *Bembidium truncatus* Nietner
Nestra (?) truncatus Motschulsky
Tachys truncatus Andrewer
Tachys tenelus Andrewer
 Phân bố: Quảng Ninh (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
45. *Tachys umbrosus* Motschulsky
 Synonym: *Tachys parallelus* Motschulsky
Acupalpus extremus Walker
Tachymenis umbrosus Motschulsky
Tachys nietneri Schaum
Tachys umbrosus Bates
 Phân bố: Ninh Bình (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).
46. *Bembidion eutherum* Andrewer
 Synonym: *Bembidium eutherum* Andrewer
Bembidion eutherum Jedlicka
 Phân bố: Hải Hưng (Viện BVTV, 1976; Phạm Văn Lâm, 1997).
47. *Bembidion* sp₁
 Phân bố: Yên Bái, Lạng Sơn, Bắc Thái, Tây, Hải Hưng, Nam Hà, Ninh Bình, Tĩnh Bình, Thanh Hóa, Nghệ An (Viện BVTV 1976; Phạm Văn Lâm, 1997).
48. *Bembidion* sp₂
 Phân bố: Lạng Sơn, Hà Tây, Hải Hưng, Tĩnh Bình, Nghệ An (Viện BVTV, 1976; Phạm Văn Lâm, 1997).
49. *Bembidion* sp₃
 Phân bố: Thanh Hóa, Nghệ An (Phạm Văn Lâm, 1997).
50. *Bembidion* sp₄
 Phân bố: Lào Cai, Hà Tây, Hải Hưng, Thái

Bình, Nghệ An (BVTV, 1976).

51. **Elaphropus shunichii* Saito

Phân bố: Lào Cai.

52. **Morion orientali*

Phân bố: Gia Lai.

Tộc Trechini

53. **Trechus vietnamicus* Ueno

Phân bố: Vĩnh Phúc.

54. **Trechiotus perroti* (Jeanel)

Phân bố: Hà Bắc.

55. **Trechiotus luticola* (Jeanel)

Phân bố: Ninh Bình.

56. **Paratrechiotus ocydromoides* Ueno

Phân bố: Hà Tây.

57. **Vitotrechus minutissimus* Ueno

Phân bố: Vĩnh Phúc.

Tộc Pterostichini

58. **Abacetus* sp.

Phân bố: Gia Lai.

59. **Trigonotoma dohrni* Chaudoir

Phân bố: Bắc Bắc Bộ, Nam Bộ (Cochinchine)
[Mission Pavie, 1879-1895], Hà Giang (Viện
BVTV, 1976).

60. **Trigonotoma lewissii* Bates

Phân bố: Hà Nội, Hà Tây.

61. **Triplogenus magnus* Wiedmann

Phân bố: Hà Tây (Viện BVTV, 1976).

62. **Pterostichus* sp.

Phân bố: Nghệ An.

Tộc Agonini

63. **Agonius* sp.

Phân bố: Gia Lai.

Tộc Platynini

64. **Platynustopus flavilabris*

Phân bố: Quảng Ninh.

65. **Colpodes* sp.

Phân bố: Quảng Ninh.

66. **Coptoderina* sp.

Phân bố: Nghệ An.

67. **Dicranoncus femoralis* Chaudoir

Phân bố: Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Lâm
Đồng.

Họ Brachinidae

68. **Pherosophus catorei* Schmidt

Phân bố: Hải Phòng, Vĩnh Phúc (Mai Quý
ctv., 1981, Lê Khương Thúy, 1989).

69. **Pheropsophus cognatus*

Phân bố: Gia Lai.

70. **Pheropsophus javanus* Schmidt

Synonym: *Brachinus javanus* Dejean

Brachinus fibriatus Dejean

Brachinus interruptus Dejean

Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv., 1981, I
Khương Thúy, 1989).

71. **Pheropsophus jessoensis* Morawitz

Synonym: *Brachinus jessoensis* Morawitz

Brachinus jessoensis Morawitz

Brachinus jessoensis Morawitz

Brachinus javanus Dejean

Phân bố: Bắc Thái, Hà Giang, Hà Tây, H
Hưng, Hải Phòng, Lai Châu, Nam Hà, Ng
An, Quảng Ninh, Thanh Hóa, Gia Lai, K
Tum (Viện BVTV, 1976; (Mai Quý và ct
1981; Lê Khương Thúy, 1989; Phạm V
Lâm, 1989, 1997).

72. **Pheropsophus marginicollis* Motschulsky

Phân bố: Hòa Bình, Lai Châu, Nghệ A
Quảng Ninh, Thanh Hóa (Viện BVTV, 197
Phạm Văn Lâm, 1997).

73. **Pheropsophus occipitalis* (Macleay)

Synonym: *Brachinus (Aptinus) occipitalis*
Macleay

Brachinus ambiguus Dejean

Brachinus occipitalis Macleay

Pheropsophus quadripustulatus
Chaudoir

Phân bố: Gia Lai, Kon Tum (Lê Khương Thúy, 1989).

74. *Brachinus lewisii* Bates

Synonym: *Brachynus (Brachynolomus) lewisi* Bates

Brachynus (Cnecostolus) lewisi Bates

Phân bố: Gia Lai, Kon Tum (Lê Khương Thúy, 1989).

75. *Brachinus* sp₁

Phân bố: Gia Lai.

76. *Brachinus* sp₂

Phân bố: Gia Lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Andrewer H. E., 1929: Coleoptera. Carabidae. London, Vol.I, 323.

2. Andrewer H. E., 1935: Coleoptera. Carabidae. London, Vol.II, 430.

3. Habu A., 1967: Carabidae truncatipennes group (Insect: Coleoptera). Biogeographical Society of Japan, 167: 338.

4. Habu A. 1961: Nature and life in Southeast Asia. Thailand, Vol.I.

5. Habu A. 1961: Nature and life in Southeast Asia. Thailand, Vol.III.

6. Kết quả điều tra cơ bản côn trùng năm 1976-1968: Viện Bảo vệ thực vật.

7. Phạm Văn Lâm, 1997: Danh lục các loài sâu hai lúa và thiên địch của chúng ở Việt Nam. NXBNN, 165.

8. Phạm Văn Lâm, 1994: Góp phần tìm hiểu thành phần loài trong tộc Odacanthini (Coleoptera, Carabidae) ở Việt Nam. Tạp chí BVTV. 2(134): 7-11.

9. Lê Khương Thúy, 1989: Bước đầu nghiên cứu họ Carabidae (Coleoptera) ở Việt Nam. Tạp chí Sinh học, 11(4): 32-35.

10. Lê Khương Thúy, 1990: Giống Ophionea Klug (Coleoptera, Carabidae) ở Tây Nguyên. Tuyển tập công trình nghiên cứu Sinh thái và TNSV, 45-46.

11. Mai Quý và ctv, 1981: Kết quả điều tra cơ bản côn trùng miền Bắc Việt Nam (1960-1970). NXB KHKT.

12. Morita S., 1995: A new Species of the Genus Eobrosicus (Coleopter, Carabidae) from Northern Vietnam. Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. A, 21(I): 7-11, March 22.

13. Imura Y., 1995: Notes on two Apotomopterus Species (Coleopter, Carabidae) from Northern Vietnam. Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. A, 21(I): 1-5, March 22.

14. Saito A., 1995: A new Apterous Tachyine (Coleoptera, Carabidae, Bembidiinae) from Northern Vietnam. Spec. Bull. Jpn. Soc. Coleopterol., Tokyo (4): 233-237, March 28.

15. Ueno S. I., 1994: The Coleoptera of Japan in color. Hoikusha.

CHECKLIST OF THE FAMILY CARABIDAE (COLEOPTERA) IN VIETNAM

PART I: SUBFAMILY CARABINAE AND FAMILY BRACHINIDAE

LE KHUONG THUY

SUMMARY

This paper presents the check list of Carabid species found in Vietnam during the last years with 25 genera, 76 species. Among them, 19 genera with 24 species are new for the Carabid fauna in Vietnam.

Ngày nhận bài: 16-6-1999

HOẠT TÍNH CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM PHILATỐP THỰC VẬT VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA CHÚNG ĐẾN SỰ HẤP THU GLUCOSE Ở RUỘT NON CỦA CÁ ĐỐI MỤC (*MUGIL CEPHALUS*)

NGUYỄN ĐỨC QUANG, TRẦN DUY NGÀ

Trường đại học khoa học - Đại học Huế

Nghiên cứu và ứng dụng các chế phẩm mô động vật điều chế theo phương pháp philatốp (chế phẩm philatốp) nhằm phòng, chữa bệnh, kích thích sinh trưởng và nâng cao năng suất đàn gia súc và gia cầm được tiến hành rộng rãi ở nước ta và nhiều nước trên thế giới [1, 2, 3, 5, 6]. Trong khi đó chế phẩm philatốp thực vật tuy được thừa nhận có tác động kích thích từ lâu, nhưng lại ít được nghiên cứu, mặc dù nguồn thực vật ở nước ta khá phong phú về số lượng và giá trị sử dụng.

Thừa Thiên-Huế có tiềm năng thủy sản lớn, đặc biệt là các thủy sản có giá trị như: tôm, cua, sò, cá, ngao... cùng với khu hệ thực vật phong phú. Nghiên cứu tác động của một số chế phẩm philatốp thực vật nhằm ứng dụng để tăng nhanh sản lượng các thủy sản nuôi trồng đang là đề tài thu hút các nhà thực nghiệm.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được tiến hành trong phòng thí nghiệm Trường Đại học Khoa học Huế. Các chế phẩm được tách chiết thống nhất theo phương pháp philatốp [1] cùng ở một điều kiện và được thử hoạt tính theo phương pháp của Bakingiev cải tiến [1]. Hấp thu glucose được tiến hành theo phương pháp túi lộn ngược của Wilson và Wiseman [8]. Hàm lượng glucose được xác định bằng đường kế ATAGO. Cá đối mục khỏe mạnh và đồng đều về kích thước ở các lô. Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Hoạt tính sinh học của các chế phẩm mô thực vật:

Chúng tôi sử dụng lá của 16 loài thực vật

thuộc 13 họ [4] để tách chế phẩm philatốp và xác định hoạt tính của chúng bằng phương pháp Bakingiev. Kết quả thí nghiệm trình bày ở bảng 1 cho thấy tất cả các chế phẩm mô thực vật đều có hoạt tính sinh học.

Tuy nhiên ở lá của các loài thực vật khác nhau khi bị tác động bởi những điều kiện không thuận lợi của môi trường, hình thành các chất kích thích sinh học với cường độ không như nhau. Có loài tạo chất kích thích sinh học thấp như long tu, dền trắng, lẻ bạn, tỏi lồi, bầu, sấu đông. Hoạt tính sinh học của chế phẩm philatốp điều chế từ chúng đạt từ 103,45% đến 418,37% so với đối chứng (đối chứng quy ước bằng 100%), tức cao hơn đối chứng từ 1,03 đến 4,18 lần.

Các loài như dền đỏ, khế chua, nam sâm, rau ngót, mã đề, cà chua, khoai, rau muống, dâu tằm có khả năng tạo chất kích thích sinh học có hoạt tính cao hơn. Hoạt tính sinh học của các chế phẩm tạo từ chúng cao hơn đối chứng trong khoảng từ 6,25 lần đến 9,34 lần. Đặc biệt chế phẩm được điều chế từ tỏi củ có hoạt tính rất cao, tương đương với hoạt tính của thuốc philatốp do xí nghiệp dược phẩm Hà Nội sản xuất. So với đối chứng hoạt tính của chế phẩm tỏi củ cao gấp 13,39 lần, còn hoạt tính của thuốc philatốp do xí nghiệp dược Hà Nội sản xuất cao gấp 13,93 lần.

Sự sai khác về hoạt tính sinh học của các chế phẩm mô từ các loài thực vật khác nhau có thể liên quan tới thành phần các chất hóa học khác nhau chứa trong lá của chúng và khả năng chống chịu của loài thực vật đó với điều kiện khắc nghiệt của môi trường. Bởi lẽ, quá trình tạo các chất kích thích là quá trình mang tính chất bảo vệ, được hình thành trong quá trình tiến

hóa nhằm thích nghi với điều kiện biến đổi của môi trường [6].

Lá của 1 loài thực vật ở các vị trí khác nhau so với đỉnh sinh trưởng khi ở trong điều kiện không thuận lợi có thể tạo ra các chất sinh học có hoạt tính khác nhau, lá cách xa đỉnh sinh trưởng hơn có khả năng tạo ra các chất kích thích có hoạt tính sinh học cao hơn. Trong thí nghiệm của chúng tôi chế phẩm philatốp tỏi củ có hoạt tính sinh học cao hơn chế phẩm philatốp tỏi mầm. Hoạt tính củ chế phẩm philatốp tỏi củ cao gấp 13,19 lần so với đối chứng, trong lúc đó chế phẩm philatốp điế chế từ tỏi mầm có hoạt tính cao hơn đối chứng là 8,41 lần.

Kết quả cho thấy có thể sử dụng một số chế phẩm philatốp thực vật có hoạt tính sinh học ca như chế phẩm philatốp tỏi củ, tỏi mầm ... bổ sung vào khẩu phần thức ăn của gia súc, gia cầm, cá, của các loài giáp xác có giá trị kinh tế như cua, tôm nhằm kích thích sinh trưởng, nâng cao hiệu quả kinh tế nuôi trồng. Điều cần thiết là phải nghiên cứu cơ chế tác dụng của chúng đến các chức năng sinh lý của động vật trong đó có hấp thu các chất dinh dưỡng khác nhau trong ruột non

Bảng 1

Hoạt tính sinh học của các chế phẩm philatốp thực vật

TT	Loại chế phẩm	Hoạt tính sinh học	% so với đối chứng
1	Long tu- <i>Aloe barbadensis</i> Mill	0,60±0,04	103,45
2	Dền trắng- <i>Amaranthus spinosuls</i> L.	0,92±0,11	158,62
3	Lẻ bẹ- <i>Rhoeo discolor</i> Hance	0,95±0,08	163,79
4	Tỏi lồi- <i>Crinum asiaticum</i> L.	1,28±0,06	220,68
5	Bầu- <i>Lagenaria siceraria</i> Stadley	1,98±0,26	341,37
6	Sầu đông- <i>Melia azedarach</i> L.	2,43±0,09	418,96
7	Dền đỏ- <i>Amaranthus tricolor</i> L.	3,63±0,21	625,86
8	Khế chua- <i>Averrhoa carambola</i> L.	4,15±0,27	715,51
9	Nam sâm- <i>Schefflera octophylla</i> Harms	4,75±0,31	818,96
10	Rau ngót- <i>Sauropus androgynus</i> L.	4,43±0,95	763,79
11	Mã đề- <i>Plantago major</i> L.	5,10±0,14	879,31
12	Cà chua- <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	5,17±0,12	891,37
13	Khoai lang- <i>Ipomoea batatas</i> L.	4,98±0,12	858,62
14	Rau muống- <i>Ipomoea aquatica</i> L.	5,22±0,15	900,00
15	Dâu tằm- <i>Morus alba</i> L.	5,42±0,23	934,48
16	Tỏi củ- <i>Allium sativum</i> L.	7,7±0,07	1339,65
17	Tỏi mầm- <i>Allium sativum</i> L.	4,88±0,08	841,37
18	Thuốc philatốp-xí nghiệp dược Hà Nội	8,08±0,53	1393,10
19	Đối chứng	0,58±0,06	

2. Ảnh hưởng của chế phẩm phylatốp tòi củ đến hấp thu glucose 7% ở ruột non cá đối mục:

Ở các nồng độ nghiên cứu từ 0,1 ml đến 0,8 ml/5 ml dung dịch glucose, phylatốp tòi củ có khả năng tăng cường tích lũy (accumulation) và hấp thu glucose trong ruột non cá đối mục (bảng 2). Hiệu quả kích thích tích lũy và hấp thu glucose của phylatốp tòi củ với các liều tác dụng khác nhau không như nhau.

Trong giới hạn nồng độ từ 0,1 ml đến 0,3

ml/5 ml dung dịch glucose 7%, khi tăng nồng độ phylatốp tòi củ thì cường lực hấp thu đường đơn này cũng tăng theo. Ở nồng độ 0,3 ml phylatốp/5 ml dung dịch glucose hấp thu đường đơn này cao nhất, đạt 68,43%, cao gấp 5 lần so với đối chứng và tiếp sau đó xu hướng chung là tăng liều tác dụng, sự kích thích hấp thụ của phylatốp tòi củ giảm dần xuống. Tác dụng tăng cường tích lũy glucose ở vùng niêm mạc ruột non cá đối mục dưới tác dụng của phylatốp tòi củ với các nồng độ khác nhau cũng có quy luật tương tự như vậy.

Bảng 2

Hấp thu glucose ở ruột non cá đối mục dưới tác dụng của phylatốp tòi củ (30 phút nghiên cứu)

Lô TN	Nồng độ phylatốp (ml/5 ml dung dịch glucose)	Lượng glucose tích lũy (mg)	Lượng glucose hấp thụ (mg)	% hấp thụ
	Đối chứng	13,32±0,11	47,82±0,25	13,66
1	0,1	60,15±0,24	162,65±0,23	46,20
2	0,2	110,49±0,25	226,15±0,38	64,61
3	0,3	115,67±0,48	239,52±0,75	68,43
4	0,4	75,19±0,56	221,21±0,76	63,20
5	0,5	52,21±0,73	149,25±0,92	42,20
6	0,6	15,63±0,52	69,72±0,54	19,92
7	0,7	12,22±0,46	52,51±0,87	15,00
8	0,8	10,15±0,39	50,12±0,36	14,32
9	0,9	4,11±0,28	9,17±0,22	2,62

3. Ảnh hưởng của chế phẩm phylatốp tòi mầm đến hấp thu glucose 7% ở ruột non cá đối mục:

Với các nồng độ mà chúng tôi sử dụng nghiên cứu, phylatốp tòi mầm đều có khả năng tăng cường tích lũy glucose ở niêm mạc ruột non cũng như vận chuyển đường đơn này qua màng tế bào hấp thu của cá đối mục (bảng 3).

Ở lô thí nghiệm 4 với nồng độ 0,4 ml/5 ml dung dịch glucose, hấp thu đường đơn này cao nhất, đạt 62,95% cao gấp 4,6 lần so với đối chứng, còn ở lô thí nghiệm 9 đạt giá trị thấp nhất, hấp thu glucose đạt 15,84%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tác dụng của phylatốp tòi củ đến hấp thu glucose ở ruột non cá đối mục cao hơn so với tác dụng của phylatốp tòi mầm.

Như vậy, tòi dưới dạng cồn tòi được dùng để điều trị các bệnh như thấp khớp, tim mạch, viêm hệ hô hấp, tiêu hóa, kích thích hệ thống miễn dịch trong cơ thể, còn tòi dưới dạng phylatốp tòi có thể sử dụng để tăng cường quá trình hấp thu glucose ở động vật nuôi cũng như ở những người có hội chứng suy hấp thu (malabsorption).

Bảng 3**Hấp thu glucose ở ruột non cá đối mục dưới tác dụng của phillatốp tối thiểu 30 phút nghiên cứu)**

Lô TN	Nồng độ phillatốp (ml/5 ml dung dịch glucose)	Lượng glucose tích lũy (mg)	Lượng glucose hấp thụ (mg)	% hấp thụ
	Đối chứng	13,32±0,11	47,82±0,25	13,66
1	0,1	59,29±0,15	160,19±0,18	45,76
2	0,2	62,27±0,35	165,27±0,23	47,22
3	0,3	103,55±0,59	219,55±0,48	62,72
4	0,4	111,22±0,38	220,35±0,61	62,95
5	0,5	79,65±0,30	192,15±0,27	54,90
6	0,6	55,65±0,36	162,15±0,58	46,43
7	0,7	49,51±0,59	134,12±0,38	38,32
8	0,8	33,72±0,46	100,12±0,59	28,60
9	0,9	23,16±0,54	55,44±0,63	15,84

4. Ảnh hưởng của chế phẩm phillatốp rau ngót đến hấp thu glucose 7% ở ruột non cá đối mục:

Sự gắn nối glucose với bề mặt niêm mạc ruột non và vận chuyển đường đơn này qua enterocyte cũng chịu sự tác động kích thích của chế phẩm phillatốp rau ngót (bảng 4).

Bảng 4**Hấp thu glucose ở ruột non cá đối mục dưới tác dụng của phillatốp rau ngót (30 phút nghiên cứu)**

Lô TN	Nồng độ phillatốp (ml/5 ml dung dịch glucose)	Lượng glucose tích lũy (mg)	Lượng glucose hấp thụ (mg)	% hấp thụ
	Đối chứng	13,32±0,11	47,82±0,25	13,66
1	0,1	42,26±0,21	100,23±0,37	28,63
2	0,2	75,42±0,13	160,59±0,87	45,88
3	0,3	89,61±0,82	175,27±0,21	50,07
4	0,4	94,25±0,15	188,16±0,41	53,76
5	0,5	98,78±0,83	190,17±0,23	54,33
6	0,6	98,75±0,31	191,51±0,70	54,71
7	0,7	86,61±0,50	170,35±0,60	48,67
8	0,8	80,22±0,42	162,22±0,54	46,34
9	0,9	39,97±0,32	97,19±0,56	27,76

Ở các nồng độ từ 0,1 ml đến 0,9 ml trong 5 ml dung dịch glucose, philatốp rau ngót đều có khả năng tăng hấp thu glucose. Hấp thu glucose đạt giá trị cao nhất ở lô thí nghiệm 6 với nồng độ chế phẩm 0,6 ml/5 ml dung dịch glucose. Trong 30 phút thí nghiệm lượng glucose hấp thu được đạt 54,71% tăng 3,6 lần so với đối chứng. Ở các lô thí nghiệm 4 và 5 với nồng độ chế phẩm tương ứng 0,4, 0,5 ml/5 ml dung dịch glucose hấp thu cũng đạt giá trị cao. Dịch chiết rau ngót cũng có tác dụng tăng cường hấp thu đường glucose, nhưng hiệu quả kích thích thấp hơn so với philatốp rau ngót với các liều nghiên cứu tương ứng.

Kết quả của chúng tôi phù hợp với những kết luận của R.O. Phahtenberg (1967), I. A. Calasnhic (1974), khi các tác giả này nghiên cứu ảnh hưởng của các chế phẩm philatốp động vật đến hấp thu glucose trong ruột non của một số loài gia súc, gia cầm. Theo R.O. Phahtenberg [7] chế phẩm philatốp nhau thai phụ nữ, tinh hoàn, lách có tác dụng tăng hấp thu glucose ở ruột non chó lên 51,3%.

Tác dụng kích thích hấp thu của chế phẩm philatốp là kết quả tác động tổng hợp của các chất khác nhau có trong chế phẩm đến hệ thống vận tải trên màng enterocyte, tăng khả năng gắn nối của glucose với các phân tử protein vận tải cũng như tốc độ vận chuyển và giải phóng glucose vào trong tế bào. Trong đó vai trò quan trọng có thể thuộc về ion Na^+ và các axit amin như arginin, axit glutamic... có trong thành phần của chế phẩm philatốp.

IV. KẾT LUẬN

1. Trong điều kiện môi trường không thuận lợi, các loài thực vật khác nhau đều có khả năng tạo các chất kích thích sinh học khác nhau.

2. Philatốp tỏi củ và philatốp tỏi mầm đều có tác dụng tăng cường tích lũy và hấp thu glucose trong ruột non của cá đối mục. Philatốp tỏi củ có tác dụng mạnh hơn. Ở nồng độ 0,3 ml philatốp tỏi củ/5 ml dung dịch glucose 7%, hấp thu glucose đạt giá trị cao nhất, cao gấp 5 lần so với đối chứng.

3. Philatốp rau ngót tăng cường hấp thu

glucose mạnh hơn dịch chiết của nó. Ở nồng độ 0,6 ml philatốp rau ngót/5 ml dung dịch glucose 7% hấp thu glucose cao nhất, cao gấp 3,6 lần so với đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Calasnhic I. A., 1974: Các chất kích thích sinh học trong chăn nuôi và thú y (tiếng Nga). NXB "Urôria", Kiev.

2. Trịnh Hữu Hằng và ctv, 1977: Ảnh hưởng của các chất kích thích sinh học philatốp đối với sự tăng trọng, các chỉ tiêu sinh lý máu, sự tiêu hao oxi và khả năng hoạt động thần kinh của chuột nhắt trắng. Báo cáo khoa học tại Hội nghị khoa học lần thứ XV, khoa Sinh, Đại học Tổng hợp Hà Nội.

3. Nguyễn Như Hiền và ctv, 1977: Ứng dụng các chất có hoạt tính sinh học cao làm tăng sinh sản và tăng trọng cho đàn lợn nông trường Tam Thiên Mầu. Báo cáo khoa học tại hội nghị khoa học lần thứ XV, khoa Sinh, Đại học Tổng hợp Hà Nội.

4. Phạm Hoàng Hộ, 1993: Cây cỏ Việt Nam ($T_1 - T_6$), Mekong printing, USA.

5. Nguyễn Tài Lương, 1976: Tăng nhanh năng suất chăn nuôi bằng các chế phẩm. Báo cáo khoa học thường thức, số 473.

6. Petrov V. N., Ananiev P. K., 1964: Các chất kích thích tăng trưởng và sinh sản động vật (tiếng Nga). NXB "Nauka", Alma-Ata.

7. Phahtenberg R. O., 1967: Hấp thu glucit, protit, lipit ở ruột (tiếng Nga). NXB "Nauka", Leningrad.

8. Nguyễn Thị Hải Yến, Trần Duy Nga, 1998: Thăm dò hoạt tính sinh học của một số chế phẩm và ảnh hưởng của chúng đến quá trình sinh trưởng, sinh sản của cua biển (*Scylla serrata*). Tạp chí sinh học, tập 20, số 2.

9. Wilson T. H., Wiseman G., 1954: The use of sars of the everted small intestine for the study of transference of substances from mucosal to the secosal surface. London J. physiol 123: 126.

(Xem tiếp trang 68)

MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN AZOTOBACTER VỚI CÁC GIAI ĐOẠN SINH TRƯỞNG CỦA CÂY TRỒNG

LÊ THỊ CHÂU, CAO NGỌC MINH TRANG,
TRƯỜNG BÌNH NGUYỄN, VŨ THỊ LIỄU

Phân viện Sinh học tại Đà Lạt

Sự có mặt của vi khuẩn *Azotobacter* trong đất trồng trọt không chỉ làm tăng hàm lượng đạm trong đất mà còn có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng nhờ những chất có hoạt tính sinh học do chúng tiết ra. Bằng thực nghiệm Mitsuxtin, 1983 đã chứng minh được rằng vi khuẩn *Azotobacter* có khả năng tiết ra những chất kích thích tăng trưởng thuộc loại auxin và những chất tương tự như giberellin. Ngoài ra ông còn phát hiện thấy chúng có sinh ra một số loại vitamin cần thiết cho sự trao đổi của thực vật như vitamin B₆, vitamin PP.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Hai đối tượng cây trồng theo dõi thí nghiệm là bắp cải và khoai tây.

- Lấy mẫu đất ở các thời điểm:

- Trước lúc gieo trồng (t_0)
- Sau khi gieo hạt hoặc trồng cây con (t_1)

- Sau 1 tháng kể từ ngày gieo hạt hoặc trồng cây con (cây đang sinh trưởng) (t_2)
- Sau 2 tháng (cây đang lớn dần) (t_3)
- Sau 3 tháng (chuẩn bị thu hoạch) (t_4)
- Sau khi thu hoạch (t_5)
- Môi trường sử dụng là môi trường Ashby.
- Xác định số lượng tế bào vi khuẩn *Azotobacter* bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên thạch đĩa.
- Vi khuẩn *Azotobacter* được nuôi cấy ở nhiệt độ 26-30°C.

II. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Thí nghiệm theo dõi sự biến động số lượng vi khuẩn *Azotobacter* đối với các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây trồng.

Lô A: trồng bắp cải

Lô B: trồng khoai tây

Lô	pH đất	Số lượng tế bào $\times 10^7$					
		t_0	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5
A	7,0	28,42	39,16	42,12	58,19	51,42	37,21
B	7,0	36,41	43,27	51,18	68,32	64,17	62,12

Để dễ dàng so sánh, chúng tôi biểu diễn số liệu trên dưới dạng đồ thị sau:

Qua bảng trên và đồ thị trên, chúng tôi rút ra những nhận xét sau:

Ở cả 2 lô sự phụ thuộc giữa số lượng tế bào vi khuẩn *Azotobacter* đối với cây trồng tuân

theo quy luật chung như sau:

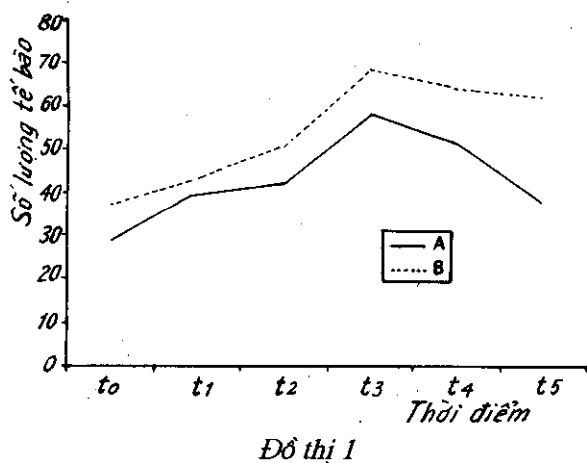
- Trong giai đoạn đầu khi cây bắt đầu bén rễ và lớn lên thì số lượng vi khuẩn *Azotobacter* bắt đầu tăng lên (t_1 - t_2).

- Số lượng tế bào vi khuẩn *Azotobacter* đạt cực đại vào thời điểm t_3 (lô A: $58,19 \cdot 10^7$, lô B:

68,32.10²), ứng với thời điểm khoai tây bắt đầu tạo củ và cây bắp cải đang sinh trưởng tốt.

- Số lượng tế bào vi khuẩn Azotobacter giữ tương đối ổn định trong thời kỳ t₃-t₄, tức là ứng với giai đoạn cây (củ) đang lớn dần lên, sắp đến kỳ thu hoạch.

- Sau khi thu hoạch số lượng tế bào vi khuẩn Azotobacter giảm đi rõ rệt ở lô A trồng bắp cải (từ 51,42.10² xuống 37,21.10²), còn ở lô B trồng khoai tây số lượng tế bào vi khuẩn Azotobacter giảm ít hơn (từ 64,17.10² xuống còn 62,12.10²).



Từ những nhận xét này chúng tôi nhận thấy sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn Azotobacter phụ thuộc vào hoạt động sống của cây trồng đang chung sống với nó. Vào những thời kỳ cây đang sinh trưởng và phát triển, hoạt động trao đổi chất mạnh mẽ, sản phẩm của cây thải nhiều vào đất vì số lượng vi khuẩn Azotobacter tăng lên. Ngược lại khi bước cây sang thời kỳ già, thì số lượng vi khuẩn Azotobacter giảm đi. Nói cách khác khi cây cần nhiều chất dinh dưỡng thì vi khuẩn Azotobacter phát triển tốt và hoạt động cố định nitơ mạnh mẽ.

III. KẾT LUẬN

Sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn Azotobacter trong đất trồng phụ thuộc vào hoạt động sống của cây trồng đang chung sống với nó. Số lượng của chúng tăng lên rõ rệt vào những thời kỳ cây đang sinh trưởng và phát

triển. Ngược lại khi cây bước sang thời kỳ già thì số lượng của chúng giảm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bạch Phương Lan, Lê Thị Châu, 1995: Tạp chí Sinh học, 17(2): 27-29.
2. Bạch Phương Lan, Lê Thị Châu, 1995: Tạp chí Sinh học, 19(4): 55-57.
3. Lê Thị Châu, Cao Ngọc Minh Trang, 1998: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 36(5): 15-18.
4. Lê Thị Châu, Cao Ngọc Minh Trang, Trương Bình Nguyên, 1998: Tạp chí Sinh học, 20(3): 56-59.
5. Nguyễn Lân Dũng, 1980: Nghiên cứu đất phân, tập 1. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
6. Đường Hồng Dật, 1979: Vi sinh vật trồng trọt. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Lao Thị Nga, 1990: Đạm sinh học và một số sản phẩm của vi sinh vật, NXB Tp. Hồ Chí Minh.
8. Misustin B. N. và cs., 1983: Sự cố định đạm sinh học trong khí quyển. NXB Moskva.
9. Nhiều tác giả, 1970: Đạm sinh học trong trồng trọt (Nguyễn Xuân Hiến dịch). NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
10. A. Quispel, 1974: The biology of nitrogen fixation. Publisher Newyork.
11. Peter H. Graham and Susan C. Haris, 1981: Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture.
12. F. J. Bergensen, 1980: Methods for evaluating biological nitrogen fixation.
13. M. Alexander, 1984: Advances in microbial ecology.
14. Y. A. Hamdi, 1982: Application of nitrogen fixing system in soil improvement and management.
15. Gary Stacey, Robert H. Burris and Harold J. Evans, 1992: Biological nitrogen fixation.

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE AZOTOBACTER GROWTH AND THE VEGETABLE

LE THI CHAU, *et al.*

SUMMARY

The growth and development of Azotobacter strains depend on life active of vegetable. The number Azotobacter strain increases rapidly when the vegetable is growing whereas the number of Azotobacter strain decreases when the vegetable is aging.

Ngày nhận bài: 11-5-19

(Tiếp theo trang 65)

BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOME PHILATOP PLANT EXTRACTS AND THEIR IMPACT ON THE GLUCOSE ABSORPTION IN THE SMALL INTESTINE OF *MUGIL CEPHALUS*

NGUYEN DUC QUANG, TRAN DUY NGA

SUMMARY

The extracts prepared by philatop's instructions (philatop plant extracts) from leaves of 16 plant species increase the glucose absorption in the small intestine of *Mugil cephalus*. The level of the increase depends on the plant species and have the most stimulating effect the philatop plant extracts of *Allium sativum* L. and *Sauropus androgynus* L..

Ngày nhận bài: 9-6-19

CONTENTS

		<i>Pages</i>
1 TRAN THAI BAI	: The Oligochaete family Ocerodrilidae Beddard, 1891 in Vietnam.	1-5
2 DOAN CANH, NGUYEN VU THANH	: Freelifing nematodes at the bracking water estuary mud of the Thivai river (Dongnai province).	6-9
3 VO THUONG LAN, A. KRAUSE	: Induction of Chalcone synthase expression by <i>Rhizobia</i> and Nod factors in root-hairs.	10-15
4 BUI XUAN NGUYEN <i>et al.</i>	: Cloning of Hla-An bovine embryos by nuclear transfer with adult somatic cells.	16-20
5 CHU HOANG MAU <i>et al.</i>	: Genomic assessment of some soybean mutant lines by the random amplified polymorphic DNA technology (<i>RAPD Technology</i>).	21-26
6 ĐANG TAT THE	: Ecological and biological characteristics of <i>Raillietiella orientalis</i> (Hett, 1915) Sambon, 1922 (<i>Pentastomida</i>) parasitizing in snakes.	27-32
7 LE TRONG SON	: Study about the pheromone of <i>Pachyteria fasciata</i> Fab. (<i>Coloptera: Cerambycidae</i>) destructor of sapodilla trees in ThuaThien-Hue province.	33-37
8 ĐANG THI CAM HA <i>et al.</i>	: Some physiological properties, the diesel oil degrading and biosurfactant producing capacities of the <i>Pseudomonas</i> strain XCK-MX1 isolated from the oil contaminated waste water in Vungtau.	38-43
9 NGUYEN XUAN THANH	: Some morphological, biological, ecological characteristics of two species <i>Chrysopa</i> sp. and <i>Ankylopteryx</i> sp. (Chrysopidae) at ratbutan in Dongtrieu district-Quangninh province.	44-47
10 LE XUAN TU <i>et al.</i>	: <i>Limulus</i> amoebocyte lysate assay (LAL-TEST) for detection and quantification of endotoxin.	48-52
11 PHAN THI BAY <i>et al.</i>	: Simple and fast method for the isolation of genomic DNA from rice (<i>Oryza sativa</i>) leaves.	53-55
12 LE KHUONG THUY	: Checklist of the family Carabidae (Coleoptera) in Vietnam. Part I: Subfamily Carabinae and family Brachinidae.	56-60
13 NGUYEN ĐUC QUANG, TRAN DUY NGA	: Biological activity of some plant extracts and their impact on the glucose absorption in the small intestine of <i>Mugil cephalus</i> .	61-65
14 LE THI CHAU <i>et al.</i>	: Relationship between the <i>Azotobacter</i> growth and growth phases of cultivated plants.	66-68

MỤC LỤC

		Trang
1 TRẦN THÁI BÁI	: Họ giun đất <i>Ocnerodrilidae</i> beddard, 1891 ở Việt Nam	1-5
2 ĐOÀN CẢNH, NGUYỄN VŨ THANH	: Tuyển trùng sống tự do ở vùng nước lợ cửa cái mép sông Thị Vải.	6-9
3 VÕ THƯỜNG LAN, A. KRAUSE	: Hoạt hóa gen mã cho Chalcone synthase bởi vi khuẩn cố định đạm <i>Rhizobia</i> và factor Nod.	10-15
4 BÙI XUÂN NGUYỄN và cộng sự	: Nhân bản phôi bò I là - Ấn bằng cấy nhân tế bào sinh dưỡng.	16-20
5 CHU HOÀNG MẬU và cộng sự	: Đánh giá genom của một số dòng đậu tương đột biến bằng kỹ thuật phân tích tính đa dạng của ADN được nhân bản ngẫu nhiên.	21-26
6 ĐẶNG TẤT THẾ	: Đặc điểm sinh thái, sinh học của loài chân khớp <i>Raillietiella orientalis</i> (Hett, 1915) Sambon, 1922 (<i>Pentastomida</i>) ký sinh ở rắn.	27-32
7 LÊ TRỌNG SƠN	: Về pherômon của loài xén tóc râu vàng <i>Pachyteria fasciata</i> Fab. (Coleoptera: Cerambycidae) hại cây hồng xiêm ở Tỉnh Thừa Thiên - Huế.	33-37
8 ĐẶNG THI CẨM HÀ và cộng sự	: Một số đặc điểm sinh lý, khả năng sử dụng dầu diesel và tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn <i>Pseudomonas</i> NCK-MX1 phân lập từ nước thải nhiễm dầu tại Vũng Tàu.	38-43
9 NGUYỄN XUÂN THÀNH	: Một số đặc điểm hình thái, sinh học, sinh thái của hai loài bộ mắt vàng <i>Chrysopa</i> sp. và <i>Ankylopteryx</i> sp. (Chrysopidae) trên vại thiêu Đông Triều, Quảng Ninh.	44-47
10 LÊ XUÂN TÚ và cộng sự	: Sử dụng chế phẩm sinh học LAL để xác định nội độc tố.	48-52
11 PHAN THỊ BẦY và cộng sự	: Phương pháp tách chiết nhanh và đơn giản ADN tổng số từ mô lá lúa (<i>Oryza sativa</i>).	53-55
12 LÊ KHUÔNG THÚY	: Danh lục các loài côn trùng cánh cứng chân chạy thuộc họ <i>Carabidae</i> (Coleoptera) ở Việt Nam. Phần I: Phân họ Carabinae và họ Brachinidae.	56-60
13 NGUYỄN ĐỨC QUANG, TRẦN DUY NGÀ	: Hoạt tính của một số chế phẩm phylatop thực vật và ảnh hưởng của chúng đến sự hấp thu glucose ở ruột non của cá đối mục (<i>Mugil cephalus</i>).	61-65
14 LÊ THỊ CHÂU và cộng sự	: Mối tương quan giữa quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn <i>Azotobacter</i> với các giai đoạn sinh trưởng của cây trồng.	66-68