

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 2

THÁNG 6-2000

HÀ NỘI

TẠP CHÍ
SINH HỌC

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

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

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

Thư ký tòa soạn : Trần Ngọc Trán

GIỐNG CỐC MÀY *LEPTOBRACHIUM* (ANURA, MEGOPHRYIDAE) Ở VIỆT NAM

HỒ THU CÚC

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Giống Cóc mây *Leptobrachium* là một trong 6 giống của họ Cóc bùn Megophryidae. Hệ thống danh pháp trong họ này cũng đang có nhiều sự thay đổi (Lathrop A., 1997) nên ở đây chúng tôi chỉ muốn đề cập riêng đến những thay đổi trong giống *Leptobrachium* liên quan đến các loài ở Việt Nam.

Giống *Leptobrachium* có một nhóm các loài có gai sừng dọc bờ hàm trên được Liu (1945) tách ra thành giống riêng *Vibrissaphora*. Nhưng Dubois (1980) sau khi xem xét các loài của *Vibrissaphora* và loài *L. Hasseltii* lại cho rằng sự có mặt của các gai ở hàm trên chưa đủ bảo đảm tính trạng của một giống, coi *Vibrissaphora* là Synonym (đồng danh) với *Leptobrachium*. Mặc dù có sự không nhất trí trên, nhưng nhiều tác giả vẫn coi *Vibrissaphora* là một giống riêng biệt (Lui et al., 1980; Tian et al., 1982; Yang et al., 1983; Li and Chen, 1986; Zhao and Adler, 1993). Cho đến thời điểm này thì giống *Leptobrachium* đã có 14 loài và loài phụ (gồm 9 loài thuộc giống *Leptobrachium* và 5 loài và loài phụ thuộc giống *Vibrissaphora*). Trong số trên chỉ có 2

loài (*L. chapaensis* và *L. pullum*) là có phân bố ở Việt Nam và Việt Nam chưa biết đến giống *Vibrissaphora*.

Năm 1998, trong công bố loài ếch mới (*Vibrissaphora echinatum*) cho Việt Nam, chính Dubois lại trở lại nhất trí rằng giống *Leptobrachium* có 2 giống phụ: *Leptobrachium* và *Vibrissaphora* (Alain Dubois & Annermarie Ohler, 1998). Cùng năm 1998, Lathrop A. và cộng sự cũng công bố 4 loài ếch mới cho Việt Nam trong đó có 2 loài thuộc giống *Leptobrachium* (*L. xanthospilum* và *L. banae*). Những phát hiện mới này đã làm số lượng loài trong giống *Leptobrachium* tăng từ 14 lên 17 loài, bổ sung cho khu hệ Việt Nam thêm 1 giống mới *Vibrissaphora* và 3 loài mới (*V. echinatum*, *L. xanthospilum*, *L. banae*). Nhờ những phát hiện mới đó mà chúng tôi có dịp xem xét lại vị trí phân loại của các loài thuộc giống *Leptobrachium* ở Việt Nam. Trong số 17 loài đã biết thì 5 loài có phân bố ở Việt Nam trong đó 4 loài thuộc giống phụ *Leptobrachium* và 1 loài thuộc giống phụ mới *Vibrissaphora* (xem bảng).

Danh sách các loài thuộc giống *Leptobrachium*

Giống phụ <i>Leptobrachium</i>	Giống phụ <i>Vibrissaphora</i>
1. <i>Leptobrachium abbotti</i>	1. <i>V. ailaonicum</i>
*2. <i>L. chapaense</i>	2. <i>V. boringii</i>
3. <i>L. gunungense</i>	3. <i>V. leishanense</i>
4. <i>L. hainanense</i>	4. <i>V. liui liui</i>
5. <i>L. hendrikson</i>	5. <i>V. liui yoshanense</i>
6. <i>L. hasseltii</i>	*6. <i>V. echinatum</i>
7. <i>L. montanum</i>	
8. <i>L. nigrops</i>	
*9. <i>L. pullum</i>	
*10. <i>L. xanthospilum</i>	
*11. <i>L. banae</i>	

*Các loài có phân bố ở Việt Nam

Đặc điểm của giống, giống phụ và 3 loài mới bổ sung cho khu hệ Việt Nam sẽ được giới thiệu lần lượt để tiện nghiên cứu.

Giống: *Leptobrachium* Tschudi, 1838

Đặc điểm nhận biết: Giống *Leptobrachium* gồm các loài có dài thân từ 30-102 mm. Đầu rộng bằng hoặc hơi dài hơn ống chân. Có màng nhĩ. Có răng hàm trên. Lưỡi khía hình chữ "V" sâu ở phía sau. Da lưng và các chi có nhiều đường gân nổi. Tuyến nách tương đối lớn nằm bên sườn, sau khớp tay. Đầu các ngón tròn. Ở con đực trong giai đoạn sinh sản không có gai ở ngực và ngón tay. Phần trên mõng mắt sáng màu khác phần dưới. Trứng có sắc tố.

Phân bố: Brunei, Trung Quốc (Phúc Kiến, Quảng Tây, Quảng Đông, Quý Châu, Hải Nam, Hồ Nam, Giang Tây, Tứ Xuyên, Vân Nam, Triết Giang), Ấn Độ (Meghalaya), Indônêxia (Bali, Java, Kalimantan, Sumatra), Lào, Malaixia (Malaya, Sabah, Sarawak), Mianma, Philippin (Bohol, Mindanao, Mindoro, Palawan), Singapo, Thái Lan và Việt Nam.

Giống *Leptobrachium* hiện tại có hai giống phụ: *Leptobrachium* và *Vibrissaphora* (Alain Dubois & Annemaria Ohler., 1998).

Giống phụ 1: *Leptobrachium* Tschudi, 1838

Đặc điểm nhận biết: Giống phụ *Leptobrachium* phân biệt với giống phụ *Vibrissaphora* bởi những đặc điểm sau: Dài thân con đực 30,2 - 74,1 mm, con cái 34,7 - 95 mm. Màng nhĩ rõ, da lưng tương đối mịn. Con đực trưởng thành có túi kều nhưng chi trước không phình rộng và không có gai sinh dục ở môi trên. Phần trên mõng mắt đỏ, da cam, đen hay xanh da trời. Nòng nọc có hoặc không có dấu "Y" ở phần trên gốc đuôi.

Phân bố: Brunei, Trung Quốc (Hải Nam, Vân Nam), Ấn Độ (Meghalaya), Indônêxia (Bali, Java, Kalimantan, Sumatra), Lào, Malaixia (Malaya, Sabah, Sarawak), Mianma, Philippin (Bohol, Mindanao, Mindoro, Palawan), Singapo, Thái Lan và Việt Nam.

Giống phụ *Leptobrachium* gồm 11 loài (xem bảng) với 5 loài có phân bố ở Việt Nam

trong đó có 2 loài mới *L. xanthospilum* và *L. banac*.

Giống phụ 2: *Vibrissaphora* Liu, 1945

Đặc điểm nhận biết: giống phụ *Vibrissaphora* phân biệt với giống phụ *Leptobrachium* bởi các đặc điểm sau: Dài thân con đực trưởng thành 69,4-102 mm, dài thân con cái trưởng thành 51,2-81 mm. Màng nhĩ rõ, da lưng khá sần sùi. Con đực trưởng thành có hoặc không có túi kều. Có cánh tay phình rộng và gai sinh dục ở hàm trên. Phần trên mõng mắt màu xanh da trời hay xanh lá cây. Nòng nọc có dấu hình chữ "Y" ở phần trên gốc đuôi.

Phân bố: Trung Quốc (Phúc Kiến, Quảng Đông, Quảng Tây, Quý Châu, Hải Nam, Hồ Nam, Giang Tây, Tứ Xuyên, Vân Nam, Triết Giang) và Việt Nam (Lào Cai).

Giống phụ *Vibrissaphora* gồm 5 loài (xem bảng) trong đó 4 loài đã là loài đặc hữu của Trung Quốc. Duy nhất loài *V. echinatum* mới phát hiện ở Sapa (Lào Cai) (Alain Dubois & Annemarie Ohler, 1998), bổ sung cho khu hệ Việt Nam 1 loài mới (loài đặc hữu) và cũng thêm 1 giống phụ mới *Vibrissaphora*.

Dưới đây là đặc điểm nhận biết 3 loài mới bổ sung cho khu hệ Việt Nam thuộc giống *Leptobrachium*.

Loài 1: *Vibrissaphora echinatum* Dubois and Ohler, 1998

Đặc điểm nhận biết: Là loài ếch khá lớn (dài thân 45,5-80,9 mm). Lưng màu nâu sẫm hay nâu đỏ nhạt với nhiều đường gân nhỏ, bên sườn lõm dốm mờ. Bụng nâu nhạt hay hơi xanh với những đốm trắng. Con cái có nhiều đốm sẫm trên lưng hơn con đực. Cả con đực và con cái đều có bụng và họng sáng hơn lưng với nhiều nốt trắng nhỏ. Chân có cùng màu với lưng và có những vệt ngang sẫm.

Đầu to và rộng, rộng đầu hơn dài đầu, phía trên phẳng. Mồm tròn không vượt quá hàm dưới nhiều. Dài mồm hơn đường kính mắt. Gò khoeo mắt sắc, vùng má lõm, loe ra. Gian mắt phẳng, rộng hơn mí mắt trên và gian mũi. Khoảng cách giữa hai góc trước mắt bằng 3/5 khoảng cách giữa hai góc sau mắt. Mũi hình oval, gần mắt hơn đầu mồm. Phần dưới mõng

mắt đen và phần trên có màu vàng chanh. Màng nhĩ không rõ. Có gờ lá mía, không có răng hàm trên. Lưỡi rộng, hơi có khía ở bờ. Gờ trên màng nhĩ rõ, kéo từ mắt đến vai. Một đặc điểm rất đặc biệt ở loài ếch này là con đực có nhiều gai sừng nhọn viền suốt hai bên hàm trên (29 - 31 gai cho mỗi bên hàm). Con cái của loài này tuy không có gai nhưng có những nốt trắng trên hàm tương ứng với vị trí này ở con đực.

Cánh tay tương đối ngắn, khỏe, phình rộng. Ngón khá dài và mảnh (tỷ lệ ngón tay: $II < IV < I < III$), đầu ngón tròn, không phình, không có rãnh. Ngón không có riềm da, không có màng, củ dưới khớp không rõ. Cẳng chân dài gấp ba lần rộng. Ngón chân ngắn, mảnh (tỷ lệ ngón

chân: $I < II < V < III < IV$) đầu ngón tròn, không phình, không có rãnh, có màng trung bình. Ngón V có riềm da kéo từ đầu ngón đến giữa đốt ngón. Các củ dưới khớp không rõ. Củ bàn chân trong rõ, dài bằng 1,5 lần dài ngón I. Không có củ bàn ngoài. Không có nếp viền cổ chân.

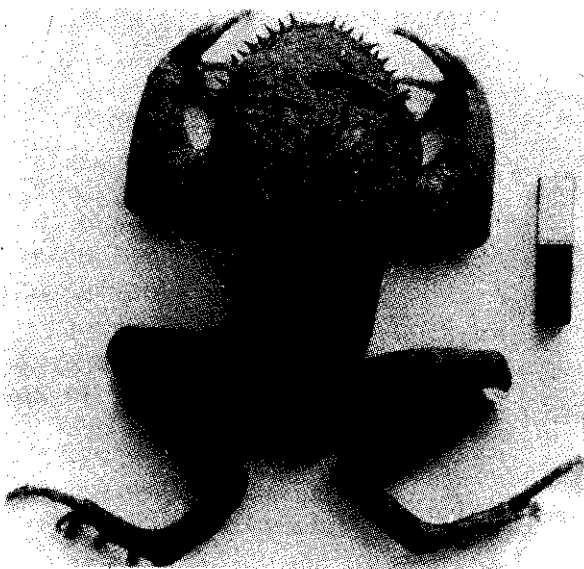
Da ở mõm và giữa ổ mắt nổi hạt, vùng bên đầu nhẵn với các gai sừng lớn. Phần hông, lưng, dưới đầu, thân và tứ chi đều có các tuyến hạt nhỏ.

Trái ngược với phần lớn các loài ếch nhái khác (con cái bao gồm cũng lớn hơn con đực) loài này có con đực lại lớn hơn con cái.

Tư liệu hiện có: Năm mẫu lưu trữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật (1 con cái có dài thân 45,5 mm và 4 con đực: 60,8 mm; 64,4 mm; 71,5 mm; 68,9 mm). Năm mẫu lưu trữ tại Bảo tàng Lịch sử tự nhiên Paris (2 con đực: 80,9 mm; 73,7 mm và 3 con cái: 53,9 mm; 57,5 mm; 51,2 mm). Số mẫu trên thu được ngày 9/10/1997 dưới các tảng đá trong suối nước chảy qua khu rừng nguyên sinh gần xã I Ninh Hồ, Sa Pa (Lào Cai) trên dãy Fan Si Pan ($20^{\circ}19'N$, $103^{\circ}47'E$), độ cao 1600 - 2090 m.

**Loài 2: *Leptobrachium*
xanthospilum Lathrop, Murphy,
Orlov và Ho, 1998**

Đặc điểm nhận biết: Có kích thước lớn (dài thân 62,8 - 84,8 mm). Lưng và chi màu nâu tối. Chân có những vết sẫm phía mặt trên đùi và đầu gối. Hông có 7-8 nốt vàng to và rõ. Bụng đồng màu nâu sẫm với những mụn nâu sáng rải rác tập trung dày hơn ở họng và cằm. Đầu ngón và các củ dưới bàn tay chân màu trắng. Viền mắt



Ảnh 1. Loài ếch gai hàm (*V. echinatum*) mẫu ở Sapa (mẫu chết)

vàng, nửa trên mõm mắt màu trắng. Tuyến ngực ở hốc nách phía sau khớp tay.

Đầu to, rộng, dẹt từ phía trên xuống. Gian mắt và trán phẳng. Gờ mõm tròn, vùng má xiên, hơi lõm. Khoảng cách từ mũi đến đầu mõm bằng $1/3$ khoảng cách từ mũi đến mắt. Mắt to và lồi, đường kính mắt lớn hơn dài mõm. Màng nhĩ to bằng $2/3$ đường kính mắt và cách mắt một khoảng bằng $4/5$ đường kính màng nhĩ. Nếp da trên màng nhĩ kéo từ góc sau mắt tới khớp hàm. Gian ổ mắt bằng $1/2$ rộng đầu. Nửa sau lưỡi tự do, xẻ hình chữ "V" rõ. Không có răng lá mía. Lỗ choane cách nhau một khoảng bằng 1,5 lần gian mũi.

Ngón tay dài, đầu ngón không phình. Ngón I dài hơn ngón II, ngón II bằng ngón IV. Tay không có màng, diềm bên ngón yếu. Củ bàn trong oval lồi, củ bàn ngoài nhỏ hơn. Gờ dưới các ngón có kích thước khác nhau, củ ở gốc ngón không rõ. Ngón chân $1/3$ có màng. Củ bàn chân

trong to, dài bằng ngón I. Không có củ bàn ngoài. Củ dưới khớp giống ở tay trên ngón III, IV, V; 1 củ trên ngón II; ngón I không có củ dưới khớp. Gót chồng lên nhau nhiều, khi chân vuông góc với thân.

Da lưng mịn với mạng lưới các gân nhỏ kéo đến mặt trên của chi và mặt dưới cánh tay. Bụng, ngực, họng và vùng gần hậu môn có nhiều mụn nhỏ.

Loài này có thể phân biệt với tất cả các loài *Leptobrachium* khác bởi sự có mặt của những nốt vàng to (màu kem trắng ở màu ướp) ở hông, sau chân và cằm. Bụng có màu tối đồng nhất với những nốt trắng rải rác chứ không sáng màu hay có những đốm sẫm màu như các loài khác và gót của nó chồng lên nhau nhiều, khi chân vuông góc với thân.



Ảnh 2. Loài cóc mày *L. xanthospilum* đang ghép đôi.
Mẫu ở Buôn Lưới (Gia Lai)

Tư liệu hiện có: Hai mẫu con cái (đài thân 83,2 mm; 84,8 mm), 8 mẫu con đực (đài thân từ 62,8 - 73,4 mm) và 26 mẫu nòng nọc đang biến thái. Mẫu thu được tại các điểm: Trạm Lập (14°26'24"N; 108°32'58"E), Buôn Lưới, Krongpa (14°20'29"N; 108°28'46"E) thuộc huyện K'Bang, tỉnh Gia Lai và các thời gian tháng 10/1993, 5/1995, 6/1996. Mẫu hiện đang lưu trữ tại Bảo tàng hoàng gia Ontario, Toronto Canada.

Loài 3: *Leptobrachium banae* Lathrop, Murphy, Orlov và Ho, 1998

Đặc điểm nhận biết: Là loài có kích thước lớn (đài thân 57,2 - 84,2 mm). Lưng và chi màu

nâu tối với những điểm đỏ da cam trên lưng, háng và bên sườn. Chân và tay có những băng đỏ da cam và đen. Mặt dưới của cánh tay, chân và bụng đen. Bụng có những nốt đỏ phân bố đều khắp. Tay và bàn chân xám kể cả củ bàn. Đầu ngón trắng. Màng nháy trắng. Nửa trên mõng mắt trắng.

Thân dài, đầu rộng dẹt từ trên xuống. Gian mắt và trán phẳng. Gò khóe mắt tròn, vùng má xiên hơi lõm. Mũi gần đầu mõm hơn mắt. Mắt to và lồi, đường kính bằng dài mõm. Màng nhĩ to khoảng 2/3 đường kính mắt và cách mắt một khoảng bằng 4/5 đường kính màng nhĩ. Nếp trên màng nhĩ kéo từ góc sau mắt đến khớp hàm. Gian mắt gần bằng 1/2 chiều rộng đầu.

Lưỡi 3/4 phía sau tự do, xẻ hình chữ "V" rõ. Không có răng lá mía. Lỗ *choane* cách nhau một khoảng hơi rộng hơn gian mũi.

Ngón tay dài, đầu ngón không phình. Ngón I ngắn hơn ngón II, ngón II bằng ngón IV. Tay không có màng, diềm bên yếu. Cũ bàn tay trong oval lõm, củ bàn ngoài nhỏ hơn củ bàn trong. Gờ dưới các ngón có kích thước khác nhau ở mỗi ngón, củ ở gốc ngón không rõ. Ngón chân 1/3 có màng. Củ bàn chân trong to bằng hoặc hơi dài hơn ngón I, không có củ bàn ngoài. Củ dưới bàn chân giống trên bàn tay ở ngón III, IV và V; 2 củ trên ngón II; 1 củ trên ngón I. Gót không chồng lên nhau khi chân vuông góc với thân.

Da lưng nhẵn với mạng lưới các đường gân kéo tới hoặc gần tới mặt trên của các chi. Sườn, ngực, bụng và hòng có những mụn nhỏ. Mặt dưới của chân nhẵn, có những mụn rải rác trên đùi và kéo đến bụng. Tuyến ngực ngay sau khớp cánh tay. Vùng giữa khớp hàm và mắt có nhiều củ nhỏ.

Tiếng kêu của con đực loài này gồm 2 tiếng to "crock.... crock" nhắc lại mỗi phút, tiếp theo là 5 - 8 âm yếu ngắt quãng. Vào mùa mưa (9 - 1997) các mẫu tìm thấy ở tầng sát đất trong tán rừng cách xa suối nước.

Tư liệu hiện có: 2 mẫu con cái có dài thân 72,1 mm và 84,2 mm; 17 mẫu con đực có dài thân từ 57,2 - 70 mm được sưu tầm tháng 9/1997 tại Krongpa, huyện K'Bang tỉnh Gia Lai (14°20'29"N, 108°28'46" E) ở độ cao 850 m. Mẫu hiện đang được lưu giữ tại Bảo tàng hoàng gia Ontario, Toronto Canada.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alain Dubois & Annemarie Ohler, 1998: A new species of *Leptobrachium* (*Vibrissaphora*) from northern Vietnam, with a review of the taxonomy of the genus *Leptobrachium* (Pelobatidae, Megophryinae). *Dumerilia*, 4(1): 1 - 32.
2. Datong Yang, 1980: The Amphibia-Fauna of Yunnan. China Forestry Press, Beijing: p. 1-259 (In Chinese).
3. Dubois A., 1980: Notes sur la Systematique et la Repartition des Amphibiens Anoures de Chine et des Regions Avoisinantes. IV. Classification Generique et Subgenerique des Pelobatidae Megophryinae, Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon 49: 469-482.
4. Er-Mi Zhao and Kraig Adler, 1993: Herpetology of China, Soc. Study Amph. Rept.: 527
5. Lathrop A., 1997: Taxonomic review of the Megophryid frogs (Anura, Pelobatoidea), *Asiat. Herp. Res.*, 7: 68-79.
6. Lathrop A., Murphy R. W., Orlov N. L., Ho C. T., 1998: Two new species of *Leptobrachium* (Anura, Megophryidae) from the central Highlands of Vietnam with a redescription of *Leptobrachium chapaense*, *Russ. J. Herpetol.*, 5(1): p. 51-60.
7. Nguyễn Văn Sáng, Hồ Thu Cúc, 1996: Danh lục bò sát và ếch nhái Việt Nam, Nhà xuất bản KHKT, Hà Nội: 264 tr.

THE FROG GENUS *LEPTOBRACHIUM* (ANURA, MEGOPHRYIDAE) IN VIETNAM

HO THU CUC

SUMMARY

The genus *Leptobrachium* (Megophryidae) has two subgenera *Leptobrachium* and *Vibrissaphora*. The subgenus *Vibrissaphora* was found in Vietnam for the first time by the discovery of the species *V. echinatum* in Sapa (Laocai province). With two new species for Vietnam of the genus *Leptobrachium*: *L. xanthospilum* and *L. banae* (from Gialai province), they are presented with their description, distribution and examined materials. A list of the known species and the diagnostic characters of the two subgenera of the genus *Leptobrachium* are provided.

Ngày nhận bài: 28-10-1999

CÁC CHỦNG XOÁN KHUẨN Ở NGƯỜI VÀ GIA SÚC TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM

NGUYỄN THỊ NGÂN, NGUYỄN MẠNH XUỐC,
NGUYỄN NGỌC TIẾN

Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương

Bệnh xoắn khuẩn (leptospirosis) là bệnh zoonosis, bệnh chung cho người và gia súc. Các loài gặm nhấm như chuột, chồn, cáo.... là ổ chứa bệnh nguyên thủy. Ở nước ta, gia súc và người nhiễm bệnh với tỷ lệ cao, công nhân chăn nuôi dễ mắc bệnh do tiếp xúc với con vật bị bệnh [3, 6, 7, 12, 13].

Xoắn khuẩn xâm nhập vào cơ thể chủ yếu qua niêm mạc của đường tiêu hóa, niêm mạc mắt và qua da bị tổn thương. Xoắn khuẩn vào cơ thể qua đường tiêu hóa thông qua thức ăn và nước uống. Các gia súc bị bệnh còn do truyền từ cơ thể bị mẹ bị bệnh qua sữa vào cơ thể gia súc non mới sinh. Người truyền bệnh cho người ít khi xảy ra [5, 8, 10, 11].

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Từ năm 1994 đến 1998 đã khảo sát bệnh xoắn khuẩn ở một số địa điểm miền Bắc Việt Nam như Bắc Cạn (chợ Đồn), Hà Nội (Gia Lâm, Từ Liêm), Hà Tây (Mỹ Đức, Chương Mỹ), Hòa Bình (Lương Sơn), Nam Định (Hải Hậu), Nghệ An (Bến Thủy, Đô Lương), Ninh Bình (Hoa Lư, Tam Điệp), Hải Phòng (thành phố), Bắc Ninh (Thuận Thành), Bắc Giang (Trại Thọ Xương) v.v..

Sử dụng các môi trường nuôi cấy xoắn khuẩn: Fletcher, EMJH, Terkish.

Giữ giống ở tủ ấm ở 28°C-30°C, kiểm tra hoạt lực dưới kính hiển vi nền đen.

Xét nghiệm bệnh phẩm dùng phản ứng vi ngưng kết tan trên phiến kính (MAT) và sử dụng bộ kháng nguyên chẩn đoán gồm 12 chủng sau:

1. *Leptospira australis*
2. *L. autumnalis*
3. *L. bataviae*
4. *L. canicola*
5. *L. grippotyphosa*
6. *L. hebdomadis*
7. *L. icterohaemorrhagiae*
8. *L. mitis*
9. *L. poi*
10. *L. pomona*
11. *L. saxkoebing*
12. *L. sejroe*

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở các loài gia súc (GS):

Qua bảng 1 cho thấy chó bị nhiễm xoắn khuẩn nặng nhất chiếm 83,33%, bò nhiễm 42,29%, dê 33,83% và thấp nhất là lợn 30,54%. Tuy lợn nhiễm xoắn khuẩn thấp so với các loài khác, song bệnh xoắn khuẩn ở lợn cần phải quan tâm thích đáng vì theo quan điểm dịch tễ học bệnh xoắn khuẩn ở lợn là mối nguy hiểm cho sức khỏe cộng đồng hơn là bệnh xoắn khuẩn ở bò bởi vì số lượng lợn được nuôi trong các gia đình nhiều hơn bò. Ở nhiều khu vực trên thế giới như Hà Lan, Pháp, Úc, Mỹ, Nga lợn được coi là một trong những động vật có vú quan trọng nhất có liên quan tới bệnh xoắn khuẩn ở người và các gia súc nuôi tại nhà [2].

Bảng 1

Tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở các loài gia súc

TT	Loài	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ, %
1	Dê	1596	540	33,83
2	Lợn	2213	676	30,54
3	Bò	532	225	42,29
4	Chó	48	40	83,33
	Tổng:	4389	1481	33,74

2. Các chủng xoắn khuẩn phát hiện trên ở các loài gia súc (bảng 2):

Bảng 2

Các chủng xoắn khuẩn phát hiện ở các loài gia súc

TT	Các chủng	Tỷ lệ nhiễm các chủng xoắn khuẩn ở các loài gia súc (%)			
		Lợn	Bò	Chó	Dê
1	<i>Leptospira australis</i>	6,21	3,55	30,00	2,00
2	<i>L. autumnalis</i>	4,90	6,66	45,00	9,00
3	<i>L. bataviae</i>	25,90	43,11	15,00	18,00
4	<i>L. canicola</i>	11,83	6,22	62,50	15,00
5	<i>L. grippotyphosa</i>	17,90	10,66	10,00	15,00
6	<i>L. hebdomadis</i>	1,92	0,00	0,00	4,00
7	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	50,29	41,77	50,00	39,00
8	<i>L. mitis</i>	12,87	15,11	20,00	19,00
9	<i>L. poi</i>	9,31	3,11	0,00	11,00
10	<i>L. pomona</i>	16,42	20,90	0,00	27,00
11	<i>L. saxkoebing</i>	0,04	0,00	2,50	2,00
12	<i>L. sejroe</i>	2,21	0,00	10,00	6,00

Qua bảng 2 cho thấy:

- Dê nhiễm nặng nhất là chủng *L. icterohaemorrhagiae* 39,00%; tiếp theo *L. pomona* 27,00%; *L. mitis* 19,00%; *L. bataviae* 18,00%; *L. canicola* và *L. grippotyphosa* 15,00%.

- Lợn nhiễm nặng nhất *L. icterohaemorrhagiae* 50,29%; *L. bataviae* 25,60%; *L. grippotyphosa* 17,90% và *L. pomona* 16,42%.

- Bò nhiễm nặng nhất *L. bataviae* 43,11%; *L. icterohaemorrhagiae* 41,77%; *L. pomona* 20,90% và *L. mitis* 15,11%.

- Chó nhiễm nặng nhất *L. canicola* 62,50%; tiếp theo *L. icterohaemorrhagiae* 50,00%; sau đó *L. autumnalis* 45,00%; *L. australis* 30,00%; *L. mitis* 20,00% và *L. bataviae* 15,00%.

3. Các chủng xoắn khuẩn phát hiện ở người (bảng 3):

Theo Everard C. O. [4] chó và một số loài gặm nhấm là nguyên nhân chính gây bệnh xoắn khuẩn cho người. Để xác định người ở Việt Nam có bị nhiễm xoắn khuẩn không, tỷ lệ nhiễm là bao nhiêu, bị nhiễm chủng nào là chủ yếu? Chúng tôi kết hợp với Khoa lấy của Bệnh viện Bạch Mai tiến hành xét nghiệm để phát

hiện xoắn khuẩn ở người, các mẫu huyết thanh là máu của người nghi bị mắc bệnh xoắn khuẩn.

Xét nghiệm 82 mẫu huyết thanh người, thu được 47 mẫu dương tính, tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở người là 57,31%. Người bị nhiễm nặng

nhất là chủng *L. icterohaemorrhagiae* 51,06%; sau đó đến *L. grippotyphosa* 31,91%; tiếp theo *L. mitis* 27,65% và *L. bataviae* 25,53%. Hai chủng *L. canicola* và *L. pomona* nhiễm với tỷ lệ thấp, *L. canicola* nhiễm 6,38% và *L. pomona* nhiễm 4,25%.

Bảng 3

Các chủng xoắn khuẩn phát hiện ở người

TT	Các chủng	Mẫu dương tính	Theo chủng	
			Nhiễm	Tỷ lệ (%)
1	<i>Leptospira australis</i>	47	0	0,00
2	<i>L. autumnalis</i>	47	0	0,00
3	<i>L. bataviae</i>	47	12	25,53
4	<i>L. canicola</i>	47	3	6,8
5	<i>L. grippotyphosa</i>	47	15	31,91
6	<i>L. hebdomadis</i>	47	0	0,00
7	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	47	24	51,06
8	<i>L. mitis</i>	47	13	27,65
9	<i>L. poi</i>	47	0	0,00
10	<i>L. pomona</i>	47	2	4,25
11	<i>L. saxkoebing</i>	47	0	0,00
12	<i>L. sejroe</i>	47	0	0,00

4. Các chủng xoắn khuẩn phát hiện ở chuột (bảng 4):

Bảng 4

Các chủng xoắn khuẩn phát hiện ở chuột

TT	Các chủng	Mẫu dương tính	Theo chủng	
			Nhiễm	Tỷ lệ (%)
1	<i>Leptospira australis</i>	128	8	6,25
2	<i>L. autumnalis</i>	128	4	3,12
3	<i>L. bataviae</i>	128	24	18,75
4	<i>L. canicola</i>	128	14	10,93
5	<i>L. grippotyphosa</i>	128	1	0,78
6	<i>L. hebdomadis</i>	128	1	0,78
7	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	128	42	25,00
8	<i>L. mitis</i>	128	28	21,87
9	<i>L. poi</i>	128	0	0,00
10	<i>L. pomona</i>	128	37	28,90
11	<i>L. saxkoebing</i>	128	15	11,71
12	<i>L. sejroe</i>	128	35	27,34

Xét nghiệm 201 mẫu huyết thanh chuột thu được 128 mẫu dương tính, tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở chuột cao - 63,68%. Chuột nhiễm 11/12 chủng dùng để xét nghiệm bệnh xoắn khuẩn. Trong số các chủng chuột bị nhiễm, nhiễm cao nhất là chủng *L. pomona* 28,90%; *L. sejroe* 27,34%; *L. icterohaemorrhagiae* 25,00%. Tiếp theo *L. mitis* 21,87%; *L. bataviae* 18,75%; *L. saxkoebing* 11,71% và *L. canicola* 10,93%. Nhiễm thấp nhất *L. australis*, *L. autumnalis*, *L. grippityphosa* và *L. hebdomadis* với tỷ lệ tương đương 6,25%; 3,12%; 0,78% và 0,78%. Không phát hiện thấy *L. poi*.

III. KẾT LUẬN

1. Tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở dê 33,83%. Các chủng dê bị nhiễm: *L. bataviae* 18,00%; *L. canicola* 15,00%; *L. grippityphosa* 15,00%; *L. icterohaemorrhagiae* 39,00%; *L. mitis* và *L. pomona* 27,00%.
2. Tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở chó 83,3%. Các chủng chó bị nhiễm: *L. australis* 30,00%; *L. autumnalis* 45,00%; *L. bataviae* 15,00%; *L. canicola* 62,50%; *L. icterohaemorrhagiae* 50,00% và *L. mitis* 20,00%.
3. Tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở lợn 30,54%. Các chủng lợn bị nhiễm: *L. bataviae* 25,60%; *L. grippityphosa* 17,90%; *L. icterohaemorrhagiae* 50,29% và *L. pomona* 16,42%.
4. Tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở bò 42,29%. Các chủng xoắn khuẩn bò bị nhiễm: *L. bataviae* 43,11%; *L. icterohaemorrhagiae* 41,77%; *L. mitis* 15,11% và *L. pomona* 20,90%.
5. Tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở người 57,31%. Các chủng người bị nhiễm: *L. bataviae* 25,53%; *L. grippityphosa* 31,91%; *L. icterohaemorrhagiae* 51,06% và *L. mitis* 27,65%.
6. Tỷ lệ nhiễm xoắn khuẩn ở chuột 63,68%. Các chủng chuột bị nhiễm: *L. bataviae* 18,75%; *L. icterohaemorrhagiae* 25,00%; *L. mitis* 21,87%; *L. pomona* 28,90% và *L. sejroe* 27,34%.

* Trong những năm gần đây, tỷ lệ nhiễm bệnh xoắn khuẩn ở người và gia súc cao do:

- Bệnh xoắn khuẩn không được các cơ quan thú y cũng như y tế quan tâm thích đáng.

- Môi trường sống bị ô nhiễm nặng, mật độ dân cư cao, diện tích sống hẹp, môi trường xung quanh không được vệ sinh theo quy định.

- An toàn thực phẩm chưa được thực hiện theo đúng pháp lệnh thú y đã ban hành.

- Chuột là đại dịch trong những năm vừa qua, chuột phát triển và có ở khắp nơi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Blood D. C., and Henderson A. J., 1974: Leptospirosis. Veterinary Medicine.
2. Chernukha Y. G., Borozno N. I., Ananiana Y. V., 1988: Populations of pathogenic Leptospire differing in virulence in rodents. Zhurnal microbiology, epidemiology and immunobiology.
3. Đào Trọng Đạt và cộng sự, 1966: Bệnh xoắn khuẩn của động vật nuôi ở một số địa phương. Tạp chí khoa học kỹ thuật nông nghiệp.
4. Everard C. O. R., Ferdinand G. A., 1989: Leptospirosis in piggery workers on Trinidad. Journal of tropical medicine and hygiene.
5. Hart R. J. C., Gallagher J., Waitkins S., 1984: An outbreak of leptospirosis in cattle and man.
6. Lê Thanh Hải và cộng sự, 1986: Bệnh xoắn khuẩn ở chó. Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y 6.
7. Lê Thanh Hải và cộng sự, 1989: Những chủng xoắn khuẩn nhiễm ở đàn chó nghiệp vụ ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu KIKT thú y.
8. Leon Russell, 1994: Leptospirosis.
9. Phòng thí nghiệm xoắn khuẩn Viện Vệ sinh dịch tễ, 1962.
10. Sosova R. F., 1969: Epidemiology, "Colos" Moscow. Environmental and biological determinants for the prevalence of leptospirosis among wild small mammal hosts. International Journal of Zoonoses.
11. Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1987: Milker's fever (human leptospirosis) is

spreading.

12. **Vũ Đình Hưng, Nguyễn Thị Diên,** 1968-1978: Bệnh xoắn khuẩn ở gia súc và người. Kết quả nghiên cứu KHKI thú y.

13. **Vũ Đình Hưng,** 1994: Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ xoắn khuẩn ở gia súc Việt Nam và đặc tính sinh học của mầm bệnh. Luận văn phó tiến sĩ khoa học nông nghiệp.

LEPTOSPIRA ON MAN AND ON DOMESTIC ANIMALS IN THE NORTH VIETNAM

NGUYEN THI NGAN et al.

SUMMARY

The Microscopic Agglutination Test (MAT) has showed that:

1. The positive rate for *Leptospira* on goats 33.83%. Seroprevalent are: *L. bataviae*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. mitis* and *L. pomona*.
2. The positive rate for *Leptospira* on dog 83.3%. Seroprevalent are: *L. australis*, *L. autumnalis*, *L. bataviae*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. mitis*.
3. The positive rate for *Leptospira* on pig 30.54%. Seroprevalent are: *L. bataviae*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. pomona*.
4. The positive rate for *Leptospira* on cattle 42.29%. Seroprevalent are: *L. bataviae*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. mitis* and *L. pomona*.
5. The positive rate for *Leptospira* on man 57.31%. Seroprevalent are: *L. bataviae*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. mitis*.
6. The positive rate for *Leptospira* on rat 63.68%. Seroprevalent are: *L. bataviae*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. mitis*, *L. pomona* and *L. sejroe*.

Ngày nhận bài: 14-10-1999

VI SINH VẬT ƯA KIỀM VÀ ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN ƯA KIỀM CD 2-1 SINH ENZIM CHỊU KIỀM PHÂN LẬP ĐƯỢC Ở VIỆT NAM

LÊ GIA HY, LỖ TIẾN SỸ
Viện Công nghệ sinh học

NGUYỄN ĐÌNH QUYẾN
Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

Enzim kiềm có pH hoạt động nằm trong vùng kiềm và thường pH tối thích ở vùng 9 ÷ 11. Nghiên cứu sản xuất proteaza kiềm lần đầu tiên được công bố bởi Horikoski và tiếp đó là Aunstrup và cộng sự (1972).

Trong quá trình nghiên cứu của chủng vi sinh vật nhằm tìm kiếm các chủng có khả năng ứng dụng trong công nghiệp, chúng tôi phân lập được chủng xạ khuẩn CD 2-1 từ bể ủ rác thải. Chủng này vừa có khả năng chịu được nhiệt độ cao vừa có hoạt tính amilaza, xenlulaza và proteaza mạnh. Đã nghiên cứu môi trường và điều kiện lên men sản xuất enzim xenlulaza chủng xạ khuẩn CD 2-1 [4]. Do vậy, việc nghiên cứu các tính chất nuôi cấy, đặc điểm hình thái, tính chất sinh hóa và phân loại chủng xạ khuẩn này là cần thiết.

Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu tuyển chọn các chủng xạ khuẩn ưa kiềm sinh enzim kiềm và đặc điểm phân loại của chủng CD 2-1.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các mẫu đất, bùn hoạt tính, nước, rác thải lấy ở những vùng có pH kiềm.

Môi trường phân lập vi sinh vật ưa kiềm: AM-1, AM-2 [3] và các môi trường phân loại xạ khuẩn theo Chương trình Xạ khuẩn quốc tế (ISP) [3, 6, 7].

Phân lập vi sinh vật ưa kiềm:

Cân 10 g các mẫu đất, bùn hoạt tính cho vào 100 ml nước vô trùng và lắc trên máy lắc

30 phút, sau đó tiến hành pha loãng ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-4} bằng nước cất vô trùng. Dùng pipet vô trùng hút 0,1 ml dung dịch pha loãng ở mỗi nồng độ nhỏ vào đĩa thạch. Nuôi 48 ÷ 72 giờ trong tủ ấm 45°C. Tách các khuẩn lạc sang ống nghiệm môi trường thạch nghiêng và nuôi tiếp 120 giờ. Trong tủ ấm 45°C.

Xác định hoạt độ proteaza (HdP) theo phương pháp Babakina [3]

Dịch enzim sau khi đã loại bỏ sinh khối tế bào, pha loãng với nồng độ 10% enzim. Điều chỉnh pH ở các giá trị 7, 8, 9, 10 và 11 sau đó cũng tiến hành xác định hoạt độ proteaza ở mỗi giá trị pH. So sánh xem ở giá trị pH bao nhiêu thì proteaza có hoạt độ cao nhất.

Dịch chiết proteaza được xử lý ở các thang nhiệt độ khác nhau trong những khoảng thời gian nhất định: 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 65°C, 75°C trong khoảng thời gian 1, 2, 3, 4, 5 giờ. Sau đó xác định hoạt độ ở mỗi thời điểm và nhiệt độ khác nhau.

Đặc điểm sinh học và phân loại xạ khuẩn theo Shirling và Gottlieb [2, 6, 7, 8]

Xác định nhiệt độ tối ưu [1]: xạ khuẩn nuôi cấy trên môi trường thạch nghiêng ISP₃ và ISP₄ và đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ 28, 12, 40, 45, 55, 65, 75°C. Khả năng sinh trưởng được xác định sau 7 và 10 ngày nuôi.

Khả năng chịu muối (NaCl) (%) [1]: Môi trường ISP₁ được bổ sung thêm NaCl với các nồng độ: 1, 3, 5, 7, 10 %. Cấy xạ khuẩn trên

môi trường thạch nghiêng nuôi ở 45°C sau 7 ÷ 10 ngày lấy ra quan sát sự sinh trưởng.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn ưa kiềm:

Tiến hành phân lập các chủng vi sinh vật ưa kiềm trên môi trường AM-1 và AM-2 có pH 10 theo [3]. Từ 103 mẫu đất, nước, bùn hoạt tính và rác thải lấy ở những vùng có pH kiềm đã phân lập và thuần khiết được 285 chủng vi

khuẩn và 113 chủng xạ khuẩn.

Hoạt tính xenlulaza của các chủng phân lập được xác định theo phương pháp khuếch tán trên môi trường có bổ sung CMC và bột giấy, hiện màu bằng dung dịch Lugol. Hoạt tính amylaza - trên môi trường bổ sung tinh bột tan, hiện màu bằng dung dịch Lugol. Hoạt tính proteaza được xác định theo phương pháp khuếch tán trên môi trường sữa không mỡ.

Kết quả nghiên cứu hoạt tính enzym của các chủng đã phân lập được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Tỷ lệ các chủng phân lập trên môi trường pH kiềm có hoạt tính enzym

Chủng	Hoạt tính enzym					
	Xenlulaza		Proteaza		Amylaza	
	Số chủng	%	Số chủng	%	Số chủng	%
Vi khuẩn (288 chủng)	52	20	65	28	74	29,2
Xạ khuẩn (113 chủng)	38	33	55	48,7	32	28,3

Kết quả ở bảng 1 cho thấy nấm mốc không có khả năng phát triển trên môi trường kiềm (pH = 10), số lượng các chủng vi khuẩn có khả năng phát triển cao hơn xạ khuẩn, nhưng tỷ lệ các chủng xạ khuẩn có hoạt tính enzym phân giải tinh bột, CMC-Na và casein sữa lại cao hơn. Trong số 113 chủng xạ khuẩn phân lập được có tới 55 chủng (chiếm 48,7%) có hoạt tính proteaza. Trong số đó, chủng xạ khuẩn CD 2-1 không những hoạt tính xenlulaza mạnh đã nghiên cứu điều kiện để sản xuất enzym này [2] mà chủng này còn có hoạt tính proteaza mạnh (21,49 đơn vị / ml môi trường lên men).

2. Đặc điểm phân loại của chủng xạ khuẩn ưa kiềm CD 2-1:

2.1. Đặc điểm nuôi cấy (bảng 2):

Bảng 2

Đặc điểm nuôi cấy của chủng CD 2-1

Môi trường	Khả năng phát triển	Màu sắc KTKS	Màu sắc KTCC	Sắc tố hòa tan
Gauze 1	++	Vàng nhạt (1ba)	Vàng sáng (2fb)	-
Gauze 2	+	Vàng nhạt (1ba)	Vàng sáng (2fb)	-
ISP 4	+	Vàng nhạt (1ba)	Vàng sáng (1ba)	-
MT 79	+++	Vàng nhạt (1ba)	Vàng sáng (2fb)	-
ISP 6	+++	Vàng nhạt (1ba)	Vàng sáng (1/2fb)	-

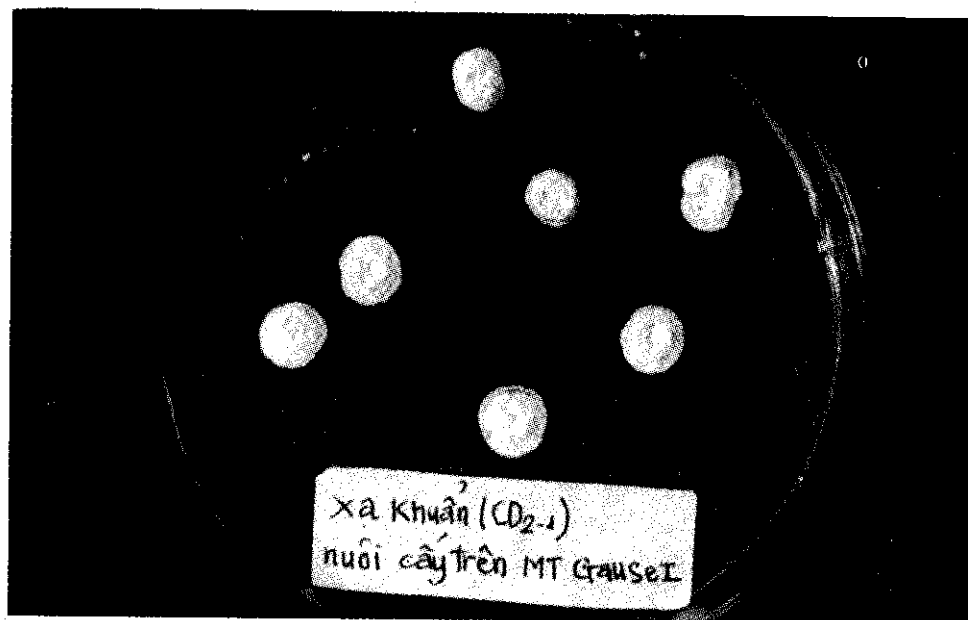
Ghi chú: +: phát triển, ++: phát triển trung bình, +++: phát triển mạnh, -: không có

Kết quả ở bảng 2 cho thấy chủng CD 2-1 phát triển yếu trên các môi trường Gauze 1, Gauze 2 và ISP 4. Tuy vậy trên môi trường 79 và ISP 6 phát triển tốt hơn. Khuẩn lạc chủng CD 2-1

trên môi trường pH kiềm (AM-1) và ở 45°C phát triển tốt. Hầu như trên tất cả các môi trường thử nghiệm khuẩn ty khí sinh của chủng này đều có màu vàng nhạt (1 ba) và khuẩn ty cơ chất có màu vàng sáng. Theo bảng phân loại màu xạ khuẩn thì xếp chủng này vào nhóm Vàng (Y) và không có sắc tố hòa tan.

2.2. Đặc điểm hình thái của chủng CD 2-1:

Kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái được trình bày trên bảng 3 cho thấy thành tế bào của chủng CD 2-1 thuộc nhóm I, dạng LL - DAP, do vậy chủng này thuộc chi *Streptomyces*. Cuống sinh bào tử có hình lược sóng (hình 2) và bề mặt bào tử nhẵn (hình 3). Chủng CD 2-1 không hình thành melanin.



Hình 1. Khuẩn lạc chủng CD 2-1 được nuôi trên môi trường Gause 1 ở 45°C

Bảng 3

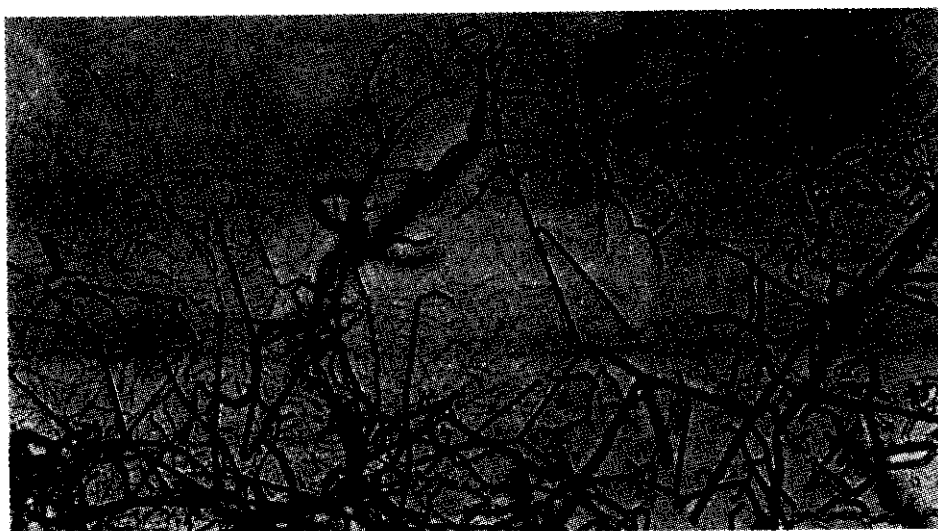
Đặc điểm hình thái của chủng CD 2-1

Đặc điểm	Chủng CD 2-1
Typ thành tế bào	Nhóm I
Dạng axit diaminopimetic	LL-DAP
Cấu tạo cuống sinh bào tử	Thẳng, lược sóng (RI ⁺)
Cấu trúc bề mặt bào tử	Nhẵn (Sm)
Số lượng bào tử trên một chuỗi	> 50
Khả năng sinh melanin	-

Kết quả trình bày ở bảng 4 cho thấy chủng CD 2-1 có dải nhiệt độ và pH cho sinh trưởng khá rộng. Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 40 - 45°C, còn pH 8 - 10. Điều đó chứng tỏ chủng này là vịnh sinh vật ưa nhiệt và ưa kiềm. Chủng xạ khuẩn CD 2-1 có khả năng phân giải tinh bột, protein và xenlulo mạnh và không có khả năng sử dụng các loại đường dùng trong phân loại: I-inositol, D-mannitol, rhamnoza và raffinosa.



Hình 2. Cấu tạo cuống sinh bào tử của chủng CD 2-1 ($\times 400$)



Hình 3. Cấu trúc bề mặt bào tử của chủng CD 2-1 ($\times 19.500$)

2.3. Đặc điểm sinh lý - sinh hóa:

Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng CD 2-1 được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4

Đặc điểm sinh lý - sinh hóa của chủng CD 2-1

SIT	Đặc điểm	Chủng CD 2-1
1	Thủy phân tinh bột	++
2	Đông kết sữa loại mỡ	+++
3	Pepton hóa sữa	+++
4	Phân giải xenlulo	+++

(Tiếp theo bảng 4)

STT	Đặc điểm	Chủng CD 2-1
5	pH cho sinh trưởng	7 - 12
6	pH sinh trưởng tối ưu	8 - 10
7	Nhiệt độ sinh trưởng, °C	28 - 65
8	Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu, °C	40 - 45
9	Khả năng sử dụng đường:	
	MI ISP 9 (ĐC âm)	-
	Glucosa (ĐC dương)	+
	L-arabinoza	±
	Saccaroza	±
	D-xyloza	+
	I-inositol	-
	D-mannitol	-
	D-fructoza	++
	Rhamnoza	-
	Raffinoza	-
	Galactoza	±

Ghi chú: +++: phân giải mạnh, ++: phân giải hoặc phát triển trung bình, ±: không rõ ràng, -: không phát triển

3. Kết quả phân loại:

Đối chiếu các đặc điểm phân loại của chủng nghiên cứu theo các khóa định tên loài xạ khuẩn của Nomomura, 1976 và so sánh với khóa phân loại của Gauze, 1983 và Bergey, 1989, chúng tôi cho rằng: Chủng CD 2-1 thuộc chi *Streptomyces* và có các đặc điểm phân loại giống loài *Streptomyces albidus* (Duché) Waksman, 1953. Kết quả so sánh đặc điểm phân loại của chủng xạ khuẩn CD 2-1 với chủng *S. albidus* ISP 5320 = CBS 100.34 [5, 6, 7]. So sánh đặc điểm phân loại của chủng CD 2-1 với chủng chuẩn ISP 5320 được trình bày ở bảng 5.

Theo hệ thống phân loại vi sinh vật của Bergey [1], để giám sát số lượng lớn các loài người ta đã sát nhập loài *S. albidus* (Duché) Waksman, 1953 vào loài *S. albidoflavus* (Rosi-Doria) Waksman và Henrici, 1848B (*Albidus* - màu trắng; *flavus* - màu vàng) với chủng chuẩn: CBS 416.34. Cống sinh bào tử của loài này có dạng lượn sóng hoặc móc (RI⁺ hoặc RA); bề

mặt bào tử nhân (Sm); khuẩn ty khí sinh màu trắng đến vàng, khuẩn ty cơ chất vàng đến vàng nâu, không có sắc tố hòa tan hoặc vàng nâu; rất hữu sinh melanin và không sử dụng đường raffinosa [28].

III. KẾT LUẬN

1. Đã phân lập và tuyển chọn được 55 chủng xạ khuẩn có hoạt tính proteaza, trong đó chủng ký hiệu CD 2-1 có hoạt tính tốt nhất (21,84 IldP/ml).

2. Chủng CD 2-1 có một số đặc điểm sau: khả năng muối tới 7%, phân giải xenluloza và pepton hóa sữa tốt, thủy phân tinh bột ở mức bình thường. Nhiệt độ sinh trưởng là 28-65°C. Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 40-45°C. Như vậy chủng này có thể là chủng chịu kiềm và chịu nhiệt.

3. Dựa vào các đặc điểm hình thái, tính chất nuôi cấy, đặc điểm sinh lý, sinh hóa, chủng CD2-1 được xác định giống loài *Streptomyces albidus* (Duché) Waksman, 1953.

So sánh đặc điểm phân loại của chủng CD 2-1 với
chủng ISP 5320 của loài *Streptomyces albidus*

Các đặc điểm	Chủng CD 2-1	Chủng ISP 5320
Typ thành tế bào	Nhóm I	Nhóm I
Cường sinh bào tử	RF	RF
Dạng bào tử	Sm	Sm
Số bào tử/chuỗi	> 50	> 50
Sinh melanin	-	-
Màu KTKS	Vàng nhạt (1ba)	Vàng - trắng vàng (ba)
Màu KTCC	Vàng sáng (2fb)	Vàng đến vàng thâm (fb)
Sắc tố hòa tan	-	-
Khả năng sử dụng đường:		
L-arabinoza	±	±
Saccaroza	±	±
D-xyloza	+	+
I-inositol	-	-
D-mannitol	-	+
D-fructoza	++	+
Rhamnoza	-	±
Raffinoza	-	-
Galactoza	±	±

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 1989: Vol. 4, William Wilkins.

2. **Gause G. et al.**, 1983: *Opredelitel Actinomixetov*. Nauka, Moskova.

3. **Horikoshi K. and T. Akiba**, 1982: *Alkaliphilic microorganisms. A new microbial world*. Japan Scientific Society Press, Tokyo, Springer-Verlag, New York.

4. **Lê Gia Hy, Phạm Kim Dung, Tăng Thị Chính**, 1999: *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*,

tập XXXVII, số 2.

5. **Nonomura H. J.**, 1974: *Ferment. Technol.*, Vol. 52, No. 2: 78-92.

6. **Shirling E. B. and Gottlieb D.**, 1996: *Intern. J. Syst. Bacteriol.* Vol. 16, No. 3: 313-340.

7. **Shirling E. B. and Gottlieb D.**, 1996: *Intern. J. Syst. Bacteriol.* Vol. 19, No. 2: 62-198.

8. **Shirling E. B. and Gottlieb D.**, 1996: *Intern. J. Syst. Bacteriol.* Vol. 19, No. 3: 391-512.

ALKALPHILIC MICROBIAL STRAINS ISOLATED IN VIETNAM AND TAXONOMIC CHARACTERISTICS OF THE ALKALPHILIC *STREPTOMYCES* STRAIN CD 2-1 PRODUCING THE ALKALINE ENZYME

LE GIA HY et al.

SUMMARY

The *Streptomyces* strain CD 2-1 was screened from alkaliphilic microbial strains, isolated from samples of waste, activated sludge of hot spring and soils in Vietnam. This strain is obligate alkalyphilic, thermophilic and produces alkaline enzyme with maximal activity at pH 10.0. The cultural, morphological and biochemical properties of this *Streptomyces* strain were studied. The taxonomic characteristics of this strain CD 2-1 are similar to the ones of the species *Streptomyces albidus* (Duché) Waksman, 1953, ISP 5320 = CBS 100.34 (synonym: *S. albidoflavus* (Rosi-Doria) Waksman and Henrici, 1848B by Bergey's Manual.

Ngày nhận bài: 20-8-1999

(Tiếp theo trang 28)

GENETIC VARIABILITY OF GRACILARIA SPECIES (RED ALGAE) SAMPLED FROM TRUONGSA ARCHIPELAGO AREA VIETNAM

HOANG THI MINH HIEN et al.

SUMMARY

The genetic variability of 5 *Gracilaria* species that were sampled from Truongsa archipelago area (Vietnam) was analysed by Polymerase Chain Reaction (PCR) using random amplified polymorphic primers. Three of 9 random primers were specifically tested. Five bands of the total 40 RAPD bands were observed for all 5 *Gracilaria* species. These 5 bands could be the specific markers of them. Based on similarity coefficient, the relationships between these 5 species were determined and consistent with the known lineage of them. The obtained results have shown the sensibility, the precision and rapidity of the RAPD-PCR technique in determining the relationships between the species within a genus and in developing fingerprints for the individual samples within a species.

Ngày nhận bài: 26-8-1999

TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT PHÂN GIẢI XENLULO PHÂN LẬP TỪ VỎ CÀ PHÊ, ĐẤT TRỒNG MÍA Ở TÂY NGUYÊN

NGUYỄN THỊ KIM CÚC, PHẠM VIỆT CUỒNG,
Viện Công nghệ sinh học

Hướng nghiên cứu sử dụng vi sinh vật phân hủy phế thải rắn đã được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm từ lâu, đặc biệt là các phế thải nông lâm nghiệp. Những nghiên cứu cơ bản trong phòng thí nghiệm về các chủng vi khuẩn và nấm có khả năng phân giải lignoxenlulo đã được tiến hành cả về sinh hóa và di truyền học phân tử. Mặc dù vậy, những nghiên cứu ứng dụng vào thực tiễn cho đến nay vẫn còn nhiều hạn chế [8 - 10].

Chúng tôi đã tiến hành phân lập, tuyển chọn vi sinh vật có khả năng phân hủy xenlulo từ các nguồn khác nhau, nhằm tạo ra một tổ hợp vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng vào công nghệ xử lý phụ phế phẩm của các ngành công nghiệp có xenlulo.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Vi sinh vật được phân lập và tuyển chọn từ các mẫu đất, bùn mía và vỏ cà phê với cơ chất là giấy lọc hoặc CMC.

- Môi trường phân lập và nuôi cấy vi sinh vật:

+ Đối với vi khuẩn: sử dụng môi trường Công ô đỏ, Imsheneski.

+ Xạ khuẩn theo Gause và môi trường khoai tây.

+ Nấm mốc theo Czapek-Dox.

- Định loại vi khuẩn theo Bergey (1974, 1990) và 20 phép thử sinh hóa của APINE.

- Phân loại xạ khuẩn theo phương pháp hình thái Nonomura (1974) và với sự giúp đỡ của PGS. Phan Văn Ty, Trung tâm vi sinh Trường Đại học Tổng hợp.

- Phân loại nấm mốc theo phương pháp hình thái của Saccardo [7].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân lập vi sinh vật phân giải xenluloza:

Từ các nguồn khác nhau chúng tôi đã tuyển chọn được 10 chủng vi khuẩn ưa khí (MSM11, MSM12, MSM21, MSM22, MSM31, MSM32, MSM51, MSV11, MSV21, LCV42), 4 chủng nấm (ĐM, ĐM₃, BM₁, BM₂) và 3 chủng xạ khuẩn (X₁, X₃, X₆) có hoạt tính CMCaza tương đối cao.

Sáu chủng vi khuẩn tuyển chọn được thuộc Gram(-), riêng 3 chủng MSV11, MSV21 và LCV42 là Gram(+), hình que ngắn hoặc dài, tế bào đứng riêng rẽ hay thành từng cặp, catalaza dương tính. Một số chủng có sắc tố vàng da cam và tất cả các chủng đều không sinh bào tử. Trên môi trường nước thịt pepton, dưới đèn UV ta thấy sắc tố vàng chanh tan vào môi trường xung quanh khuẩn lạc. Một số tính chất của các chủng vi khuẩn được trình bày trên bảng 1. Dựa trên môi trường phân lập đặc hiệu và một số tính chất đã được nghiên cứu, cho thấy các chủng MSM11, MSM12, MSM21, MSM22, MSM31, MSM32, MSM51 có những đặc điểm tương ứng với chủng *Sporocytophaga myxococcoides*. Các chủng MSV11, MSV21, LCV42 có những đặc tính tương ứng với giống *Cellulomonas*.

Các chủng nấm phát triển tốt trên môi trường Czapek-Dox. Sau 3 ngày khuẩn lạc của chúng có màu xanh sẫm. Khuẩn ty không màu, bào tử trần có màu đen, giá sinh bào tử có phần

cuối phồng lên tạo thành một lớp thể bình và từ lớp thể bình bào tử trần có hình chuỗi tẽ rộng. Dựa vào kết quả nghiên cứu hình thái và kích

thước khuẩn lạc, bào tử trần, giá bào tử trần đã xác định được các chủng nấm này thuộc loài nấm túi *Aspergillus*.

Một số tính chất của các chủng vi khuẩn

Bảng 1

Chủng Tính chất	MSM11	MSM12	MSM21	MSM22	MSM31	MSM32	MSM51	MSV11	MSV21	LCV42
Nhuộm Gram	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Oxydaza	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
Catalaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vì kén	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
Thủy phân										
- CMC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Tinh bột	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
NO ₃	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OF-test	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+
Adh	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Urea	-	-	±	±	-	±	+	±	+	+
ESC	+	+	±	±	+	+	±	+	+	+
PNG	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Glu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
MAN	±	±	±	±	±	±	±	-	+	-
NAG	-	-	-	-	-	-	-	+	+	±
MAL	±	±	±	±	±	±	±	+	+	±
GNT	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
CAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADI	+	+	-	-	+	-	-	±	-	-
MLT	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CTT	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
PAC	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: ND: không xác định

Ba chủng xạ khuẩn có khả năng phát triển tốt trên cả 3 loại môi trường Gauze, Czapek-Dox và khoai tây. Cuống sinh bào tử của chúng có dạng xoắn lò xo (chủng X₁) hoặc thẳng (X₅, X₆). Màu sắc khuẩn ti khí sinh xám (X₁) hoặc hồng nhạt (X₅, X₆). Khả năng đồng hóa một số loại đường đã được nghiên cứu cho thấy cả 3 chủng đều không có khả năng sử dụng D-manitol (bảng

2). Dựa trên các đặc điểm hình thái, nuôi cấy và sinh lý sinh hóa có thể sơ bộ xếp 3 chủng xạ khuẩn này vào chi *Streptomyces*.

Bảng 2.

Một số đặc điểm hình thái, nuôi cấy của các chủng xạ khuẩn

Đặc điểm \ Chủng	X ₁	X ₅	X ₆
Hình thái + Đường kính khuẩn lạc + Hình thái cuống sinh bào tử	3 mm Xoắn lò xo	3 mm Thẳng	3,5 mm Thẳng
Đặc điểm nuôi cấy trên môi trường ISP-4 + Màu sắc khuẩn ti khí sinh + Màu sắc khuẩn ti cơ chất + Sắc tố hòa tan - <i>Khả năng sinh trưởng trên môi trường:</i> Gause Khoai tây Czapek-Dox + Nhiệt độ thích hợp + pH thích hợp	Xám - - + + + 30°C 7,0	- - - + + + 30°C 7,0	Hồng nhạt Nâu Nâu + + + 30°C 7,0
Đặc điểm sinh lý-sinh hóa - <i>Khả năng động hóa đường</i> + D-glucosa + L-arabinoza + Saccaroza - I-inozitol + Raffinoza + Xyloza + D-fructoza + Ramnoza + D-manitol + Đối chứng	+ ± + + - ± ± + - -	+ ± + ± + ± ± ± - -	+ ± + + + ± ± + - -

2. Xác định tính đối kháng của các chủng vi sinh vật:

Một số vi sinh vật có thể sinh ra kháng sinh-sản phẩm đặc biệt của hoạt động sống trong quan hệ đối với những nhóm vi sinh vật khác. Các chất kháng sinh làm kìm hãm hoặc ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các nhóm vi sinh vật khác như vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm. Để xác định hoạt tính kháng sinh người ta sử dụng phương pháp khuếch tán chất kháng sinh vào chiều dày của thạch và xem trong vùng chất kháng sinh khuếch tán vi sinh vật sinh trưởng được hay bị ức chế. Chúng tôi sử dụng môi trường Czapek-Dox và phương pháp cấy các vạch thẳng góc để phát hiện tính đối kháng của các chủng nấm và xạ khuẩn với nhau. Phương pháp thổi thạch đã được sử dụng để

ngiên cứu tính đối kháng của các chủng nấm, xạ khuẩn đối với vi khuẩn và ngược lại. Kết quả được trình bày trên bảng 3.

Kết quả nhận được cho thấy đa số các chủng nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn được nghiên cứu không có tính đối kháng với nhau. Riêng chủng nấm ĐM3 ức chế nhẹ sự phát triển của 2 chủng vi khuẩn MSM21 và MSM51. Từ những kết quả này có thể chọn lọc và tạo tổ hợp vi sinh vật thích hợp để ứng dụng trong quy trình xử lý phụ phẩm thải có xenlulo.

Bảng 3

Tính đối kháng của các chủng vi sinh vật

	ĐM	ĐM3	BM1	BM2	X ₁	X ₅	X ₆	MSM31	MSM51	MSV21	LCV42
ĐM		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ĐM3	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-
BM1	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
BM2	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
X ₁	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
X ₅	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
X ₆	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
MSM31	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
MSM51	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
MSV21	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
LCV42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Ghi chú: - : Không có tính đối kháng; +: Có tính đối kháng

3. Xác định hoạt tính xenlulaza của các chủng vi sinh vật:

Hoạt tính xenlulaza của vi khuẩn và xạ khuẩn được xác định bằng phương pháp cấy trực tiếp trên môi trường có CMC trên đĩa petri 3 ngày, sau đó đo đường kính vòng phân giải (D-d) cm. Phương pháp xác định hoạt tính xenlulaza ngoại bào của nấm sợi dựa trên nguyên tắc là xenlulaza sẽ thủy phân CMC có trong thạch tạo ra màu vàng khi có mặt của đỏ Congo. Kết quả được trình bày trên bảng 4.

Bảng 4

Hoạt tính CMCaza của các chủng vi sinh vật

Chủng	Hoạt tính (D-d) cm	Chủng	Hoạt tính (D-d) cm	Chủng	Hoạt tính (D-d) cm
MSM11	1,5	MSV11	1,5	ĐM	2,7
MSM12	1,6	MSV21	1,5	ĐM3	2,9
MSM21	1,6	LCV42	1,4	BM1	2,6
MSM22	1,4	X ₁	1,6	BM2	2,5
MSM31	1,6	X ₅	1,7		
MSM32	1,5	X ₆	1,9		
MSM51	1,7				

4. Ảnh hưởng của thành phần môi trường lên hoạt tính CMCaza của vi khuẩn:

Chúng tôi đã thử nghiệm một số loại môi trường để đánh giá sự phát triển và hoạt tính CMCaza của vi khuẩn đã lựa chọn. Đây là vấn đề cần thiết vì khi sử dụng vi sinh vật phân hủy xenlulo vào thực tiễn sản xuất cần giảm tối đa giá thành mà vẫn đảm bảo chất lượng của sản phẩm. Thành phần cơ bản (CB) của môi trường gồm: phân đạm, lân, kali, NaCl, $MgSO_4$ với những thay đổi sau:

1. CB + CMC + Vi lượng

2. CB + Rỉ đường + Vi lượng

3. CBM + CMC + Pepton + Vi lượng

4. CB + Rỉ đường + Pepton + Vi lượng

5. CB + CMC + Cao men + Vi lượng

6. CB + Rỉ đường + Pepton

7. CB (không có NaCl và $MgSO_4$) + đường + Pepton

8. CB + CMC + Rỉ đường + Vi lượng

Hỗn hợp vi lượng gồm có Fe, Mn, Zn Co.

Kết quả nhận được trên bảng 5.

Bảng

Ảnh hưởng của thành phần môi trường lên hoạt tính CMCaza

MT \ Chủng vi khuẩn	MSM11		MSM31	
	Mật độ (TB/ml)	Hoạt tính (D-d) cm	Mật độ (TB/ml)	Hoạt tính (D-d) cm
1	$2,6 \times 10^4$	1,8	$3,3 \times 10^6$	1,8
1	$1,1 \times 10^8$	1,9	$1,5 \times 10^8$	1,9
3	$5,3 \times 10^8$	1,9	$5,5 \times 10^8$	1,8
4	$1,5 \times 10^9$	1,8	$1,6 \times 10^9$	1,8
5	$1,7 \times 10^6$	1,7	$1,2 \times 10^7$	1,8
6	$3,9 \times 10^8$	1,6	$1,2 \times 10^9$	1,2
7	$2,5 \times 10^7$	1,5	$2,7 \times 10^8$	1,2
8	$5,7 \times 10^7$	2,5	$1,0 \times 10^7$	2,5

Từ bảng 5 chúng tôi thấy pepton và rỉ đường có tác dụng tối đối với sự phát triển vi khuẩn. Kết quả còn cho thấy ảnh hưởng rõ rệt của vi lượng lên hoạt tính CMCaza của vi khuẩn (môi trường đánh số từ 1 đến 5). Điều này cũng phù hợp với kết luận của các nhà khoa học khác cho rằng trong số các nguyên tố vi lượng thì nguyên tố có ảnh hưởng nhiều nhất đến việc tạo thành xenlulaza là Fe, Mn, Zn và Co [1, 2, 5].

Nguồn xenlulo trong môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng đến sự hình thành xenlulaza vì sự tổng hợp xenlulaza mang tính chất cảm ứng [3, 4, 12]. Ở lô thí nghiệm số 8, kết quả cho thấy sự kết hợp giữa nguồn xenlulo, vi lượng và rỉ đường đảm bảo cho sự phát triển tối của vi khuẩn đồng thời kích thích sinh tổng hợp

xenlulaza ở các chủng vi khuẩn nghiên cứu. Kết quả trên bảng 5 còn chỉ ra rằng nếu trong thành phần môi trường không có nguồn xenlulo hoạt tính xenlulaza bị giảm và nếu thay đường bằng pepton thì số lượng vi khuẩn tăng nhưng hoạt tính CMCaza lại không cao bằng khi sử dụng rỉ đường (lô thí nghiệm 2 và 3 với lô thí nghiệm 8).

III. KẾT LUẬN

- Đã tuyển chọn được một số chủng khuẩn có hoạt tính xenlulaza tương đối cao phục vụ cho các nghiên cứu ứng dụng sau này.

- Các chủng vi sinh vật phân lập và tuyển chọn có thể kết hợp để tạo thành tổ hợp vi si

vật có tiềm năng ứng dụng trong quá trình xử lý phế phẩm có xenlulo.

- Sự kết hợp giữa nguồn xenlulo, rỉ đường và một số nguyên tố vi lượng với nồng độ thích hợp sẽ ảnh hưởng tốt lên sự phát triển và hoạt tính xenlulaza của các chủng vi khuẩn lựa chọn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ajay-Sigh, Agrawal A. K., Abidi A. B., Darmwal N. S., Singh A., 1990: FEMS-Microbiology letters, 71(1-2): 221-224.
2. Fierobe H. P., Bagnara Tardif C., Gaudi C. et al., 1993: Eur. J. Biochem, 217(2): 557-565.
3. Kolbe J., Kubicek C. P., 1990: Applied Microbiology and Biotechnology, 34(1): 26-30.
4. Lakshmikanth, Kamal, Mathur S. N., 1990: World Journal of Microbiology and Biotechnology, 6(1): 26-30.
5. Lê Ngọc Tú, La Văn Chúc, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Lâm Dũng, 1982: "Enzyme vi sinh vật", tập 2, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
6. Nonomura H. J., 1974: Ferment. Technol. V52, N2: 78-92.
7. Nguyễn Lâm Dũng, Bùi Xuân Đồng, Lê Đình Lương, 1982: Vi nấm, NXB. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 266 trang.
8. Patel R. N., Thakker G. D., Rao K. K., 1994: J. Biotech. 36(1): 19-23.
9. Sami A. J., Akhter M. W., Amtul-Jamil-Samil, 1990: Biochemical society transactions, 18(4): 649-650.
10. Tratantian S., Fields M. L., 1990: Biological waster, 34(2): 123-131.
11. Uma L., Kalaiselvi R., Subramanian G., 1994: Biotechnol. Lett., 16(3): 303-308.
12. Vyas B. R. M., Bakowski S., Sasek V., Matucha M., 1994: FEMS microbiology ecology, 14(1): 65-70.

SELECTION CELLULOSE DEGRADING MICROORGANISMS ISOLATED FROM COFFEE WASTE AND SUGAR PLANTATION OF TAYNGUYEN AND SOME THEIR PROPERTIES

NGUYEN THI KIM CUC, PHAM VIET CUONG

SUMMARY

From isolated microorganisms that capable degrade cellulose, 17 strains possessing higher CMCase activity were selected. Temporary they can be identify to genus *Sporocytophaga*, *Streptomyces* and *Aspergillus*. The experiments on antibiotic production of microorganisms were carried out. The received results show that most of microorganisms do not possess antagonistic activity to each other. Moreover, cellulolytic activities of isolated bacteria on different culture medium were studied.

An effective media for growth and cellulolytic activity of bacteria was created. It was obvious that microelements such as Fe, Co, Mn have stimulated effect on cellulolytic activity of studied bacteria.

Ngày nhận bài: 6-7-1999

TÍNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁC LOÀI RONG CÂU (GRACILARIA) Ở VÙNG QUẦN ĐẢO TRƯỜNG SA

HOÀNG THỊ MINH HIỀN, ĐẶNG DIỄM HỒNG
Viện Công nghệ sinh học

VÕ THƯƠNG LAN
Trường đại học Khoa học tự nhiên - ĐHQG Hà Nội

Chi rong câu - *Gracilaria* được xác nhận là agarophyte (rong có chứa agar) quan trọng của rong biển trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng. Đây là nhóm rong biển đặc trưng của khu hệ và là nguồn lợi kinh tế đáng kể của vùng biển Việt Nam.

Mười chín loài rong câu ở miền Nam và 13 loài ở miền Bắc Việt Nam được phát hiện và định loại tên khoa học, được nghiên cứu về phân bố, sinh thái, thành phần hóa học cơ bản, đặc tính sinh lý, kỹ thuật nuôi trồng [4, 6, 8] cũng như được phân tích tính đa dạng di truyền, xây dựng cây phân loại bằng các kỹ thuật sinh học phân tử [12].

Khảo sát 5 đảo trên tổng số 100 đảo ở vùng quần đảo Trường Sa của nước ta (Trường Sa Lớn, Nam Yết, Sơn Ca, Song Tử Tây và Thuyền Chài) từ năm 1994 đến năm 1996, Nguyễn Văn Tiến và cs. [7] cũng đã phát hiện và sơ bộ định loại tên khoa học của một số loài rong câu như: *Gracilaria arcuata* Zan (rong câu cong) ở đảo Sơn Ca, *G. salicornia* (C. Ag.) Daws (rong câu ngắn) - đảo Nam Yết, Sơn Ca, và *G. edulis* (Gmel.) Silva (rong câu chùm) - đảo Nam Yết.

Từ trước đến nay, rong biển thường được phân loại theo phương pháp truyền thống (dựa vào các đặc điểm hình thái của từng loài). Nhưng đôi khi phương pháp này chưa đạt tính chính xác do chịu ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh [1, 2, 3, 9, 11]. Các kỹ thuật phân tích ADN ngày càng được áp dụng rộng rãi góp phần xây dựng cây phân loại và phân tích tính đa dạng di truyền giữa các loài cũng như giữa các cá thể trong loài [9, 11, 12].

Trong bài báo này chúng tôi xin thông báo một số kết quả bước đầu nghiên cứu tính đa dạng của một số loài rong câu thu thập được trong chuyến khảo sát các đảo ở vùng quần đảo

Trường Sa vào tháng 5/1999 bằng kỹ thuật RAPD-PCR (kỹ thuật nhân bản ngẫu nhiên ADN).

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

5 loài thuộc chi rong câu *Gracilaria* thu thập được trong chuyến khảo sát các đảo Trường Sa Lớn, Phan Vinh, Thuyền Chài và Tốc Tan (vùng quần đảo Trường Sa) tháng 5/1999 đã được Nguyễn Văn Tiến và cs. sơ bộ định loại tên khoa học (bảng 1).

Bảng 1

Năm loài rong câu thu thập tại vùng quần đảo Trường Sa tháng 5/1999

STT	Tên loài	Địa điểm thu mẫu
1	<i>Gracilaria crassa</i>	Đảo Thuyền Chài
2	<i>G. coronopijolia</i>	Đảo Phan Vinh B
3	<i>G. salicornia</i>	Đảo Phan Vinh
4	<i>G. eucheumoides</i>	Đảo Phan Vinh
5	<i>G. arcuata</i>	Đảo Phan Vinh

Bảo quản rong câu và tách chiết ADN genome từ 5 loài nêu trong bảng 1 theo phương pháp của Trần Hữu Quang và cs., 1999.

Chín mỗi ngẫu nhiên (10-nucleotit) đặc trưng cho tảo (Operon Technologies) được sử dụng trong phản ứng RAPD-PCR, thực hiện trên máy Eppendorf 5330. Tên và trình tự nucleotit của các mồi được nêu trong bảng 2. Mỗi phản ứng PCR (20 µl) chứa 5-200 ng ADN genom, 100 nM mỗi, 100 µM mỗi loại dNTP và 0,5 đơn vị Taq polymerase. Phản ứng được bắt đầu bằng giai đoạn biến tính ADN khuôn ở

95°C - 3 phút, tiếp theo 40 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm các bước thay đổi nhiệt độ như sau: 95°C-30 giây, 40°C - 1 phút, 72°C - 2 phút. Giai đoạn tổng hợp cuối cùng được thực hiện ở 72°C trong 8 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, quan sát dưới tia cực tím và được chụp bằng phim Polaroid 667. Mỗi phản ứng đều được lặp lại ít nhất 3 lần.

Chương trình máy tính NTSYS được sử dụng để phân tích số liệu RAPD-PCR cây phân loại và tính hệ số đồng dạng di truyền giữa các loài rong câu đã nêu.

Bảng 2

Các môi đã sử dụng

Môi	Trật tự nucleotit	Môi	Trật tự nucleotit
OLIGO1	GCACACAAGT	OPL12	GGGCGTACT
OLIGO2	GAACGGGTG	OPA10	CAGGCCCTTC
OPK8	GAACACTGGG	OPA3	AGTCAGCCAC
OPK19	CACAGGCGGA	OPA4	AATCGGGCTG
OPL1	GGCATGACCT		

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách chiết ADN genom từ 5 loài rong câu khác nhau được trình bày trên hình 1. Hình 1 cho thấy ADN không bị biến tính, đảm bảo nồng độ và độ sạch để làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

1. Phân tích sự đa hình ADN bằng kỹ thuật RAPD-PCR:

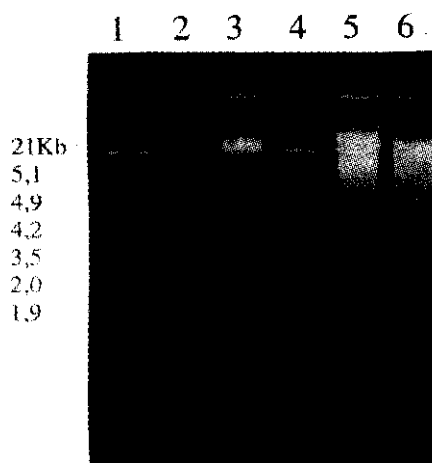
Chín môi ngẫu nhiên đặc trưng cho tảo và thích hợp với kỹ thuật RAPD-PCR được sử dụng để phân tích tính đa dạng di truyền của 5 loài rong câu đã nêu. Cả 9 môi này đều cho phép nhân ngẫu nhiên các đoạn ADN genome. Tuy nhiên, số lượng các băng ADN cũng như điều kiện phản ứng cho từng môi không hoàn toàn giống nhau. Vì vậy, để tiện so sánh, 3 môi OPA4, OPA10 và OPL12 có khả năng nhân ngẫu nhiên các đoạn ADN trong cùng điều kiện phản ứng PCR đã được chọn. Kết quả được trình bày trên hình 2 và bảng 3.

Kết quả trong bảng 3 cho thấy:

- Tổng số có 40 băng rõ nét được nhân ngẫu nhiên với 3 môi. Mỗi môi nhân bản từ 12 băng (OPA10) đến 15 băng (OPL12). Trung bình mỗi môi nhân bản 13 băng.

- Kích thước các băng thay đổi từ 0,2 Kb (OPA4) tới 1,9 Kb (OPL12).

- Có 5 băng chung cho 5 loài rong câu (12,5%). Đó là các băng số 10 (OPA4); số 18,22, 28 (OPL12) và số 36 (OPA10). Các băng này có thể được xem là những marker đặc trưng cho cả 5 loài rong câu.



Hình 1. ADN tách từ 5 loài rong câu
Cột 1 λ-ADN/*EcoRI*-*Hind*III

2. *G. coronopifolia*; 3. *G. salicornia*;
4. *G. eucheumoides*; 5. *G. arcuata*; 6. *G. crassa*

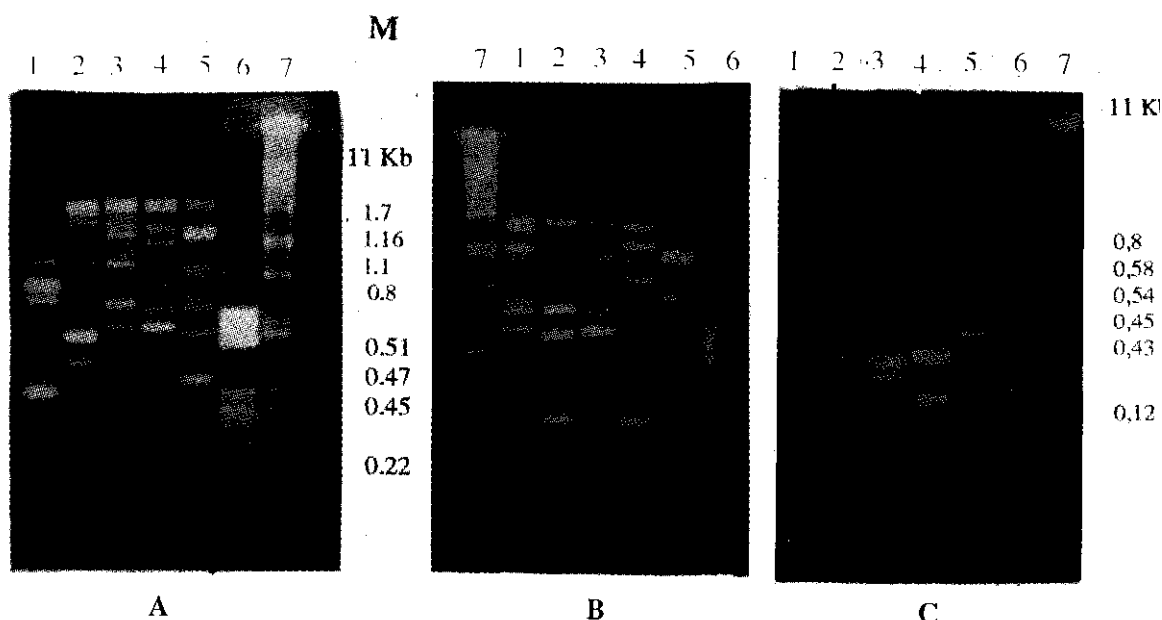
Bảng 3

Các đoạn ADN được nhân trong phản ứng RAPD với mồi OPA4, OPA10 và OPL12

Chiều dài (Kb)	Đoạn được nhân	Số thứ tự các loài rong câu				
		1	2	3	4	5
1,8 (OPA4)	1	-	+	+	+	+
1,7	2	-				
1,6	3					
1,5	4	+	-	+	+	-
1,2	5	-	-	+	-	+
1,1	6	-	+	-	+	-
0,9	7	+	+	+	-	-
0,8	8	-	-	-	+	+
0,7	9	+	+	-	-	+
0,5	10	+	+	+	+	+
0,45	11	-	-	+	+	-
0,4	12	-	+	-	-	+
0,34	13	+	+	-	-	-
0,3	14	-	-	-	-	+
0,2	15	+	-	-	+	+
1,9 (OPA10)	16	-	-	-	-	+
1,8	17	-	-	-	-	+
1,6	18	+	+	+	+	+
1,5	19	-	-	+	-	+
1,3	20	-	+	+	-	-
1,159	21	+	-	-	-	+
1,0	22	+	+	+	+	+
0,9	23	-	-	-	+	+
0,8	24	-	-	-	-	+
0,7	25	+	-	-	-	-
0,65	26	+	+	+	-	+
0,54	27	+	+	+	-	+
0,164	28	+	+	+	+	+
1,7 (OPL12)	29	-	+	+	+	+
1,6	30	+	-	-	-	-
1,5	31	-	-	+	+	+
1,2	32	+	+	-	+	+
1,1	33	+	+	-	+	+
1,0	34	-	-	+	+	+
0,9	35	-	+	-	-	+
0,7	36	+	+	+	+	+
0,6	38	-	+	-	+	+
0,5	39	+	-	-	+	+
0,45	40	-	+	-	+	-

Dấu +: đoạn ADN được nhân; dấu -: đoạn ADN không được nhân

1. *G. crassa*; 2. *G. coronopifolia*; 3. *G. salicornia*; 4. *G. cucumoides*; 5. *G. arcuata*



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR của 5 loài rong câu với mỗi OPA4, OPA10 và OPL12 (A, B, C). Cột 1 *G. crassa*; 2. *G. coronopijolia*; 3. *G. salicornia*; 4. *G. eucheumoides*; 5. *G. arcuata*; 6. Marker pBR322/*Hae*III; 7. Marker λ /*Pst*I

- 35 băng còn lại là những polymorphism (87,5%) chứng tỏ 5 loài rong câu được nghiên cứu có sai khác về mặt di truyền.

2. So sánh sự khác nhau của 5 loài rong câu được nghiên cứu:

Dựa trên sự có mặt hoặc không có các đoạn ADN được nhân ngẫu nhiên với 3 mỗi OPA4, OPA10 và OPA12, mối liên quan giữa 5 loài rong câu ở mức độ phân tử đã được thiết lập. Các số liệu được phân tích theo chương trình NTSYSpc version 2.0 (Applied Biostatistics

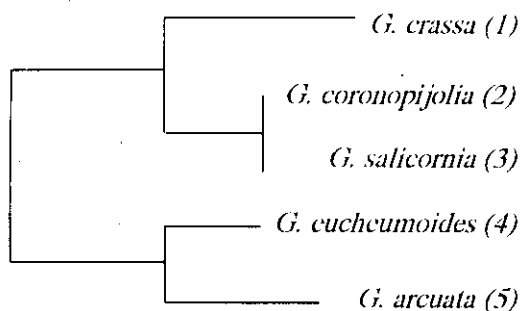
Inc., USA, 1998). Kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 3.

Hình 3 cho thấy sự khác nhau ở mức độ phân tử được biểu hiện bằng hệ số đồng dạng di truyền giữa các loài với nhau. Các loài giống nhau được xếp trong cùng 1 nhóm và có sự liên kết giữa các nhóm. Hệ số đồng dạng di truyền lớn nhất (0,6250000) giữa rong câu số 3 với số 2, tiếp theo (0,5750000) giữa số 2 với số 1 và số 4 với số 2, thấp nhất giữa rong câu số 5 với rong câu số 1 (0,4500000).

Bảng 4

Hệ số đồng dạng di truyền giữa 5 loài rong câu dựa vào kết quả RAPD-PCR với 3 mỗi OPA 4, OPA10 và OPL12

	1	2	3	4	5
1	1,0000000				
2	0,5750000	1,0000000			
3	0,5500000	0,6250000	1,0000000		
4	0,5000000	0,5750000	0,5500000	1,0000000	
5	0,4500000	0,5250000	0,5000000	0,5500000	1,0000000



Hệ số đồng dạng

Hình 5. Cây phân loại của 5 loài rong câu xây dựng theo tính đa dạng di truyền ở mức độ ADN

Dựa vào cây phân loại nêu trên, trong số 5 loài rong câu được nghiên cứu thì rong câu số 2 và số 3 có hệ số đồng dạng di truyền cao nhất. Hệ số sai khác giữa 5 loài rong câu nghiên cứu thay đổi từ giá trị 0,37 (1-0,6) đến 0,455 (1-0,545). Như vậy, sự khác nhau giữa 5 loài rong câu thu được tại vùng quần đảo Trường Sa ở mức độ phân tử ADN đã phát hiện được nhờ kỹ thuật RAPD-PCR.

III. KẾT LUẬN

- Trong tổng số 40 băng được nhân bản với 3 mỗi, có 35 băng đa hình. Điều đó chứng tỏ các loài rong câu được nghiên cứu tương đối xa nhau về mặt di truyền.

- Xác định được 5 marker có tính đặc trưng cho 5 loài rong câu nghiên cứu.

- Kỹ thuật RAPD-PCR góp phần phân loại chính xác rong câu nói riêng và rong tảo biển nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chai-Ling Ho, Siew-Moi and Tikkingang, 1995: J. of Applied Phycology 7: 33-41.

2. Edvarsen B. and Linda Medlin, 1998: Phycologia. Volume 37 (4): 275-283.

3. Horiguchi T. and Yoshida, 1998: Phycologia. Volume 37: 237-245.

4. Huỳnh Quang Năng và cs., 1999: Báo cáo tổng kết đề tài "Điều tra, đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đối với hiệu quả nuôi trồng, khai thác và giá trị kinh tế của rong biển phía Nam Việt Nam", 1997-1998.

5. Nguyen Huu Dinh, 1992: Vietnam species *Gracilaria* and *Gracilariopsis*. In Tax. Econ. Seaweeds 3: 207-210.

6. Nguyễn Hữu Dinh và cs., 1993: Rong biển Việt Nam phân phía Bắc. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 336.

7. Nguyễn Văn Tiến và cs., 1997: Rong biển ở vùng quần đảo Trường Sa - báo cáo tổng kết đề tài "Điều tra tổng hợp nguồn lợi sinh vật biển quần đảo Trường Sa, 36 trang.

8. Phạm Hoàng Hộ, 1969: Rong biển Việt Nam - Trung tâm học liệu xuất bản Sài Gòn 1969, 559 trang.

9. Stiller J. W. and J. Robert Waaland, 1993: J. Phycol. 29: 506-517.

10. Trần Hữu Quang, Trần Kiên Cường, Vũ Văn Dũng, Võ Thương Lan, Đặng Diễm Hồng, 1999: Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học (dang in).

11. Yoshimura S., Yoshimura A. and Iwata N., 1992: J. Breed, 42: 669-674.

12. Võ Thương Lan, Hoàng Minh Hiền, Trần Hữu Quang, Huỳnh Quang Năng, Đặng Diễm Hồng, 1999: Nghiên cứu tính đa dạng của một số loài rong câu ở vùng biển miền Nam Việt Nam bằng kỹ thuật RAPD-PCR. Hội nghị toàn quốc về Công nghệ sinh học. Hà Nội (đã gửi).

(Xem tiếp trang 17)

XÂY DỰNG NGÂN HÀNG GIEN ĐỂ PHÂN LẬP CÁC PROMOTOR CỦA NẤM MEN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

NGUYỄN THỊ THANH HUYỀN, NGUYỄN THANH THÙY,
TRƯƠNG NAM HẢI

Viện Công nghệ sinh học

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* không có những vai trò quan trọng trong quá trình sản xuất rượu bia, mà nó còn là cơ thể biểu hiện được sử dụng rộng rãi để sản xuất các protein ngoại lai của các gen tái tổ hợp. Tuy vậy, để có thể biểu hiện tốt các gen ngoại lai cần phải được các promotor thực sự thích hợp mở đầu quá trình phiên mã. Trong những năm gần đây cùng với sự phát triển của kỹ thuật gen, việc phân lập và sử dụng các promotor mới trong nấm men đã được nghiên cứu khá nhiều, đặc biệt là việc phân lập và sử dụng các promotor mới dựa trên cơ sở tạo lập các ngân hàng gen có nguồn gốc từ genom. Trên cơ sở đã thiết kế thành công vector pHU2 [1], có mang phần gen cấu trúc glucoamylaza và terminator CDC11 của gen ancol dehydrogenaza, nhưng khuyết promotor, chúng tôi tiến hành tạo lập ngân hàng gen từ ADN genom của chủng phòng thí nghiệm *S. cerevisiae* KY117. Mục đích của chúng tôi là đưa được các đoạn ADN có độ dài từ 0,5 đến 2 kb vào trước đoạn gen cấu trúc glucoamylaza. Các plasmid tái tổ hợp mới này sẽ là nguồn nguyên liệu để tìm các promotor mới của nấm men.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Chủng *E. coli* DH5- α mang kiểu gen [supE44lacU169(f80 lacZM15) hsdR17recA1 end A1gyrA96 thi-1relA1].
- Plasmid pHU2 (7,55 kb) [1].
- Môi trường LB để nuôi cấy *E. coli* và môi trường YPD để nuôi cấy nấm men được sử dụng như mô tả trong [2].
- Biến nạp thể tế bào *E. coli*: Tế bào *E. coli* được biến nạp theo phương pháp xung điện của

William J. Dower và cộng sự [3].

- Tách chiết ADN genom nấm men: ADN genom của chủng *S. cerevisiae* KY117 được tách chiết theo phương pháp của D. Rickwood và B. D. Hames [4].

- Phương pháp phân tích ADN bằng enzym giới hạn và nối ghép gen được thực hiện theo mô tả của Sambrook và cộng sự [5].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tùy thuộc vào mục đích sử dụng, ngân hàng gen có thể được tạo ra trên cơ sở ADN của genom hoặc ADN được phiên mã ngược từ ARN thông tin (ngân hàng gen ADN-bổ trợ - cDNA library) nhờ enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase). Ngân hàng gen trên cơ sở genom là hỗn hợp của các phân tử ADN plasmid tái tổ hợp chứa ADN vector và các đoạn ADN ngoại lai mang thông tin cho một hoặc vài gen bao gồm phần gen cấu trúc và các đoạn điều khiển quá trình phiên mã [2].

Ngân hàng gen genom thường được sử dụng để phân lập các đoạn gen điều khiển trên cơ sở các vector chứa các gen chỉ thị khuyết promotor. Trong trường hợp này các gen chỉ thị thường được sử dụng là gen lac Z, gen lucifera hay các gen kháng sinh. Sản phẩm biểu hiện của các gen này dễ dàng được phát hiện khi chúng được điều khiển bởi promotor nào đó. Tuy nhiên các hóa chất để phát hiện sự hoạt động của các enzym này thường đắt tiền.

Trong bài báo trước đây chúng tôi đã trình bày kết quả phân lập gen glucoamylaza của *Saccharomycopsis fibuligera* [6] với mục đích biểu hiện chúng trong *S. cerevisiae*. Để tìm các promotor thích hợp cho việc biểu hiện trong *S.*

cerevisiae, chúng tôi sử dụng gen *glucoamylaza* như một gen chỉ thị trong công trình của mình với các lý do sau: (i) Hoạt tính của *glucoamylaza* dễ dàng được phát hiện trong môi trường chọn lọc có tinh bột; (ii) Có thể tạo môi trường chọn lọc mà nguồn cacbon duy nhất là tinh bột để chọn các thể biến nạp; (iii) Không có một hệ biểu hiện vạn năng cho tất cả các gen, do đó một khi có một promotor thích hợp nào đó đối với gen *glucoamylaza* được phân lập thì nó có thể được sử dụng trực tiếp cho các mục đích thực tiễn sau này.

Trên cơ sở vector pIU2 đã được thiết kế mang điểm cắt duy nhất *Bam*HI tại điểm đầu phân gen cấu trúc của *glucoamylaza*, chúng tôi đưa các phân đoạn ADN cắt từ genom của *S. cerevisiae* bằng *Sau*3A vào pIU2 qua điểm cắt *Bam*II để tạo ngân hàng gen.

1. Tách chiết ADN genom của chủng *S. cerevisiae* KY117:

S. cerevisiae KY117 là chủng nấm men phòng thí nghiệm. Đây là chủng đơn bội mang đột biến khuyết dưỡng đối với axit amin uraxin và histidin. Tiến hành tách ADN genom từ chủng này với mục đích tạo nguồn nguyên liệu để phân lập các promotor.

Theo các phương pháp được mô tả trong những tài liệu hiện nay [7], việc làm tế bào trần ở nấm men thường phải sử dụng zymolyaza. Nhưng trong điều kiện ở Việt Nam, enzym này phải nhập ngoại với giá thành cao nên thay thế enzym này bằng dịch dạ dày ốc sên. Dịch dạ dày ốc sên chứa khoảng 30 enzym các loại, trong đó có glucanaza, chitinaza, manaza là các enzym làm trần tế bào nấm men. Dịch ốc sên được ly tâm ở 10000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ phần cặn, sau đó được lọc khuẩn và giữ ở -20°C trong 15% glycerin.

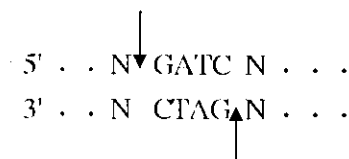
Chúng tôi đã tiến hành tách chiết ADN genom từ 100 ml dịch nuôi cấy chủng *S. cerevisiae* KY117. Kết quả điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy ADN genom thu được có chất lượng tốt, không bị đứt gãy và không lẫn ARN (hình 1). Điều này cho thấy các enzym trong dịch ốc sên đã sử dụng thay thế cho zymolyaza hoạt động rất hiệu quả.

2. Cắt thăm dò ADN genom của chủng KY117 bằng enzym giới hạn *Sau*3A:

Để đưa các đoạn ADN khác nhau vào vị trí promotor trên vector pIU2, genom của nấm men được cắt ra thành từng đoạn nhỏ. Thường thì promotor của nấm men có độ dài trong khoảng 200-700 bp [4], nên các đoạn ADN mà chúng tôi chọn cần có độ dài từ 0,5 kb đến 2 kb là có thể nhận được các promotor hoàn chỉnh.

Chọn *Sau*3A để cắt ADN genom vì:

Kiểu cắt của *Sau*3A:



và kiểu cắt *Bam*II:



Như vậy về nguyên tắc nếu ta cắt vector pIU2 bằng *Bam*II và cắt ADN genom của chủng *S. cerevisiae* KY117 bằng *Sau*3A thì sau đó ta hoàn toàn có thể nối các đoạn ADN từ genom của chủng KY117 vào vector pIU2 qua điểm cắt *Bam*II. Điều đáng lưu ý là khi gắn các đoạn ADN được xử lý bằng *Sau*3A vào vector qua điểm gắn *Bam*II thì tại điểm nối của chúng, điểm cắt *Bam*II có thể bị thủ tiêu, do đó nhiều khi không thể dùng *Bam*II để cắt lại đoạn đã phân lập ra khỏi vector.

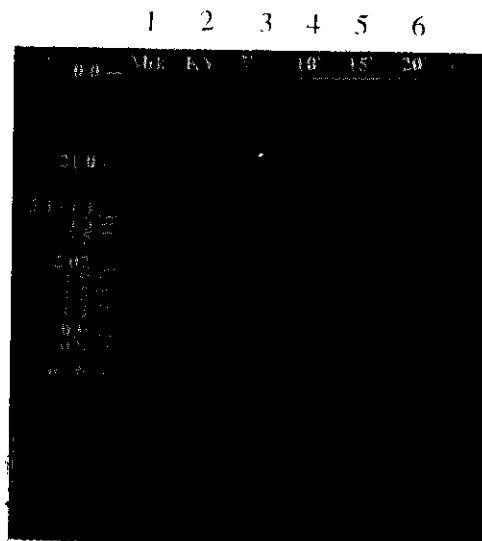
AND genom của chủng *S. cerevisiae* KY117 được cắt bằng *Sau*3A với nồng độ 1 đơn vị enzym/ 1 µg ADN. Kết quả cho thấy *Sau*3A cắt ADN của KY117 thành rất nhiều đoạn nhỏ. Tuy vậy trên phòng của các đoạn ADN có độ dài khác nhau có thể phát hiện thấy các băng có độ đậm hơn. Điều đó chứng tỏ trong genom của *S. cerevisiae* có nhiều đoạn lặp - một hiện tượng cũng thường gặp đối với genom của nhiều loại eukaryot khác. Trong trường hợp này, để phân lập được các đoạn ADN có khả năng đóng vai trò promotor, chúng tôi cần thu nhận được các đoạn ADN có độ dài từ 0,5 đến 2 kb. Chúng tôi tiến hành cắt genom của chủng KY117, thăm dò khả năng hoạt động của enzym theo thời gian ở 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút để xác định thời gian tối ưu. Kết quả sau khi chạy điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy tại thời điểm 15

phút, với nồng độ enzym là 1 đơn vị / 1 μ g ADN, ADN genom bị cắt thành những đoạn nhỏ có kích thước từ 0,5 đến 2 kb trở xuống đã hình thành nhiều hơn (hình 1) và với điều kiện cắt này là thích hợp nhất với mục đích thí nghiệm.

Sau đó ADN genom được cắt không triệt để bằng *Sau3A* với lượng lớn (20 μ g) trong 15 phút rồi chạy điện di trên gel agarosa 0,8%. Sau khi xác định chính xác các đoạn ADN từ 0,5 đến 2 kb (dựa vào ADN chuẩn), dùng dao vô trùng cắt đoạn gel có băng quan tâm cho vào túi thẩm tích, bổ sung đệm TAE và chạy điện di cho các phân tử ADN giải phóng khỏi gel. Kết quả trên hình 2 cho thấy đã thu được các đoạn ADN có kích thước từ 0,5 đến 2 kb như mong đợi.

3. Xử lý vector pHU2 bằng enzym giới hạn *Bam*HI:

Để phân lập các promotor mới chúng tôi đưa các đoạn ADN của nấm men vào vị trí ngay trước vùng cấu trúc của gen glucosamylaza. Theo cấu trúc vector pHU2 (hình 3), trước vùng cấu trúc của gen glucosamylaza có 3 điểm cắt của enzym giới hạn *Eco*RI, *Sma*I, *Bam*HI. Chỉ có điểm cắt *Bam*HI là phù hợp với việc đưa các đoạn ADN được xử lý bằng *Sau3A* vào vector. Để phản ứng gắn xảy ra hoàn toàn, chúng tôi ủ mẫu ở 37°C trong 12 giờ rồi tiến hành loại các gốc photphat ở đầu 5' để tránh hiện tượng đóng vòng của vector khi thực hiện phản ứng gắn. ADN sau đó được rửa lại và hòa trong nước khử ion vô trùng.



Hình 1. Phân tích ADN genom *S. cerevisiae* KY117 trên gel agarosa 0,8%.

Đường chạy thứ nhất: ADN chuẩn

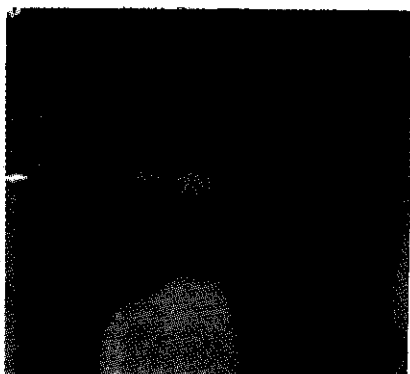
Đường chạy thứ hai: ADN genom chủng nấm men KY117

Đường chạy thứ ba, bốn, năm, sáu:

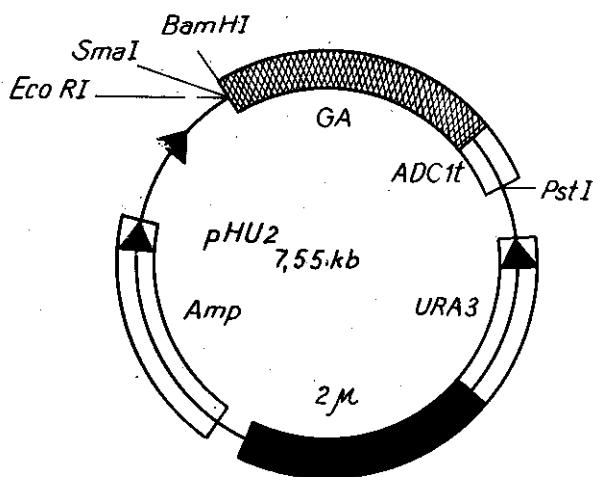
ADN genom KY117 được xử lý với

Sau3A sau 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút

1 2 3 4

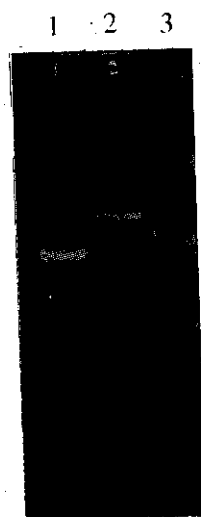


Hình 2. Phân tích ADN các đoạn từ 0,5 đến 2 kb sau khi thôi gel
Đường chạy số 1: ADN chuẩn
Đường chạy số 2: sản phẩm ADN sau khi thôi gel



Hình 3. Sơ đồ cấu trúc vector pHU2

Kết quả trên điện di (hình 4) cho thấy pHU2 sau khi xử lý với *Bam*HI chỉ cho 1 băng duy nhất, điều đó chứng tỏ ADN đã được cắt khá triệt để.



Hình 4. Phân tích ADN pHU2 sau khi xử lý với *Bam*HI

Đường chạy số 1: ADN pHU2

Đường chạy số 2: ADN pHU2

sau khi xử lý với *Bam*HI

Đường chạy số 3: ADN chuẩn

4. Nối ghép các đoạn ADN của *S. cerevisiae* KY117 vào vectơ pHU2:

Phản ứng gắn giữa các đoạn ADN có kích thước từ 0,5 đến 2 kb thu nhận từ chủng nấm men KY117 và vectơ pHU2 được tiến hành như đã mô tả. Hiệu suất biến nạp đạt được là $3,07 \times 10^3$ thể biến nạp/ μ g ADN. Để so sánh một cách chính xác độ dài của các dòng ADN plasmit của các thể biến nạp với ADN pHU2 chúng tôi dùng enzyme giới hạn *Pst*I cắt các plasmit tách được từ 10 mẫu và đồng thời cắt vectơ pHU2 cho chúng mở vòng. Những plasmit có mang đoạn ADN ngoại lai sẽ có kích thước lớn hơn kích thước vectơ pHU2 từ 0,5 đến 2 kb.

Kết quả chạy điện di trên gel agarosa (hình 5) cho thấy có 5 thể biến nạp mang ADN plasmit cho vạch ADN cao hơn plasmit pHU2. Điều đó chứng tỏ các plasmit này có kích thước lớn hơn plasmit pHU2 do trong phân tử được gắn thêm đoạn ADN ngoại lai. Ngoài ra trên điện di còn phát hiện thêm 4 dòng ADN của các thể biến nạp khi được xử lý bằng enzyme *Pst*I tạo ra hai băng. Việc xuất hiện một băng nữa có thể là do trong vectơ mới có thêm một điểm cắt *Pst*I nằm trong đoạn ADN ngoại lai đã gắn vào. Như vậy trong số 10 thể biến nạp thì có 9 thể biến nạp mang plasmit pHU2 đã được gắn với đoạn ADN genom của KY117. Điều đó chứng tỏ sau phản ứng gắn hiệu suất tái tổ hợp giữa vectơ và các đoạn ADN ngoại lai là rất cao (90%) chứng tỏ chất lượng ngân hàng gen mà chúng tôi tạo được là rất tốt.



Hình 5. Phân tích ADN plasmit của các thể biến nạp sau khi xử lý với *Pst*I

Đường chạy số 1: ADN plasmit pHU2 sau khi xử lý với *Pst*I

Đường chạy số 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: Các dòng ADN sau khi biến nạp từ dòng 1 đến dòng 10 được xử lý với *Pst*I

III. KẾT LUẬN

Ngân hàng gen để phân lập các promoter mạnh của nấm men *S. cerevisiae* dựa trên cơ sở vector pHU2 mang gen cấu trúc glucoamylaza của *S. fibuligera* khuyết promoter và dựa trên cơ sở các phân đoạn ADN phân lập từ genom của chủng *S. cerevisiae* KY117 có kích thước từ 0,5 đến 2 kb đã được thiết kế thành công.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thanh Thủy, Phạm Thúy Hồng, Trương Nam Hải, 1998: Tạp chí Sinh học, 20(2): 47-50.

2. Trương Nam Hải, Lê Xuân Tú, Pulitzer J. E., 1994: Tạp chí Sinh học, 16(1):

4-10.

3. William J. Dower, Jeff M. Miller and Charles W. Ragsdale, 1988: Nucleic acids research, 16: 6127-6145.

4. Rickwood D. and Hames B. D., 1994: Oxford University Press. NY.

5. Sambrook J., Frisch E. F., ADN Maniatis T., 1989: Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

6. Trương Nam Hải, Lê Xuân Tú, Pulitzer J., 1994: Tạp chí Sinh học, 16(2): 1-4.

7. Fred Sherman, Gerald R. Fink and James B. Hicks, 1986: Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory.

CONSTRUCTION OF THE GENE BANK FOR CLONING THE PROMOTERS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

NGUYEN THI THANH HUYEN et al.

SUMMARY

A gene bank based on probe-promotor plasmid pHU2 and 0.5-2kb fragments isolated from the genom of *Saccharomyces cerevisiae* KY117 strain has been constructed. The used reporter gene was a promoterless gene encoding for glucoamylase of *Saccharomycopsis fibuligera* fused with terminator of alcohol dehydrogenase of *S. cerevisiae*. The rate of transformants carrying foreign DNA fragments reached at least 90%.

Ngày nhận bài: 27-8-1999

NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH CÂY XOAN ẤN ĐỘ (*AZADIRACHTA INDICA* A JUSS.) BẰNG NUÔI CÂY MÔ

VŨ NGỌC PHƯƠNG, PHẠM ĐỨC TRÍ, THÁI XUÂN DUY,
NGUYỄN VĂN UYÊN

Viện Sinh học nhiệt đới

Cây Xoan Ấn Độ *Azadirachta indica* A Juss. còn được gọi là neem thuộc họ Xoan Meliaceae. Cây xoan này có nguồn gốc từ tiểu lục địa Ấn Độ, thích hợp với khí hậu khô hạn ở các dải đất ven biển miền Trung nước ta. Trong lá và hạt có azadirachtin có tác dụng diệt sâu hại.

Một khó khăn trong việc nhân giống neem là hạt neem chỉ giữ được sức nảy mầm trong 2 tuần, kể từ khi quả (hạt) chín [9]. Để có thể chủ động được nguồn giống thì việc dùng kỹ thuật cấy mô để nhân giống là một trong những giải pháp cần được nghiên cứu và hoàn thiện nhất là trong giai đoạn đầu khi nguồn hạt giống còn rất hữu hạn.

Với khả năng chịu khô hạn tốt, và công dụng làm nguyên liệu để sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, cây xoan Ấn Độ là cây lâm nghiệp rất đáng chú ý để phục vụ cho chương trình phủ xanh đất trống, đồi trọc.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu cấy là cành non của một cây trưởng thành 4 năm tuổi. Mẫu được rửa sạch bằng xà bông, sau đó khử trùng trong cồn 70° và xử lý lần lượt trong hypoclorit canxi 3% trong 15 phút, HgCl_2 0,05% trong 5 phút. Sau đó mẫu được rửa nhiều lần bằng nước vô trùng và đưa vào môi trường nuôi cấy.

Môi trường sử dụng là khoáng MS [6]: (mg/l) NH_4NO_3 1650, KNO_3 1900, KH_2PO_4 170, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370) có bổ sung đường saccaro 30 g/l, vitamin và các loại chất sinh trưởng tùy trường hợp.

Giai đoạn ra rễ: khoáng MS được giảm còn một nửa và nồng độ đường giảm xuống là 10

g/l. Nút bình ở giai đoạn này được dây bằng giấy để giảm độ ẩm trong bình và tăng trao đổi khí cho cây thích nghi dần với điều kiện bên ngoài.

Các chất sinh trưởng sử dụng là 6 -Benzyl Adenine (BA), 6-Furfuro Aminopurien - ((KN kinetin)), α - Naphthalene Acetic Acid (NAA), Indol Butyric Acid (IBA), Indol Acetic Acid (IAA)

Cường độ ánh sáng 2000 lux, chu kỳ chiếu sáng 8 / 16 (sáng : tối) cho giai đoạn tạo và nhân chồi, cho giai đoạn ra rễ tăng lên 4000 lux 16 / 8 (sáng : tối) để chuẩn bị di chuyển ra trồng. Nhiệt độ $26^\circ\text{C} \pm 2$.

Các số liệu trình bày trong các bảng được ghi nhận vào ngày thứ 35 sau khi cấy.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tạo cụm chồi:

Sau khi khử trùng và đưa mẫu vào nuôi cấy, nhận thấy cây xoan Ấn Độ có một đặc điểm quan trọng là rất hay hình thành mô sẹo ở gốc. Với một dãy các loại chất sinh trưởng khác nhau chỉ có các công thức không có auxin thì không có hiện tượng sùi gốc và đây là tính chất đặc trưng của cây xoan Ấn Độ [7, 9].

Đáng chú ý là, với môi trường không có chất sinh trưởng 95% mẫu đều sùi mô sẹo ở gốc mà không xuất hiện chồi. Điều này cho thấy hàm lượng auxin nội sinh tự nhiên trong cây tương đối cao [5]. Khi bổ sung BA với nồng độ từ 0,1 đến 2,5 ppm đều thấy có chồi hình thành, đặc biệt ở các nồng độ BA từ 0,5 đến 2 ppm.

Khi nồng độ BA vượt quá 2 ppm sự tạo chồi bắt đầu bị kìm hãm. Nồng độ BA thấp hơn 0,1

Bảng 1

**Ảnh hưởng của các chất sinh trưởng khác nhau
lên sự hình thành mô sẹo và cụm chồi ở cây xoan Ấn Độ**

Chất sinh trưởng (ppm)	Chiều cao chồi (mm)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Tỷ lệ có mô sẹo ở gốc (%)
Không chất sinh trưởng	Không có	0	95
BA 2 + IAA 0,5	7	22	90
BA 2,5 + IAA 0,05	6	31	85
BA 0,1 + KN 0,05	25	0	0
BA 0,5 + KN 1	12	81	0

ppm không có tác dụng đẻ chồi. Nồng độ BA 0,5 ppm là tốt nhất cho tạo cụm chồi. Do quan sát thấy các nồng độ BA lớn hơn 2,5 và nhỏ hơn 0,1 đều không thích hợp cho tạo chồi nên các thí nghiệm đã không mở rộng ra ngoài các nồng độ kể trên của BA.

Kinetin khi cho vào môi trường, có tác dụng làm cho chồi khỏe mạnh và cũng có tác dụng kích thích tạo chồi nhẹ.

Các auxin (IAA, NAA) không có tác dụng làm chồi lớn cũng như tạo chồi.

2. Nhân chồi:

Trên môi trường tạo chồi có các nồng độ BA cao, chồi nhỏ dần đi và nhiều trường hợp có thể chết. Khi giảm nồng độ BA xuống một mức nhất định thì có thể nhân được chồi khỏe mạnh trong một thời gian tương đối dài (bảng 2), vì vậy, nồng độ 0,5 ppm BA và 1ppm kinetin chỉ nên sử dụng để kích thích tạo cụm chồi ban đầu. Trong các lần cấy chuyển nhân giống sau này nên giảm nồng độ các chất sinh trưởng xuống.

Bảng 2

**Ảnh hưởng của nồng độ BA và kinetin đến sự tạo chồi ở cây xoan Ấn Độ
trong giai đoạn cấy chuyển nhân chồi**

Chất sinh trưởng (ppm)	Chiều cao chồi (mm)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Dị dạng (%)
Không chất sinh trưởng	10-30	Không	Không
BA 0,5 + KN 1	12	50	30
BA 0,1 + KN 0,05	10-20	80	10

3. Tạo rễ:

Sau một quá trình nhân giống ở dạng cụm chồi, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo giảm đi so với khi mới đưa vào nuôi cấy. Trên môi trường không có chất sinh trưởng mô sẹo không hình thành trong khi đó ở mẫu mới đưa vào tỷ lệ tạo mô sẹo là 95% (bảng 1). Có lẽ đó là sự thích nghi của mẫu sau một thời gian nuôi trên môi trường có BA làm giảm hàm lượng auxin nội sinh.

Môi trường ra rễ có lượng khoáng MS giảm còn một nửa (MS/2) và chỉ sử dụng 10 g/l đường sacaro, thay vì 30 g/l.

Các kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy IBA có tác dụng cho ra rễ tốt hơn IAA. Nồng độ thích hợp của IBA là 0,2 ppm. Khi tăng IBA lên 0,5 hoặc 1 ppm, tỷ lệ ra mô sẹo ở gốc tăng và cây lớn chậm đi, số rễ ít đi.

Ảnh hưởng của chất sinh trưởng đến sự ra rễ của cây xoan Ấn Độ

Chất sinh trưởng (ppm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (mm)	Tỷ lệ có mô sẹo ở gốc (%)
Không chất sinh trưởng	85	15 (rễ mảnh)	Không
IAA 0,2	35	15	30
IAA 0,5	27	16	80
IAA 1	33	18	100
IBA 0,2	100	15 (rễ mập)	10
IBA 0,5	93	30	30
IBA 1	82	25	50

4. Nhân giống in vitro cây xoan Ấn Độ bằng cách cắt đoạn thân:

Có hai lý do để nhân giống bằng cách cắt đoạn thân. Một là không cần sử dụng chất sinh trưởng để nhân giống. Việc dùng chất sinh trưởng lâu *in vitro* sẽ dẫn đến việc tích lũy những biến dị bất lợi [2]. Việc giảm nồng độ BA trong khi nhân chồi có thể coi như một bằng chứng (bảng 2) Hai là, trong quá trình tạo rễ nhận thấy chồi đơn mọc rất nhanh thành cây hoàn chỉnh có 4-6 lá. Việc lớn nhanh như vậy của cây xoan Ấn Độ cho phép nghĩ đến việc nhân giống cây xoan Ấn Độ bằng cách cắt đoạn thân như kiểu nhân khoai tây bằng nuôi cấy mô. Tuy nhiên cũng cần xem xét các thông số kỹ thuật cần thiết để khẳng định cho cách làm này trên cây xoan Ấn Độ. Các kết quả bước đầu được trình bày trong bảng 4.

Bảng

Tốc độ phát triển của cây xoan Ấn Độ từ các đoạn thân có vị trí khác nhau trên môi trường ra rễ

Vị trí đoạn thân	Chiều cao cây trung bình (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số lá trung bình
Đốt ngọn	60	92	3,2
Đốt lá 2 trên xuống	75	100	3,4
Đốt lá 3 trên xuống	45	95	2,8
Đốt sát gốc	30	72	1,4

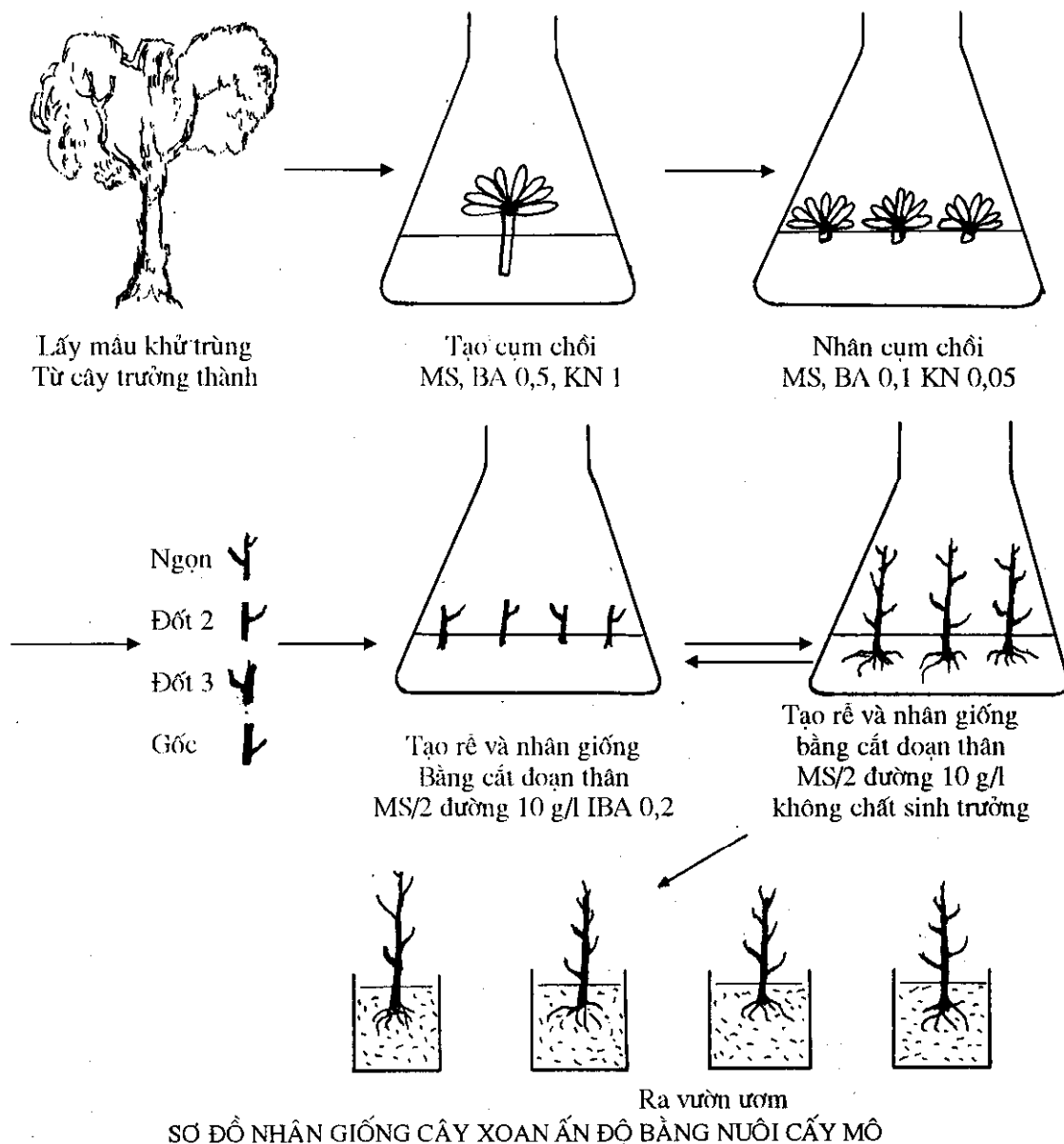
Đốt thứ 2 từ trên xuống có sức mọc mạnh nhất, sau 35 ngày nuôi cấy, đạt chiều cao trung bình 75 mm. Các cây mọc đồng đều. Việc đốt thứ 2 mọc tốt nhất là một dấu hiệu khích lệ cho việc chọn phương pháp cắt đốt để nhân giống. Bên cạnh đó, hệ số nhân khoảng trên 3 sau một lần cấy chuyển là có thể chấp nhận.

5. Trồng vào bầu đất:

Cây có rễ hoàn chỉnh được đem trồng vào bầu đất, giữ ở điều kiện ánh sáng tự nhiên dao động 2000-4000 lux trong mùa mưa tháng 8.1999. Nhận xét sơ bộ thấy cây không có đòi hỏi đặc biệt về tỷ lệ sống cao. Cây cũng không dễ bị héo như Paulownia hay khoai tây. Cây cũng cấp và chịu được nắng sau 2 tuần trong vườn ươm. Việc cây không bị héo như các loại cây khác ở giai đoạn mới lấy ra khỏi bình nuôi cấy mô, có thể là do cây có bản chất chịu hạn tốt, ít bị mất nước qua lá.

6. Quy trình nhân giống cây xoan Ấn Độ bằng nuôi cấy mô:

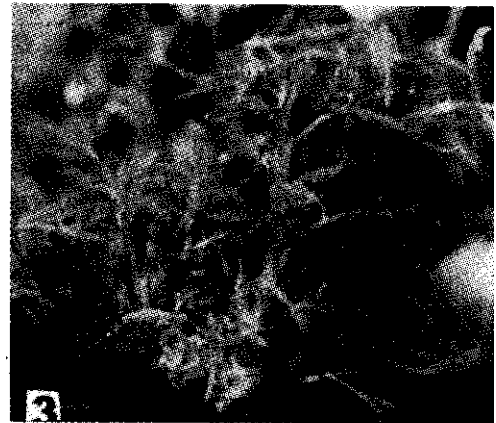
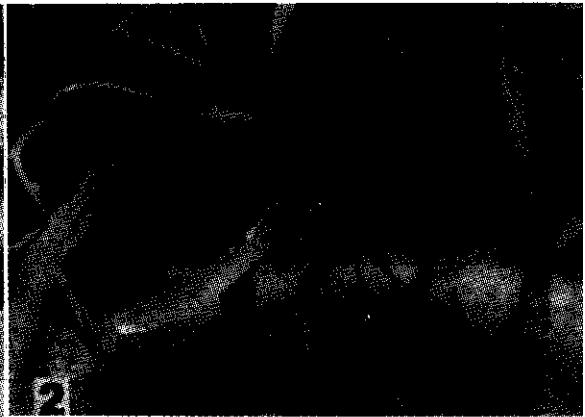
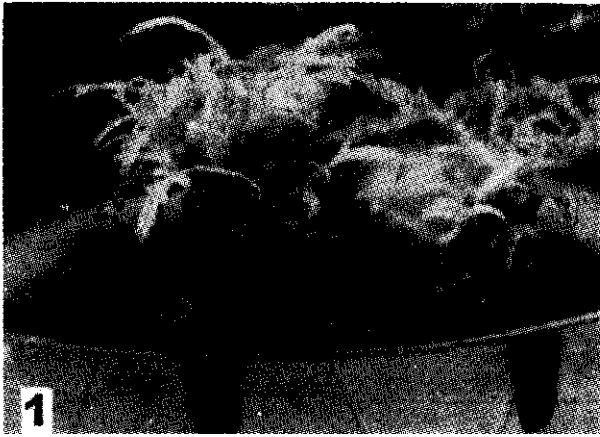
Kết quả nghiên cứu trên cho thấy có thể tạo ra một lượng lớn cây xoan Ấn Độ giống chất lượng cao có tỷ lệ azadirachtin 0,75% [4] bằng nhân giống cây mô [1, 3]. Sơ đồ được tóm tắt như sau:



III. KẾT LUẬN

Có thể nhân giống cây xoan Ấn Độ bằng nuôi cấy mô theo quy trình như sau:

- Gây chồi trên môi trường có BA 0,5 ppm và kinetin 1 ppm.
- Nhân chồi trên môi trường có BA 0,1 ppm và kinetin 0,05 ppm.
- Nhân bằng cát đốt trên môi trường có IBA 0,2 ppm.
- Cây có đủ rễ thì đem trồng ra bầu đất, cây cứng cáp chịu được nắng sau 2 tuần chăm sóc.



Hình ảnh. 1. Tạo cụm chồi xoan Ấn Độ dưới ảnh hưởng của BA và kinetin (Multishoots)
 2. Mẫu đưa vào môi trường có BA và KN nồng độ thấp mầm mọc thành cây đơn.
 3. Nhân chồi; 4. Tạo rễ và chuẩn bị đưa ra bầu đất.
 5. Cây mọc từ một đoạn thân (in vitro nodal cutting); 6. Cây trồng vào bầu đất (potted plantlets)

1. Debergh P. C. and Zimmerman R. H., 1991: Micropropagation technology and application. Kulwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
2. D'Amato F., 1986: Spontaneous mutation and somaclonal variation, (Session I) Genetic Variation from in vitro culture, in: Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. Proceeding of symposium jointly organized by IAEA and FAO, Vienna, 19-23 August 1985: 3-10.
3. Hu C. Y. and Wang P. J., 1983: Meristem, shoot tip and bud culture. In: Handbook of plant cell culture Vol. 1 Evans DA, Sharp WR, Amirato PV, Yamada Y (eds) Macmillan, New York: 177-227.
4. Lee S. M. and Kloehe J. A., 1994: J. Liquid Chromog 10: 1151-1168.
5. Marks T. R and Simpson S. E., 1994: II. Hort. Sci. 69: 543-551.
6. Murashige T. and Skoog F., 1962: Physiol. Plant 15: 473.
7. Preece J. E., Huettelman C. A., Ashby D. C. and Roth P. H., 1991: J. Am. Soc. Hort. Sci., 116: 142-148.
8. Rao C. D., Goh C. J. and Kumar P. P., 1993: Cel. Dev. Biol. 29: 72-76.
9. Rani A. S. and Reddey G. M., 1999: Apam newsletter, 1(3): 12-15.

MICROPROPAGATION OF NEEM (*AZADIRACHTA INDICA* A. JUSS.) BY TISSUE CULTURE

VU NGOC PHUONG et al.

SUMMARY

The micropropagation of Neem *Azadirachta indica* A. Juss., by the tissue culture includes 4 steps:

1. Multishoot induction: Young stem of adult tree. Basal MS salts medium supplemented with BA (0.5 ppm), KN (1 ppm).
2. Shoot propagation: MS medium supplemented with BA (0.1 ppm), KN (0.05 ppm).
3. Nodal cutting and Rooting: half-strength MS salts medium supplemented with IBA (0.2 ppm) or without hormones.
4. Potting: 2000-4000 lux light under the natural conditions.

A high rate of micropropagation, 3¹² of potted plantlets per year, has been attained.

Ngày nhận bài: 20-8-1999

NGHIÊN CỨU BƯỚC ĐẦU VỀ ĐỘC SỐ PSP TRONG MỘT SỐ LOÀI HAI MẢNH VỎ VÙNG BIỂN NHA TRANG VÀ PHAN THIẾT

ĐỖ TUYẾT NGÀ, LÂM NGỌC TRÂM, CAO PHƯƠNG DUNG, LƯU TIẾN HÀ, ĐÀO VIỆT HÀ, PHẠM XUÂN KỲ

Viện Hải dương học Nha Trang

PSP (Paralytic Shellfish Poison) là dạng ngộ độc sinh học ở người do việc tiêu thụ các loài sinh vật có vỏ (shellfish) đã bị nhiễm độc tố của các loài dinoflagellates như *Alexandrium catenella*, *A. acatenella*, *A. coarctatum*, *A. tamarense*, *Gymnodinium centatum*, *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*.

PSP gây hiện tượng tê liệt, mất sự phối hợp vận động. Trong trường hợp nghiêm trọng, cơ hô hấp bị liệt dẫn đến ngừng thở và chết (lượng độc tố là 5.000 - 30.000 MU) [2].

Hiện nay độc tố PSP được xem là nguy hiểm nhất trong số các loại phytotoxin vì Dinoflagellates gây độc tố này giữ vị trí đầu tiên trong chuỗi thức ăn ở biển. Thêm vào đó, hai mảnh vỏ bị nhiễm độc PSP sẽ là sinh vật trung gian chuyển độc tố này sang người tiêu thụ. Do đó, để có thể đánh giá chất lượng hai mảnh vỏ, tìm hiểu khả năng bị nhiễm độc tố PSP ở hai mảnh vỏ nhằm bảo vệ sức khỏe cộng đồng, tránh thiệt hại cho người nuôi trồng và góp phần đánh giá hiện trạng môi trường, bước đầu chúng tôi nghiên cứu độc tố PSP từ một số loài hai mảnh vỏ thu ở vùng biển Nha Trang và Phan Thiết.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đã tiến hành thu mẫu tại 2 địa điểm Nha Trang và Phan Thiết gồm:

8 loài *Saccostrea cucullata*, *Isognomon ephippium*, *Amussium pleuronectes*, *Katelysia hiantina*, *Cardium briadiatum*, *Pinna attenuata*, *Spondylus squamosus*, *Tridacna crossea* thu ở vùng biển Nha Trang vào các tháng 3, 5, 6, 8, 10/1997 và 8 loài *Saccostrea cucullata*, *Pinctada martensii*, *Amussium pleuronectes*, *Pecten solaris*, *Chlamys nobilis*, *Cardium briadiatum*,

Cucullaea labiata, *Arca navicularis* hai mảnh vỏ ở thu vùng biển Phan Thiết vào tháng 5, 7, 9/1997.

Chiết xuất và thử nghiệm độc tố PSP trên chuột theo phương pháp AOAC, 1990 [1] và phương pháp tiêu chuẩn của ASEAN-Canada PSP Bioassay Workshop, 1997 [4].

Chuẩn bị dung dịch chuẩn PSP mẹ có nồng độ là 1 µg/ml. Pha loãng thành nhiều nồng độ.

Chọn lọc nồng độ pha loãng thích hợp bằng cách tiêm 1 ml dung dịch pha loãng vào khoang bụng chuột có trọng lượng 18, 20, 22 g. Nếu thời gian chết của chuột trong khoảng 5-7 phút thì sẽ tiêm thêm 9-10 chuột. Xác định thời gian chết trung gian cho nhóm chuột.

Sử dụng bảng Sommers và tính giá trị hệ số điều chỉnh (CF) bằng công thức sau:

$$CF = \frac{\mu\text{g độc tố PSP / ml}}{\text{Đơn vị chuột đã được hiệu chỉnh trọng lượng (MU/ml)}}$$

CF ngày thứ nhất sẽ là trung bình của giá trị CF được lập với 3 nồng độ khác nhau

Tiếp tục lập hệ số CF như trên trong 3 ngày.

Tính trung bình của 3 giá trị CF trong 3 ngày sẽ có hệ số CF 3/3.

CF 3/3 biểu thị sự chuẩn hóa của người thử nghiệm và phương pháp thử nghiệm.

Mẫu đem về phòng thí nghiệm được phân tích ngay và gồm những bước sau:

- Rửa sạch vỏ. Đo chiều cao vỏ, chiều rộng vỏ, trọng lượng cơ thể. Tách vỏ. Rửa sạch bằng nước máy. Tráng lại bằng nước cất. Để ráo trên rây trong 5 phút. Tách riêng nội quan và cơ.

Mô (nội quan) (g)

Rửa và để ráo nước
trong 5 phút
Xay nhuyễn

Hỗn hợp đồng nhất

Thêm lượng tương
đương HCl 0,1 N
Hiệu chỉnh pH 3 - 4
Đun sôi trong 5 phút
Để nguội
Pha loãng đến một
lượng gấp đôi mẫu
Hiệu chỉnh lại pH 3 - 4
Ly tâm 3000 vòng
trong 5 phút

Loại ← Kết tủa DỊCH CHIẾT PSP THỎ
Sơ đồ chiết PSP theo phương pháp AOAC-1990

Chuột được sử dụng trong thử nghiệm là *Mus musculus*. Tuổi: 35-40 ngày, trọng lượng: 18-21 gam.

Tiêm vào khoang bụng chuột 1 ml dịch chiết/1 chuột. Mỗi dịch chiết tiêm 3 con. Theo dõi phản ứng của chuột trong suốt 60 phút. Ghi nhận phản ứng của chuột theo thời gian, và đánh giá độc tính của chuột thử nghiệm dựa vào hiện tượng của chuột sau khi tiêm độc tố PSP chuẩn theo khóa tập huấn do ASEAN-Canada [4] như sau:

- Xa lánh các chuột khác
- Đi xung quanh chuồng
- Xuất hiện vẻ mặt mệt mỏi, uể oải
- Rung và giật liên hồi
- Nhảy vọt nhiều lần
- Đập mình
- Hấp hối
- Chết

Kết quả được tính nếu 2/3 số chuột thí nghiệm có những hiện tượng trên.

Song song, tiêm 1 ml dung dịch HCl (pH = 3-4) để đối chứng. Hệ số CF $3/3 = 0,21$ được lập sẵn trước khi thử chuột.

Công thức tính PSP trong mẫu:

$$\mu\text{g PSP}/100 \text{ gam mẫu} = \text{CMU}/\text{ml} \times \text{CF} \times \text{DF} \times 200$$

Trong đó: CMU: đơn vị chuột đã được hiệu chỉnh trọng lượng

CF: hệ số hiệu chỉnh

DF: hệ số pha loãng

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sau 6 lần thu mẫu ở Cửa Bể - Vĩnh Trường, Vũng địa 3/2 và Hòn Mun - Vĩnh Nguyên - Nha Trang và 3 lần thu mẫu ở Cảng cá và vùng Phan thiết cách bờ (6-8 km) bước đầu chúng tôi đã thu được một số kết quả sơ bộ thể hiện qua các bảng 1-2.

1. Xác định độc tố PSP:

1.1. Trạng thái và triệu chứng của chuột thử nghiệm đối với độc tố PSP chiết từ hai mảnh vỏ:

Mẫu hai mảnh vỏ thu ở vùng biển Nha Trang đều có ảnh hưởng lên chuột thử nghiệm, chất chiết PSP từ phần cơ của các loài *Amussium pleuronectes*, *Kaletysia hiantina* và *Cardium briadiatum* chỉ gây những phản ứng tương đối nhẹ và chuột thường có những biểu hiện sau:

- Ngay sau khi tiêm khoảng 30 giây cho đến 1-2 phút, chuột chạy quanh chuồng.

- Ngừng chạy, thờ vùng bụng, di nhón chân sau, rồi nằm một chỗ, đầu cúi, mắt nhắm, sau đó sẽ hồi phục và trở lại bình thường trong vòng 60 phút (bảng 1).

Đa số phần nội quan của *Kaletysia hiantina*, *Cardium briadiatum*, *Amussium pleuronectes* làm chuột bị ảnh hưởng mạnh hơn, ngoài những biểu hiện trên, chuột còn có những triệu chứng tiếp là:

- Oằn bụng
- Hai chân cứng đờ
- Thở mạnh liên hồi
- Mắt nhắm, lơ dờ.

Chuột có những biểu hiện trên thường không thể hồi phục trong vòng 60 phút (bảng 1).

Toàn bộ mẫu *Saccostrea cucullata* và *Isognomon ehippium* thu ở cửa vùng Cửa Bè-

Đĩa 3/2 đều có những triệu chứng nghiêm trọng như:

- Nhảy vọt rất nhanh, liên tiếp nhiều lần
- Thở gấp
- Chết.

Bảng

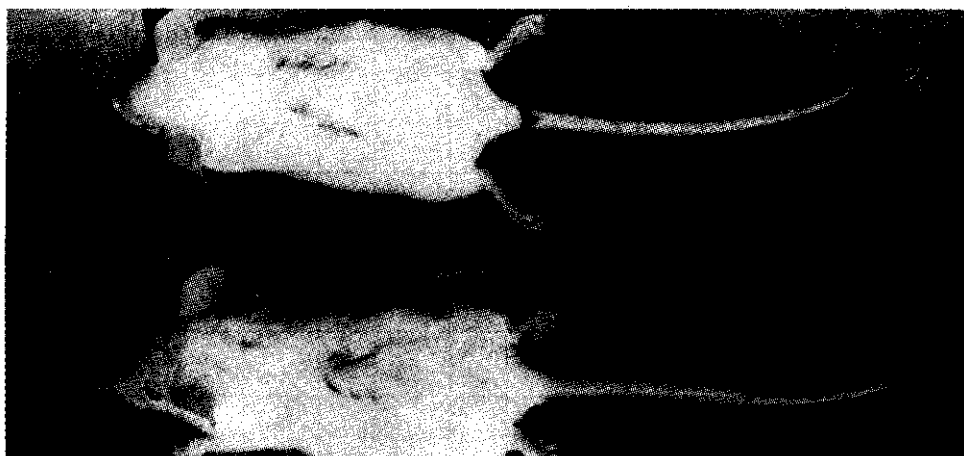
Kết quả độc tính PSP chiết từ một số loài hai mảnh vỏ thu ở vùng biển Nha Trang lên chuột thí nghiệm (Phương pháp AOAC,1990)

Nguồn chất chiết	T/g thu	Địa điểm	Tình trạng chuột thử nghiệm (theo dõi trong 60 phút)									
			Không phản ứng		Có phản ứng							
					Hồi phục		Không H/phục		T/g chết		µg PSP/100 g mẫu	
			cơ	nq	cơ	nq	cơ	nq	cơ	nq	cơ	nq
<i>Saccostrea cucullata</i>	31/3	Cồn cửa bé đến đĩa 3/2							>60		<36,75	
	5/5								>60		<36,75	
	10/6								>60		<36,75	
	5/8								>60		<36,75	
	13/10								>60		<36,75	
<i>Isognomon ehippium</i>	31/3	Cồn cửa bé đến đĩa 3/2							>60	>60	<36,75	<36,7
	5/5								45	44	37,71	37,7
	10/6								>60	>60	<36,75	<36,7
	6/8						x			>60		<36,7
	13/10								31	>60	38,51	<36,7
<i>Katelysia hiantina</i>	31/3	Vịnh Trường					x	x				
	5/5				x	x						
	10/6				x	x						
	5/8						x	x				
	13/10				x	x						
<i>Cardium briadiatum</i>	31/3	Mũi sông Lô						x				
	5/5							x				
	5/8						x	x				
	13/10		x					x				
<i>Amussium pleuronectes</i>	5/5	Mũi sông Lô			x			x				
	10/6						x	x				
	5/8				x	x						
	13/10						x	x				
<i>Pinna attenuata</i>	11/5	Hòn mun			x					>60		<36,7
<i>Tridacna crossca</i>	11/5				x			x				
<i>Spondylus squamosus</i>	11/5						x			>60		<36,7

Ghi chú: Chuột đối chứng hoàn toàn không phản ứng
Hệ số CF 3/3 = 0.21



Hình 1. Chuột trong trạng thái hấp hối sau khi được tiêm chất chiết PSP từ cơ của *Isognomon ephippium*



Hình 2. Chuột bị chết sau khi được tiêm chất chiết PSP từ cơ và nội quan của *Isognomon ephippium*

1.2. Xác định độc tố PSP chiết từ một số loài hai mảnh vỏ thu tại Nha Trang và Phan Thiết theo thời gian:

Theo dõi độc tố PSP theo thời gian thu mẫu, chúng tôi thấy hầu như không có sự thay đổi nào trong việc tích lũy độc tố PSP ở loài *Katylisia hiantina*, *Cardium briadiatum*, *Amussian pleuronectes* và *Saccostrea cucullata* nhưng ở loài *Isognomon ephippium* có dao động vào tháng 5 và tháng 10, tuy nhiên không cao lắm (chuột chết ở 45 phút/mẫu thu ngày 5/5 và 31 phút/mẫu thu ngày 13/10) (bảng 1).

Ở vùng biển Phan Thiết, đợt thu mẫu tháng 5 chỉ có 1 trường hợp chuột bị chết từ chất chiết *Cardium briadiatum*, đợt thu mẫu tháng 9 có 2 hiện tượng chuột chết từ loài *Saccostrea cucullata* và

từ loài *Saccostrea cucullata* và từ loài *Amussium pleuronectes*, các loài khác xem như không đa động (bảng 2).

Do vậy, biến động của độc tố PSP tích lũy theo thời gian thu mẫu trong năm 1997 không có biểu hiện rõ.

Bảng

Kết quả độc tính PSP chiết từ một số loài hai mảnh vỏ thu ở vùng biển Phan Thiết lên chuột thử nghiệm (Phương pháp AOAC, 1990)

Nguồn chất chiết	T/g thu	Địa điểm	Tình trạng chuột thử nghiệm (theo dõi trong 60 phút)									
			Không phản ứng		Có phản ứng							
					Hồi phục		Không H/phục		T/g chết		µg PSP/100 g mẫu	
			cơ	nq	cơ	nq	cơ	nq	cơ	nq	cơ	nq
<i>Saccostrea cucullata</i>	13/5 17/7 10/9	Cảng cá					x x			>60		<36,75
<i>Pinctada martensii</i>	13/5 17/7 10/9	Xa bờ 6-8 km					x x x	x x x				
<i>Pecten solaris</i>	13/5 17/7 10/9	Xa bờ 6-8 km			x x		x x	x x				
<i>Amussium pleuronectes</i>	13/5 10/9	Xa bờ 6-8 km			x x			x		>60		<36,7
<i>Chlamys nobilis</i>	13/5 10/9	Xa bờ 6-8 km					x x	x x				
<i>Cardium briadiatum</i>	13/5	Xa bờ 6-8 km					x			>60		<36,7
<i>Cucullaca labiata</i> <i>Arca navicularis</i>	13/5 13/5	Xa bờ 6-8 km					x x	x x				

Ghi chú: Chuột đối chứng hoàn toàn không phản ứng
Hệ số CF 3/3 = 0,21

1.3. Xác định độc tố PSP chiết từ một số loài hai mảnh vỏ thu ở Nha Trang và Phan Thiết theo loài:

Trong số các loài hai mảnh vỏ đã thu ở Nha Trang và Phan Thiết, chúng tôi được những kết quả sau:

Mẫu hàu *Saccostrea cucullata* và *Isognomon ephippium* thu ở Nha Trang tích lũy độc tố PSP cao nhất so với các loài khác, chúng

chứa độc tố quanh năm, nhưng với hàm lượng không cao (38,51 µg/100 g ở phần cơ *ephippium*, < 36,75 µg/100 g ở *S. cuculla* (bảng 1) so với hàm lượng độc tố PSP quy định của một số nước trên thế giới (80 µg STX/10 g).

Điều này chứng tỏ:

- Hai loài này rất nhạy với việc tích lũy độc tố PSP từ vi tảo độc.

- Trong vùng biển Nha Trang có các loài vi tảo độc chứa độc tố PSP nhưng với mật độ không cao.

Các loài khác khả năng tích lũy kém hơn (bảng 1).

Ở Phan Thiết, theo dõi mẫu thu từ tháng 5 đến tháng 9, chúng tôi ghi nhận có 3 trường hợp chuột chết bởi 3 chất chiết PSP của các loài: *Cardium briadiatum* (thu ở vùng biển cách bờ 6-8 km), *Saccostrea cucullata* (thu ở Cảng cá), *Amussium pleuronectes* (thu ở cách bờ 6-8 km) (bảng 2).

Đa số các loài hai mảnh vỏ thu ở vùng biển Phan Thiết không gây những triệu chứng ngộ độc rõ nét trên chuột so với mẫu thu ở Nha Trang.

Đặc biệt, đợt mẫu thu ở vùng địa 3/2 vào ngày 5/5 (10 ngày sau khi thấy có sự xuất hiện của vi tảo độc ở vùng này) cho kết quả ghi trong bảng 1.

- Các loài *Katylisia hiantina*, *Cardium briadiatum*, *Amussian pleuronectes*, phản ứng trên chuột vẫn giống như ở tháng 3.

- Ở loài *Saccostrea cucullata*, chuột thử nghiệm vẫn chết ngoài 60 phút.

- Riêng loài *Isognomon ephippium*, thời gian chết của chuột thử nghiệm ngắn nhất, cả ở phần cơ (45 phút) lẫn phần nội quan (44 phút) tương ứng với nồng độ là 37,71 µg/100 g (quá thấp so với giới hạn cấm sử dụng).

Theo M. Ledoux và cộng sự, 1991 [3] thì thành phần độc tố của Vẹm và Hàu trong những vùng bị nhiễm độc tố của vi tảo độc đều giống thành phần độc tố của những loài tảo đó. Do đó, có thể cho rằng *Isognomon ephippium* tích lũy nhanh và phản ứng được sự xuất hiện của vi tảo độc gây hiện tượng PSP tại vùng địa 3/2.

Cũng trong tháng 5 (11/5), chúng tôi thu thêm 3 loài hai mảnh vỏ ở Hòn Mun - Vĩnh Nguyên, kết quả là chất chiết PSP từ nội quan của *Pinna attenuata* và *Spondylus squamosus* làm chuột chết (thời gian > 60 phút), còn ở loài *Tridacna crossea*, chuột không chết (bảng 1).

Những kết quả đã thu được chứng tỏ rằng khả năng tích lũy độc tố PSP tùy thuộc vào loài. Ở đây, khả năng này ở Hàu cao hơn Đệp.

Ngoài ra, kết quả thử chuột từ chất chiết của mẫu Hàu *Saccostrea cucullata* và Đệp *Amussium pleuronectes* thu được ở Nha Trang và Phan Thiết giúp chúng tôi khẳng định việc sử dụng hai mảnh vỏ để đánh giá sự hiện diện của vi tảo độc trong vùng nghiên cứu là có logic và phản ánh khá trung thực hiện trạng môi trường biển.

III. KẾT LUẬN

Sau 42 lượt chiết xuất và thử nghiệm trên chuột chất chiết từ 13 loài hai mảnh vỏ thu được ở vùng biển Nha Trang và Phan Thiết từ tháng 3 đến tháng 10/1997, bước đầu chúng tôi có những nhận xét sau:

- Loài *Saccostrea cucullata* và *Isognomon ephippium* bị nhiễm độc tố PSP cao hơn các loài hai mảnh vỏ khác thu ở hai vùng biển Nha Trang và Phan Thiết. Độc tố PSP tập trung cao vào các tháng 5 và tháng 10/1997.

- Độc tố PSP tập trung ở phần nội quan cao hơn ở phần cơ.

- Vùng biển Nha Trang chịu ảnh hưởng của vi tảo độc gây hiện tượng ngộ độc PSP rõ nét hơn ở vùng biển Phan Thiết, nhưng mức độ nhiễm độc PSP của hai mảnh vỏ ở cả hai vùng biển đều rất thấp có thể xem như không đáng kể và an toàn cho việc sử dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AOAC, 1990: Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. In: Hellrich, K(ed). Official Methods of Analysis. 15th Edition, Sec 959.08. AOAC, Arlington, Virginia, USA: 881-882. In "Mammalian Bioassay" M. L. Fernandez and A. O. Cembella (Eds.). In "IOC Manuals and Guides No.3". G. M. Hallegraeff, D. M., Anderson and A. D. Cembella (Eds.) Unesco. 1995: 213-228. No.33". G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson and A. D. Cembella (Eds.) Unesco 1995: 213-228.

2. Bruce W. Halstead, E. J. Schantz, 1984: Paralytic Shellfish Poisoning. WHO-Geneva 1984: 59.

3. M. Ledoux, M. Bardovil, E. Nezan, E. Erard, 1991: Field and Experimental Studies of Shellfish Contaminated by an Alexandrium

(Xem tiếp trang 51)

BƯỚC ĐẦU THĂM DÒ ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ PHẨM PHILATÔP LÊN SỰ PHÁT DỤC CỦA LOÀI CUA BIỂN *SCYLLA SERRATA* (FORSKAL)

NGUYỄN THỊ HẢI YẾN, TRẦN DUY NGÀ

Trường đại học Khoa học - Đại học Huế

Việc cho cua sinh sản nhân tạo đã từ lâu thu hút nhiều nhà khoa học trên thế giới cũng như ở nước ta. Năm 1995 GS. Hoàng Đức Đạt ở Viện Sinh học nhiệt đới thành phố Hồ Chí Minh đã thành công cho cua đẻ và ương nuôi đến giai đoạn cua con [1, 3]. Gần đây tại Cần Thơ, Thạc sĩ Trương Trọng Nghĩa đã thành công cho cua sinh sản nhân tạo, lứa giống đầu tiên đã được đưa về nuôi ở tỉnh Sóc Trăng [5]. Như vậy việc cho cua đẻ theo ý muốn không còn là điều phi thực tế.

Khâu đầu tiên của công tác cho cua đẻ là chủ động tạo nguồn cua bố mẹ. Trong thí nghiệm này chúng tôi bước đầu tìm hiểu ảnh hưởng của philatôp được điều chế từ một số mô động thực vật lên quá trình thành thực của cua biển *Scylla serrata*.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chọn 12 cua biển loài *Scylla serrata* (Forsk.) ở các giai đoạn phát dục III, IV và V. Chia 4 lô, lô IV là đối chứng (thức ăn không có philatôp).

+ Làm tiêu bản mô học, xác định thời kỳ phát dục

+ Theo dõi ảnh hưởng của chế phẩm philatôp lên quá trình thành thực của cua.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

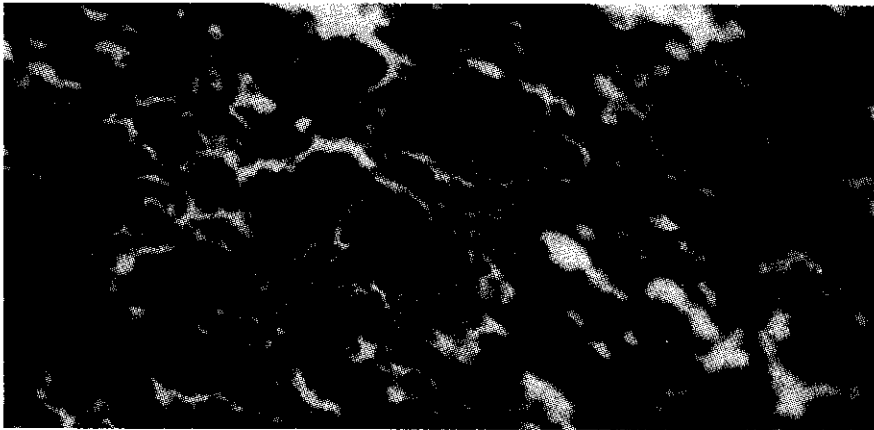
Sau khi thăm dò hoạt tính lên men của các loại chế phẩm khác nhau chúng tôi nhận thấy hai loại chế phẩm được điều chế từ gan lợn và lá bồ ngót có hoạt tính cao nhất. Trong thí nghiệm này chúng tôi thử theo dõi ảnh hưởng

của philatôp được điều chế từ gan lợn lên quá trình thành thực của cua.

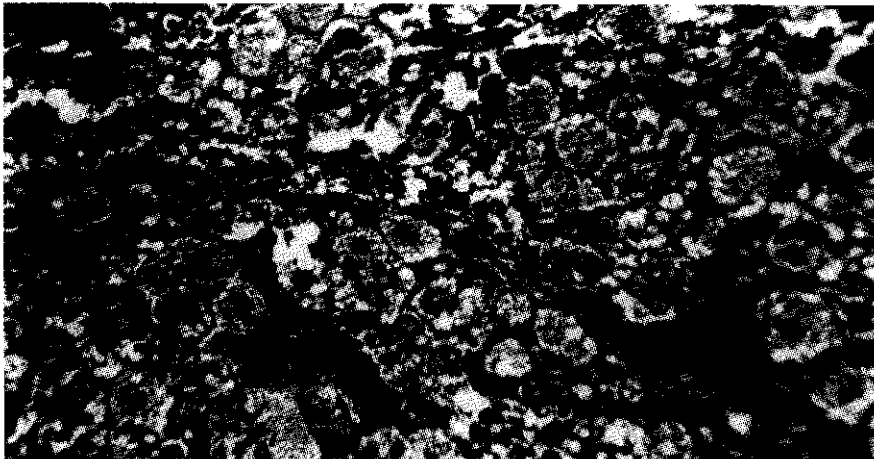
1. Đặc điểm buồng trứng của cua biển *Scylla serrata*:

Bằng phương pháp làm tiêu bản mô học buồng trứng của biển ở những giai đoạn khác nhau cho chúng tôi nhận thấy buồng trứng của biển *Scylla serrata* trải qua 6 giai đoạn phát triển.

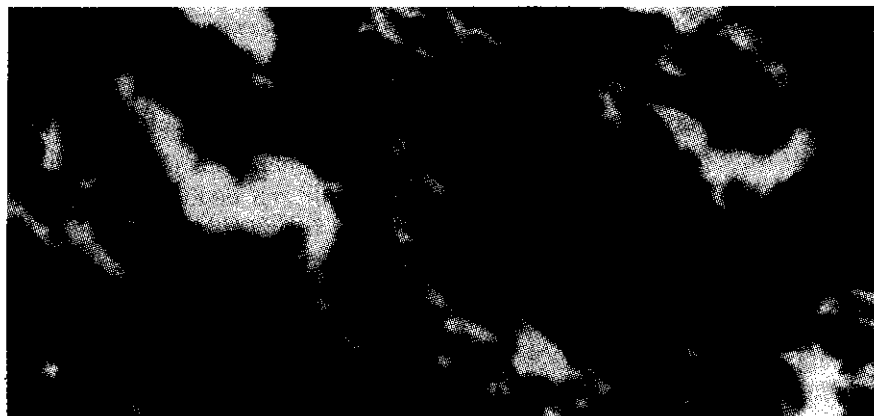
Giai đoạn I là giai đoạn chưa phát triển, giai đoạn này chưa phân biệt được các tế bào. Giai đoạn II gọi là giai đoạn mới phát triển, như buồng trứng vẫn chưa thấy sự phân thùy. Giai đoạn III là giai đoạn đang phát triển, lúc này màu sắc buồng trứng đã chuyển từ màu trắng sữa sang màu đen nhạt. Đã thấy sự phân thùy. Kích thước tế bào trứng cũng như kích thước nhân tăng lên rõ rệt so với hai giai đoạn đầu. Đường kính trung bình của tế bào trứng ở giai đoạn I là 19,5 - 46,6 μm , ở giai đoạn III: 133 - 155,3 μm . Bước sang giai đoạn IV hay còn gọi là giai đoạn sắp thành thực, buồng trứng có màu vàng gạch, kích thước các trứng lớn, trọng lượng buồng trứng đạt từ 18,3 - 30 g trong đó ở giai đoạn I chỉ đạt từ 1 - 2 g. Giai đoạn V là giai đoạn thành thực. Buồng trứng có màu đỏ gạch, trọng lượng đạt từ 30,5 - 55,7 g. Đường kính trung bình của trứng đạt: 195,3 - 246 μm . Lúc này màng nhân biến mất. Nhân hoàn toàn phát triển mạnh chiếm gần hết tế bào chất. Đây là thời kỳ trứng phát triển hoàn thiện, nếu duy trì trứng sẽ được ương ấp để nở thành con và trải qua các giai đoạn biến thái tạo thành cua giống. Giai đoạn VI là giai đoạn sau khi đẻ. Kích thước buồng trứng giảm đi rõ rệt. Các tế bào trứng còn lại ở vào giai đoạn



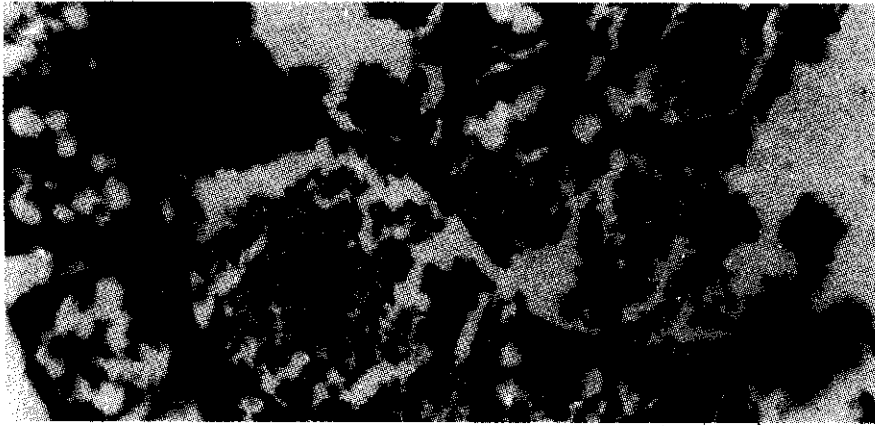
Ảnh 1. Tế bào trứng ở giai đoạn I



Ảnh 2. Tế bào trứng ở giai đoạn II



Ảnh 3. Tế bào trứng ở giai đoạn III



Ảnh 4. Tế bào trứng ở giai đoạn IV



Ảnh 5. Tế bào trứng ở giai đoạn V

Kết quả thu được cho thấy cua cũng như một số loài giáp xác khác (tôm) buồng trứng phát triển qua 6 giai đoạn [1, 2, 4], mỗi giai đoạn có đặc điểm về hình thái, màu sắc bên ngoài cũng như cấu trúc mô học đặc trưng riêng [6].

2. Xác định thời kỳ phát dục từ hình thái bên ngoài của cua biển:

Dựa vào kết quả nghiên cứu đặc điểm phát triển buồng trứng của cua chúng tôi tiến hành xác định thời kỳ phát dục của chúng. Ý nghĩa của đợt nghiên cứu này nhằm giúp ta có thể xác định được giai đoạn phát triển của buồng trứng từ những đặc điểm sinh dục thứ cấp bên ngoài ở

cua phát dục. Từ đó có thể chọn những cua phát dục ở giai đoạn cuối để cắt mắt gây dục dễ.

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi buồng trứng ở giai đoạn I, yếm gần như không có hiện tượng "hở" so với mai cua (độ "hở" là khoảng cách giữa mép đầu tiên của yếm và mai). Khi bước sang giai đoạn II độ hở yếm đạt 1 mm, màu sắc buồng trứng cũng chưa thể nhìn được qua lớp vỏ kitin, trong lúc đó ở giai đoạn III - giai đoạn đang phát triển, yếm hở so với mai là 2 - 3 mm. Màu vàng nhạt của buồng trứng đã có thể nhìn được qua lớp vỏ kitin, nhưng chưa rõ. Cua ở giai đoạn này người ta thường gọi là cua gạch còn non (chưa dầy). Ở giai đoạn IV, màu vàng của buồng trứng đã nhìn rõ qua lớp

vỏ kitin, độ hờ yếm đạt: 6 mm. Cua ở giai đoạn này dân thường gọi là cua gạch sấp đầy: Giai đoạn V là giai đoạn sấp đẻ. Thể tích buồng trứng chiếm gần hết xoang giáp đầu ngực, màu vàng của buồng trứng nhìn rất rõ không những ở mai cua (phần dưới gần chân bò) mà còn ở phần tiếp giáp giữa yếm và mai. Độ hờ yếm đạt 9-10 mm.

Như vậy khi theo dõi hình thái bên ngoài (độ hờ yếm, màu buồng trứng) giúp ta xác định được giai đoạn thành thực sinh dục của cua.

3. Ảnh hưởng của philatốp lên quá trình phát dục ở cua biển *Scylla serrata*:

Quá trình theo dõi được chia thành hai đợt: đợt 1 sau 20 ngày nuôi, đợt 2 sau 30 ngày nuôi. Kết quả cho thấy sau 20 ngày nuôi tất cả những cua thí nghiệm ở lô I (liều sử dụng là 0,5 ml/kg thể trọng) và lô II (liều sử dụng là 1 ml/kg thể trọng) đều có độ hờ yếm tăng, màu sắc buồng trứng càng nhìn được rõ hơn qua lớp vỏ kitin, và đối với liều 0,5 ml/kg thì độ hờ yếm tăng cao nhất, trong lúc đó ở lô đối chứng (lô IV) tăng chậm hoặc thậm chí không tăng, còn đối với lô III (liều sử dụng là 2 ml/kg thể trọng) độ hờ yếm không những không tăng mà cua thí nghiệm còn bị chết. Kết quả được trình bày cụ thể ở bảng 1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của philatốp lên quá trình phát dục cua biển sau 20 ngày nuôi (mm)

Lô	Cua TN	Độ hờ yếm trước TN	Độ hờ yếm sau TN	Mức tăng	Khoảng tăng
I (0,5 ml/kg)	1	4,0	4,5	0,5	4,0-4,5
	2	8,5	8,8	0,3	8,5-8,8
	3	2,0	2,7	0,7	2,0-2,7
II (1ml/kg)	1	5,4	5,6	0,2	5,4-5,6
	2	7,5	7,7	0,2	7,5-7,7
	3	2,5	3,0	0,5	2,5-3,0
III (2 ml/kg)	1	6,0	6,0	0,0	
	2	8,5	chết	-	
	3	3,0	2,5	-0,5	
IV (Đ.chứng)	1	2,5	2,7	0,2	2,5-2,7
	2	6,5	6,5	0,0	
	3	7,0	7,0	0,0	

Qua kết quả trình bày ở bảng 1 cho chúng ta thấy philatốp được chiết rút từ gan lợn có ảnh hưởng rõ rệt lên quá trình thành thực của buồng trứng cua biển, trong đó liều sử dụng đóng vai trò hết sức quan trọng. Khi sử dụng liều 0,5 ml/kg thể trọng có tác dụng kích thích quá trình phát dục của buồng trứng là cao nhất trong lúc đó với liều 2 ml/kg thì lại thể hiện sự kìm hãm quá trình đó. Để làm rõ thêm vấn đề này, chúng tôi tiếp tục theo dõi ảnh hưởng của philatốp gan lợn ở các liều sử dụng trên sau 30 ngày nuôi.

Kết quả khảo sát sau 30 ngày nuôi càng cho chúng tôi nhận định rằng philatốp gan lợn có

thể sử dụng để nuôi cua phát dục. So sánh giữa lô đối chứng và lô được bổ sung philatốp trong khẩu phần thức ăn với liều 0,5 ml/kg có sự sai khác rõ rệt. Độ hờ yếm ở những cua được bổ sung thêm philatốp đạt cao nhất và có thể đạt đến thời kỳ thành thực hoàn thiện (từ giai đoạn IV chuyển qua giai đoạn V).

Trên đây là những kết quả bước đầu, mặc dù vậy cũng cho chúng tôi hy vọng cải tiến cách nuôi phát dục cua biển, nhưng để có thêm dữ liệu, nghiên cứu cần được tiến hành lặp lại và mở rộng đối với nhiều loại chế phẩm từ nhiều loại mô động thực vật khác nhau.

Ảnh hưởng của phylatop lên quá trình phát dục của biển sau 30 ngày nuôi (mm)

Lô	Cua TN	Độ hở yếm trước TN	Độ hở yếm sau TN	Mức tăng	Khoảng tăng
I (0,5 ml/kg)	1	4,0	6,5	2,5	4,0-6,5
	2	8,5	9,8	1,3	8,5-9,8
	3	2,0	3,7	1,7	2,0-3,7
II (1ml/kg)	1	5,4	6,0	0,6	5,4-6,0
	2	7,5	7,8	0,3	7,5-7,7
	3	2,5	3,5	1,0	2,5-3,5
III (2 ml/kg)	1	6,0	5,0	-1,0	
	2	8,5	chết	-	
	3	3,0	1,5	-1,5	
IV (Đ.chúng)	1	2,5	3,0	0,5	2,5-3,0
	2	6,5	6,5	0,0	-
	3	7,0	7,7	0,7	7,0-7,7

IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được, bước đầu chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Buồng trứng của cua biển trải qua 6 giai đoạn phát triển, mỗi giai đoạn có đặc điểm hình thái bên ngoài và cấu trúc mô học đặc trưng riêng.

2. Từ các đặc điểm sinh dục thứ cấp, có thể xác định thời kỳ phát dục của cua.

3. Chế phẩm phylatop được chiết rút từ gan lợn có ảnh hưởng rõ rệt lên quá trình thành thực của cua biển, và liều lượng sử dụng đóng vai trò quan trọng trong quá trình đó. Khi sử dụng liều 0,5 ml/kg thể trọng, có tác dụng kích thích cao nhất, trong lúc đó liều 2 ml/kg thể trọng lại làm ức chế quá trình thành thực của cua biển.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Phạm Ca**, 1998: Ứng dụng kỹ thuật sản xuất giống *Penaeus monodon* ở quy mô nhỏ tại

Quảng Nam - Đà Nẵng. Tạp chí Thủy sản "Sinh học tôm và kỹ thuật nuôi tôm ở Việt Nam" NXB Nông Nghiệp, Hà Nội, 1988.

2. **Hứa Bộ Chiêu và Hà Lâm Cươ** (Chuyên gia Trung Quốc). Kỹ thuật sinh sản nhân tạo cua (Tài liệu chép tay của Miu Thùy). Thanh Hóa, 5/7/1992.

3. **Hoàng Đức Đạt**, 1995: Kỹ thuật nu cua biển. NXB Nông Nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh 1995.

4. **Đỗ Đức Hạnh**, 1988: Đặc điểm cấu trúc buồng trứng tôm he trong quá trình phát triển và thành thực. Tạp chí Thủy sản "Sinh học tôm và kỹ thuật nuôi tôm ở Việt Nam". NXB Nông Nghiệp, Hà Nội 1988.

5. **Trương Trọng Nghĩa**, 1999: Đã thả công cho cua và tôm càng xanh sinh sản nhân tạo. Báo Lao động, ra ngày 30/8/1999.

6. **Doãn Tả Phấn, Trương Tiểu Lê Vương Mệnh**, 1963: Nghiên cứu sơ bộ sự biến hóa tuyến sinh dục *P. Orientalis*.

PRIMARY RESEARCH ABOUT THE INFLUENCE OF THE PHILATOV PRODUCT ON THE ODULT PROCESS OF THE SEA CRAB SPECIES *SCYLLA SERRATAI* (FORSKAL)

NGUYEN THI HAI YEN, TRAN DUY NGA

SUMMARY

The sea crab's ovary experiences 6 development stages. Each stage has external morphological characteristics and tissue structure. Depending on these bases and from the second sexual characteristic which can be define the crab's sexual appearance stage, we choose crabs which can be cut their eyes to sexual appearance and give birth to.

To push up the sea crab's sexual appearance process, we research primarily on the influence of the philatove product.

Ngày nhận bài: 16-10-1999

(Tiếp theo trang 45)

minatum Strain. In "Proceedings of Symposium on Marine Biotoxins" (Eds.) J. Marc Fremy CNEVA, 1991: 43-51.

4. Standard Bioassay For Red Tide Toxins Workbook-CIDA Project No.149/15461. ASEAN-Canada-CPMS-II June/1997.

PRIMARY STUDY ABOUT THE PSP TOXIN IN SOME BIVALVE SPECIES COLLECTED AT THE COASTAL WATER OF NHATRANG AND PHANTHET CITIES

DO TUYET NGA et al.

SUMMARY

Among 13 bivalve species collected at the coastal waters of Nhatrang and Phanthet cities from March to October 1997, there were only two species *Saccostrea cucullata* and *Isognomon ephippium* which were sensitive to PSP accumulation. However the PSP concentration was too low to cause danger for consumers so these two coastal waters can be considered safety in term of PSP toxin.

Ngày nhận bài: 7-9-1999

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

PHẦN II: PHÂN HỌ HARPALINAE

LÊ KHƯƠNG THÚY

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Trước đây, tác giả đã xác định được 40 loài Harpalinae ở Việt Nam (Lê Khương Thúy, 1989). Nay bổ sung một số loài và địa điểm phân bố của chúng.

Tác giả xin chân thành cảm ơn các bạn đồng nghiệp và Dr. S. I. Ueno, chuyên gia Nhật đã kiểm tra lại toàn bộ mẫu của họ Carabidae giúp tôi hoàn thành bài báo này.

Chúng tôi đã tiến hành sưu tầm và nghiên cứu họ Carabidae 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 Harpalinae ở Việt Nam.

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

Trong bài báo này chúng tôi công bố danh lục phân họ Harpalinae ở Việt Nam có 57 giống, 110 loài trong đó đã phát hiện 37 giống mới và 32 loài mới cho khu hệ Carabidae Việt Nam (*) là giống, loài được ghi nhận lần đầu ở Việt Nam.

Danh lục phân họ Harpalinae ở Việt Nam

Phân họ Harpalinae

Tộc Amblystoniini

1. *Amblystomus quadriguttatus* (Motschulky)

Synonym: *Hispalis quadriguttatus* Motschulky
Amblystomus guttatus Bates

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

2. *Acupalpus annamensis* Bates

Phân bố: Hà Nội, Hà Tây (Lê Khương Thúy, 1989).

3. *Acupalpus biguttatus* (Motschulky)

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

4. *Acupalpus smaragdulus* Fabricius

Phân bố: Thanh Hóa (Mai Quý và ctv, 1989; Lê Khương Thúy, 1989). Bổ sung: Bắc Ninh, Hà Nội.

5. *Acupalpus inordus* Bates

Phân bố: Hà Tây.

6. *Acupalpus* sp.

Phân bố: Sông Bé.

7. *Harpalus sinicus* Hope

Phân bố: Hà Nội, Gia Lai.

8. **Platymetopus quaorimaculatus* Dejean

Phân bố: Trung Bộ, Nam Bộ (Cochinchine) [Mision Pavie, 1879-1895].

9. **Platymetopus indochinensis* Bates

Phân bố: Nam Bộ (Cochinchine) [Mision Pavie, 1879-1895].

10. **Anoplogenus rutilans* Bates

Phân bố: Nam Bộ (Cochinchine) [Mision Pavie, 1879-1895].

11. **Stenolophus quinquepustulatus*

(Wiedemanni)

Phân bố: Hà Bắc, Hà Nội, Hà Tây.

12. *Stenolophus 5-pustulatus ab-3 pustulatus* Jedl.
Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv, 1989; Lê Khương Thúy, 1989). Bổ sung: Hà Tây.
13. *Stenolophus 5-pustulatus ab-3 conexus* Schmidt
Phân bố: Hà Nội (Mai Quý và ctv, 1989; Lê Khương Thúy, 1989). Bổ sung: Hà Tây.
14. *Stenolophus smaragdulus* Fabricius
Phân bố: Hà Nội, Hà Tây, Quảng Ninh (Mai Quý và ctv, 1989; Lê Khương Thúy, 1989).
15. *Stenolophus* sp.
Phân bố: Minh Hải.
16. *Pardileus sinicus* Hope
Phân bố: Nghĩa Lộ, Hà Giang, Lào Cai, Hà Tây, Thanh Hóa, Nghệ An, Quảng Bình (Viện BVTV, 1976; Phạm Văn Lâm, 1997).
Bổ sung: Sơn La.
17. *Badister pictus* Bates
Phân bố: Hà Nội, Hà Tây, Hải Dương, Hưng Yên, Vĩnh Phúc (Viện BVTV, 1976; Phạm Văn Lâm, 1997).
18. **Hypolithus* sp.
Phân bố: Nghệ An.
19. **Egadroma* sp.
Phân bố: Hà Bắc.
20. *Dioryche clara* Budr.
Phân bố: Hà Bắc, Hà Nội, Hà Tây, Gia Lai, Kon Tum (Viện BVTV, 1976; Lê Khương Thúy, 1989; Phạm Văn Lâm và ctv., 1989).
21. **Dioryche torta* MacLeay
Phân bố: Việt Nam (M. Chujo, 1960-1962).
22. **Pseudozacna* sp.
Phân bố: Gia Lai.
23. **Risophilus signifer* (Schmidt-Goebel)
Phân bố: Việt Nam (M. Chujo, 1960-1962).
24. **Onycholabis mclitopus* Bates
Phân bố: Lào Cai.
25. **Onycholabis vietnamica* Kasahara
Phân bố: Cao Bằng.

Tộc Licinini

26. **Diplochila latifrons* Dejean
Phân bố: Nam Bộ (Cochinchine) [Mission Pavie, 1879-1895]
27. **Diplochila pinodes* Andrewer
Phân bố: Bắc và Nam Việt Nam (M. Chujo, 1960-1962).
28. *Diplochila* sp.
Phân bố: Gia Lai.

Tộc Panagaeini

29. **Epicosmus latiticolis* Chaudoir
Phân bố: Nam Bộ (Cochinchine) [Mission Pavie, 1879-1895].
30. **Epicosmus saundersi* Chaudoir
Phân bố: Nam Bộ (Cochinchine) [Mission Pavie, 1879-1895].
31. *Panagaeus* sp.
Phân bố: Hà Bắc, Hải Hưng (Viện BVTV, 1976).
32. **Craspedophorus* sp₁
Phân bố: Ninh Bình
33. *Craspedophorus* sp₂
Phân bố: Ninh Bình, Lạng Sơn, Cao Bằng, Quảng Ninh.
34. *Craspedophorus* sp₃
Phân bố: Gia Lai.
35. *Craspedophorus* sp₄
Phân bố: Gia Lai.
36. *Dischissus mirandus* Bates
Phân bố: Cao Bằng, Lạng Sơn (Mai Quý và ctv, 1989; Lê Khương Thúy, 1989).

Tộc Chlaeniini

37. *Chlaenius abstersus* Bates
Phân bố: Lạng Sơn, Bắc Thái, Vĩnh Phú, Hà Tây, Hải Hưng, Nam Hà, Ninh Bình, Thái Bình, Thanh Hóa (Viện BVTV, 1976; Lê Khương Thúy, 1989).
38. **Chlaenius bimaculatus* Chaudoir
Phân bố: Hà Nội.

39. *Chlaenius biguttatus* Motschulsky
Phân bố: Hà Giang, Quảng Ninh, Gia Lai, Kon Tum (Lê Khương Thúy, 1989).
40. **Chlaenius bioculatus* Chaudoir
Phân bố: Bắc Ninh, Hà Nội, Hà Tây.
41. *Chlaenius circumdatus* Brulle
Synonym: *Chlaenius cinctus* MacLeay
Chlaenius limbatus Dejean
Phân bố: Lạng Sơn, Hà Giang, Hòa Bình, Quảng Ninh, Vĩnh Phú, Hà Nội, Thanh Hóa, Đắc Lắc, Gia Lai, Kon Tum (Mai Quý và ctv, 1989; Lê Khương Thúy, 1989). Bổ sung: Bắc Ninh, Hà Tây.
42. *Chlaenius costiger* Chaudoir
Phân bố: Lạng Sơn, Hà Bắc, Hải Hưng, Vĩnh Phú, Thanh Hóa, Gia Lai, Kon Tum (Viện BVT, 1976; Lê Khương Thúy, 1989).
43. *Chlaenius culmunatus* Bates
Phân bố: Nghĩa Lộ, Nam Hà (Viện BVT, 1976).
44. *Chlaenius hamifer* Chaudoir
Phân bố: Hà Nội.
45. *Chlaenius inops* Chaudoir
Phân bố: Hà Nội, Hà Tây, Nam Hà, Hưng Yên, Thái Bình (Phạm Văn Lâm, 1991, 1997).
46. **Chlaenius leucopus* (Wiedemann)
Phân bố: Gia Lai
47. **Chlaenius micans* (Fabricius)
Phân bố: Hà Nội.
48. *Chlaenius naeviger* Morawitz
Phân bố: Lai Châu, Hà Giang, Tuyên Quang, Vĩnh Phú, Bắc Thái, Hà Bắc, Hà Tây, Hải Hưng, Thái Bình, Thanh Hóa (Viện BVT, 1976).
49. **Chlaenius nigricans* Wiedemann
Phân bố: Hòa Bình.
50. *Chlaenius noguchii* Bates
Phân bố: Lào Cai, Nghĩa Lộ, Hà Tây (Viện BVT, 1976; Lê Khương Thúy, 1989; Phạm Văn Lâm, 1997).
51. *Chlaenius pallipes* Gebler

Phân bố: Yên Bái, Lạng Sơn, Hà Giang, Hà Tây, Hải Hưng, Nam Hà, Ninh Bình, Thái Bình, Thanh Hóa, Vĩnh Phú (Viện BVT 1976; Lê Khương Thúy, 1989).

52. **Chlaenius praefetus* Bates
Phân bố: Hà Nội.
53. *Chlaenius posticalis* Motschulsky
Phân bố: Lai Châu, Nghĩa Lộ, Hà Giang, Quảng Ninh, Hòa Bình, Bắc Thái, Nam Hà, Thanh Hóa, Nghệ An, Gia Lai, Kon Tum (Mai Quý và ctv., 1981, Lê Khương Thúy 1989). Bổ sung: Bắc Ninh, Hà Nội, Hà Tây
54. **Chlaenius sericimicans* Chaudoir
Phân bố: Hòa Bình.
55. **Chlaenius (Callistoides) xanthospilus* Wiedemann
Phân bố: Nam Bộ (Cochinchine) [Missis Pavie, 1879-1895].
56. *Chlaenius xanthopleuris* Chaudoir
Synonym: *Chlaenius (Chlaeniostenus) xanthopleurus* Chaudoir
Phân bố: Nghĩa Lộ, Lạng Sơn, Lào Cai, Hòa Bình, Bắc Giang, Vĩnh Phúc, Hà Nội, Hà Tây, Hải Hưng, Hải Phòng, Nam Hà, Ninh Bình, Thái Bình, Thanh Hóa, Nghệ An, Tĩnh Giang (Viện BVT, 1976; Mai Quý và ctv 1981; Lê Khương Thúy, 1989; Phạm Văn Lâm, 1989, 1992b; Phạm Văn Lâm và ctv 1989).
57. **Hemichlaenius femoralis*
Phân bố: Hòa Bình.

Tộc Oodini

58. **Oodes* sp.
Phân bố: Bắc Giang, Quảng Ninh.
59. **Megaloodes politus* Lesne
Phân bố: Cao Bằng (Lê Khương Thúy 1989).
60. **Simous lucipus* Chaudoir
Phân bố: Trung Bộ [Mission Pavie, 187 1895].

Tộc Apotomini

61. **Apotomus* sp.
Phân bố: Gia Lai.

Tộc Lebiini

62. *Callida chloptera* Dejean

Phân bố: Yên Bái, Lạng Sơn, Bắc Thái, Hà Tây, Ninh Bình, Gia Lai, Kon Tum (Viện BVTV, 1976; Lê Khương Thúy, 1989).

63. *Callida splendidula* Fabricius

Synonym: *Carabus splendidulus* Fabricius

Lebia splendidulus Fabricius

Calceida splendidulus Fabricius

Calceida rubricata Motschulsky

Phân bố: Bắc Giang, Bắc Ninh, Gia Lai (Lê Khương Thúy, 1989).

64. *Catascopus fascialis* (Wiedemann)

Synonym: *Catascopus fascialis* (Wiedemann)
var *basalis* Chaudoir

Phân bố: Việt Nam (M. Chujo, 1960), Hà Tây, Gia Lai, Kon Tum (Viện BVTV, 1976; Lê Khương Thúy, 1989).

65. *Catascopus ignicinctus* Bates

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

66. **Callistominus* sp.

Phân bố: Gia Lai.

67. **Celeanephes parallelus* Schmidt-Goebel

Synonym: *Taromorpha alternata* Blackburn

Celoeneptes parallelus Schmidt-Goebel

Celeanephes rechingeri Csiki

Fukuchina sanadai Haba, 1960

Phân bố: Gia Lai.

68. **Coelostomus* sp.

Phân bố: Gia Lai.

69. *Helluomorpha* sp.

Phân bố: Lai Châu, Thái Bình (Viện BVTV, 1976; Phạm Văn Lắm, 1997).

70. **Hypolitus cyanellus* Bates

Phân bố: Việt Nam (M. Chujo, 1960 - 1962).

71. *Lachnocrepis japonica* Bates

Phân bố: Yên Bái, Bắc Giang, Hà Nội, Hà Tây, Hải Hưng, Hải Phòng, Thái Bình, Ninh Bình, Thanh Hóa (Viện BVTV, 1976; Phạm

Văn Lắm, 1989, 1992b, 1997; Phạm Văn Lắm và ctv. 1989).

72. *Lachnocrepis* sp.

Phân bố: Hòa Bình.

73. **Lesticus* sp.

Phân bố: Gia Lai.

74. **Pericalus* sp.

Phân bố: Ninh Bình.

75. *Lebia* sp₁

Phân bố: Cần Thơ (Viện BVTV, 1976; Phạm Văn Lắm, 1997).

76. *Lebia* sp₂

Phân bố: Cần Thơ (Viện BVTV, 1976; Phạm Văn Lắm, 1997).

77. **Dromius tetrapilotus* MacLeay

Phân bố: Việt Nam (M. Chujo, 1960-1962).

78. *Dromius* sp.

Phân bố: Gia Lai

79. **Philorhizus* sp.

Phân bố: Gia Lai

80. **Microlestes* sp.

Phân bố: Gia Lai

Tộc Masoreini

81. **Aephnidius adelioides* (MacLeay)

Synonym: *Anaulacus (Aephnidius)*
adeloides MacLeay

Masoreus sericeus Zimmermann

Masoreus adelioides MacLeay

Masoreus australia Sloane

Phân bố: Sơn La.

82. *Aephnidius* sp.

Phân bố: Phú Thọ.

83. **Mastax* sp.

Phân bố: Gia Lai.

Tộc Perigonini

84. **Perigona nigriceps* (Dejean)

Phân bố: Gia Lai

Tộc Odacanthini

85. *Eucolliuris fuscipennis* Chaudoir

Synonym: *Casnonia fuscipennis* Chaudoir

Casnonia flavicauda Bates

Casnonia litura Schmidt-Goebel

Colliuris fuscipennis Chaudoir

Arame flavicauda Chaudoir

Phân bố: Sơn La, Lào Cai, Yên Bái, Nghĩa Lộ, Quảng Ninh, Bắc Thái, Hà Nội, Hà Tây, Hải Hưng, Hải Phòng, Ninh Bình, Thái Bình, Nghệ An, Thừa Thiên-Huế, Quảng Ngãi, Bình Định, Phú Yên, Bà Rịa-Vũng Tàu, Đồng Nai, Long An, Tiền Giang (Viện BVTV, 1976; Lê Khương Thúy, 1989; Phạm Văn Lắm, 1989, 1991, 1997; Phạm Văn Lắm, và ctv., 1989).

86. **Eucolliuris litura* (Schmidt-Goebel)

Synonym: *Casnonia litura* Schmidt-Goebel

Colliuris (Eucolliuris) litura

Schmidt-Goebel

Arame litura Schmidt-Goebel

Phân bố: Hà Nội.

87. **Odacantha metallica* (Fairmaire)

Synonym: *Casnonia metallica* Fairmaire

Arame metallica Fairmaire:

Andrewer

Phân bố: Quảng Ninh, Bắc Thái, Hà Nội, Hà Tây, Hải Hưng, Thái Bình, Gia Lai, Kon Tum (Mai Quý và ctv., 1981; Phạm Văn Lắm, 1981, 1992b; Lê Khương Thúy, 1989).

88. **Mimocolliuris chaudi* (Boheman)

Synonym: *Ophionea chaudi* Boheman

Ophionea beaucheni Fairmaire

Colliuris chaudi Jakobson

Colliuris (Mimocolliuris)

chaudi Liebke

Phân bố: Hà Nội, Hà Tây, Hải Hưng, Thái Bình (Phạm Văn Lắm, 1991, 1992b, 1997).
Bổ sung: Quảng Ninh, Bắc Ninh, Hà Tây, Gia Lai.

89. *Archicolliuris bimaculata* (Redtenbacher)

Synonym: *Odacantha bimaculata*

Redtenbacher

Ophionea nigrofasciata Schmidt-

Goebel

Colliuris (Archicolliuris)

bimaculata Redtenbacher

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

90. *Ophionea indica* (Thunberg)

Synonym: *Attelabus indicus* Thunberg

Odacantha cyanocephala

Fabricius

Ophionea cyanocephala

Fabricius

Casnoidea indica Thunberg

Drypta japonica Bates

Phân bố: Yên Bái, Tuyên Quang, Hòa Bình, Quảng Ninh, Bắc Giang, Vĩnh Phúc, Hà Nội, Nam Hà, Ninh Bình, Thái Bình, Thanh Hóa, Thừa Thiên-Huế, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Quảng Ngãi, Bình Định, Phú Yên, Ninh Thuận, Bà Rịa-Vũng Tàu, Cần Thơ, Đồng Nai, Long An, Tiền Giang (Mai Quý và ctv., 1981; Phạm Văn Lắm, 1985, 1989, 1991a, 1992b, 1997; Lương Minh Châu, 1987, Lê Khương Thúy, 1989; Trung tâm BVTV, miền Trung (1992).

91. *Ophionea interstitialis* Schmidt-Goebel

Synonym: *Ophionea interstitialis* Anderwer

Ophionea interstitialis Liebke

Phân bố: Quảng Ninh, Bắc Giang, Hà Nội, Đắk Lắk, Gia Lai, Kon Tum (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989; Phạm Văn Lắm, 1991, 1997).
Bổ sung: Bắc Ninh, Hà Tây.

92. *Ophionea ishii* Habu

Phân bố: Tuyên Quang, Lào Cai, Lạng Sơn, Bắc Thái, Hà Nội, Hà Tây, Hải Hưng, Ninh Bình, Thái Bình, Nghệ An, Thừa Thiên-Huế, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Quảng Ngãi, Phú Yên, Bà Rịa-Vũng Tàu, Sông Bé, Tiền Giang (Lê Khương Thúy, 1989; Phạm Văn Lắm, 1989, 1991, 1992b, 1997; Phạm Văn Lắm và ctv., 1989).
Bổ sung: Bắc Ninh.

93. *Ophionea nigrofasciata* Schmidt-Goebel

Synonym: *Casnoidea nigrofasciata* Schmidt-Goebel.

Phân bố: Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Lâm Đồng, Đồng Nai (Lê Khương Thúy, 1989;

Phạm Văn Lâm, 1991, 1997).

Tộc Zuphiini

94. *Galerita japonica* (Bates)

Synonym: *Galeritella japonica* Bates
Galeritula japonica Bates

Phân bố: Hòa Bình, Thanh Hóa (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).

95. **Galerita orientalis* Schmidt-Goebel

Phân bố: Hòa Bình.

96. *Galeritulla peregrina* Kohm.

Phân bố: Hòa Bình (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).

97. *Planetes bimaculata* MacLeay

Phân bố: Hòa Bình, Đắk Lắk (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).

98. *Planetes puncticeps* Andrewer

Synonymy: *Planetes bimaculatus* MacLeay
Planetes puncticeps ab *japonicus*
Jedlicka

Phân bố: Vĩnh Phú (Mai Quý và ctv., 1981; Lê Khương Thúy, 1989).

99. **Heteroglossa* sp.

Phân bố: Gia Lai.

Tộc Hexagoniini

100. *Hexagonia longithorax* Wiedeman

Phân bố: Lai Châu, Thái Bình (Viện BVTV, 1976; Phạm Văn Lâm, 1997).

101. *Hexagonia terminata* Kirby

Synonym: *Trigonodactyla terminata* Dejean

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

102. *Hexagonia* sp.

Phân bố: Long An.

103. *Macrochilus trimaculus* Oliv.

Phân bố: Lai Châu, Ninh Bình.

104. *Macrochilus* sp.

Phân bố: Gia Lai.

105. *Colfax stevensi* Andrewer

Phân bố: Vĩnh Phú, Hà Tĩnh, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk (Lê Khương Thúy, 1989).

Tộc Orthogoniini

106. **Orthogonius* sp.

Phân bố: Vĩnh Phúc, Ninh Bình, Gia Lai, Kon Tum.

Tộc Dryptini

107. *Drypta japonica* Bates

Synonym: *Drypta lineola* Dejean var.
japonica Bates

Drypta lineola japonica Bates

Phân bố: Sơn La, Yên Bái, Lạng Sơn, Nghĩa Lộ, Quảng Ninh, Hòa Bình, Hà Giang, Bắc Thái, Vĩnh Phú, Hà Nội, Hà Tây, Thanh Hóa, Đồng Nai, Sông Bé, Tiền Giang (Viện BVTV, 1976; Mai Quý và ctv., 1981, Lê Khương Thúy, 1989; Phạm Văn Lâm, 1989, 1991, 1997; Phạm Văn Lâm và ctv., 1989).

108. *Drypta lineola virgata* Chaudoir

Synonym: *Drypta virgata* Chaudoir
Drypta lineola Dejean var.
virgata Chaudoir

Descrida virgata Chaudoir

Phân bố: Hà Giang, Lạng Sơn, Bắc Thái, (Phạm Văn Lâm, 1991, 1997). Bổ sung: Hà Nội, Hà Tây, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk.

109. *Desera geniculata* (Klug)

Synonym: *Dendrocellus flavipes*
Wiedemann

Dendrocellus geniculata:
Schmidt-Goebel

Dendrocellus rugicollis Chaudoir

Drypta dentata Rossi

Phân bố: Nghĩa Lộ, Lạng Sơn, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk (Lê Khương Thúy, 1989; Phạm Văn Lâm, 1992, 1997). Bổ sung: Hà Tây.

110. *Desera* sp.

Phân bố: Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Sông Bé (Lê Khương Thúy, 1989).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

Carabidae. London, Vol I, 323 tr.

3. **Habu A.**, 1967: Carabidae truncatipennis group (Insect: Coleoptera). Biogeographical Society of Japan, 338 tr.

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

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

6. Kết quả điều tra cơ bản côn trùng năm 1967-1968: Viện Bảo vệ thực vật, 1976.

7. **Phạm Văn Lâm**, 1997: Danh lục các loài sâu hại lúa và thiên địch của chúng ở Việt Nam. NXB NN, 165 tr.

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

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

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

12. **Mai Quý** và ctv., 1981: Kết quả điều tra cơ bản côn trùng miền Bắc Việt nam (1960-1970) NXB KIKT.

13. **Kasahara S.**, 1995: Occurrence of Onycholabis (Coleoptera, Carabidae) in Northern Vietnam. Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser A., 21(I): 27-32, March 22.

14. **Morita S. A.**, 1995: A new Species of the Genus Eobrosceus (Coleoptera, Carabidae) in Northern Vietnam. Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo Ser. A, 21(I): 7-11, March 22.

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

CHECKLIST OF THE FAMILY CARABIDAE (COLEOPTERA) IN VIETNAM PART II: SUBFAMILY HARPALINAE

LE KHUONG THUY

SUMMARY

This paper presents the check list of Carabid species found in Vietnam during the last years with 57 genera and 110 species. Among them, 37 genera with 32 species are new for Carabid fauna of Vietnam.

Ngày nhận bài: 16-6-1998

SỬ DỤNG KỸ THUẬT PCR-RAPD TRONG NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN Ở THỰC VẬT

TRẦN THỊ HÒA

Viện Di truyền Nông nghiệp

LUDWIG TRIEST

Trường đại học Tổng hợp Brussel, Vương quốc Bỉ

Theo Hamrick và Godt (1989) [1], có hơn 50% số loài thực vật biểu hiện tính đa hình (polymorphism). Việc sử dụng thực vật hoang dại và tính đa hình của chúng như một nguồn gen để cải tiến giống cây trồng đang là mục tiêu hàng đầu của nền nông nghiệp bền vững - hiện đại.

Ví dụ, ở Ôxtrâyli, các loại glycin bản địa chứa gen chống bệnh gỉ sắt lá cần cho việc bảo vệ cây thuộc họ Đậu, gen kháng bệnh vàng lá (cháy lá) từ *Hordium* hoang dại đã được sử dụng cho việc cải tiến giống lúa mạch v.v. [8].

Tuy nhiên nguồn gen này đang bị khai thác cạn kiệt bởi con người trong những năm gần đây. Sự mất mát đa dạng loài đã không thể được cân bằng bởi sự hình thành loài. Tốc độ của sự mất mát đang ở mức báo động: từ 20.000 loài trong năm 1985; 22.137-25.000 loài trong năm 1993 và có thể lên tới 40.000 loài vào những năm đầu của nửa thế kỷ tới [2, 3].

Việt Nam được ghi nhận là trung tâm của sự đa dạng về cây lúa trồng (*Oryza sativa* L.). Việc phát hiện, bảo tồn và sử dụng nguồn gen có lợi trong tự nhiên cho nông nghiệp vì một nền kinh tế bền vững, đang là một nhiệm vụ quan trọng trong thời gian hiện nay của nước ta.

Để nghiên cứu sự biến đổi về di truyền trong quần thể tự nhiên, các kỹ thuật dấu chuẩn phân tử (molecular markers) bao gồm các locus allozymes đã được sử dụng rộng rãi. Sự phát triển của những phân tích về ADN (ví dụ như RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random

Amplified Polymorphism ADN), SSR (Simple Sequence Repeats hay Microsatellite...) đã mở ra những nghiên cứu chi tiết hơn như phát hiện được những thay đổi nhỏ trong genom mà kỹ thuật isozymes không giải quyết được [6, 9]. Kỹ thuật khuếch đại ngẫu nhiên sự đa hình của ADN (RAPD) là kỹ thuật sử dụng những môi (primers) ngắn (~10 nucleotides) có trật tự tùy ý để khuếch đại ngẫu nhiên một vài trật tự duple thường của genom dựa trên phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Kỹ thuật này không cần định, được sử dụng trong nghiên cứu sinh học quần thể thực vật và có khả năng phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài và các nhóm loài, nhóm cá thể trong cùng một loài. RAPD đã rất thành công trong nghiên cứu di truyền quần thể ở động vật và đặc biệt là ở thực vật [7, 9, 10]. Kỹ thuật này đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu phát hiện và bảo tồn sự đa hình di truyền, đặc biệt những loài quý hiếm vì chỉ cần một lượng mẫu rất nhỏ.

Từ sự xem xét này, chúng ta thấy, trong nghiên cứu phát hiện, bảo vệ và sử dụng tính đa hình di truyền ở mức độ tối đa nhất thì những nghiên cứu về hình thái (những locus biểu thị về lượng), alen mã hóa cho enzym (allozymes hay isoenzymes) và các đoạn ADN (ví dụ RAPD), tất cả đều đóng vai trò quan trọng [7].

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chọn loài hoa Thủy tiên *Narcissus pseudonarcissus* L., một loài cỏ ven sông - rừng làm đối tượng nghiên cứu vì những đặc điểm sau:

* Công trình được sự tài trợ của Khoa hợp tác quốc tế và phát triển Trường Đại học Tổng hợp Bruxelles (Vương quốc Bỉ)

- Nó có kiểu sinh sản phức hợp: hữu tính (hạt) và vô tính (củ).

- Nó tồn tại như một liên quần thể (metapopulations) từ vài đến rất nhiều cá thể.

- Nó có thể tiếp tục tồn tại thành các nhóm cá thể cô lập trong rừng, thậm chí ở ngoài rừng.

- Loài thực vật này là đối tượng chịu ảnh hưởng của con người như bị co hẹp và mất vùng phân bố hay bị cô lập (gián tiếp) và bị cắt hoa vì mục đích kinh tế (trực tiếp), ngăn cản sự hình thành hạt.

Mẫu được thu từ 12 nhóm *Narcissus* đại diện cho 12 địa điểm khác nhau. Mẫu lá được rửa sạch, chuyển vào nitor lỏng và giữ ở lạnh sâu -70°C . Trong nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật PCR-RAPD.

ADN tinh khiết cho PCR được phân lập từ lá dựa theo protocol của Murray & Thompson (1980). Mẫu được nghiền trong cối sứ chứa nitor lỏng. Sau đó 5 ml chất đệm ADN (100 mM Tris pH = 8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1% PVPP, 1% betamercaptoethanol) được bổ sung vào chất chiết chứa ADN và ủ ở 65°C trong 20 phút. Sau 1 số lần li tâm và thay đổi, bổ sung hóa chất, cặn ADN được tinh sạch trong cồn 70% EtOH. 25 l hỗn hợp phản ứng chứa ADN mẫu, 5 picanol mỗi (có 10 gốc nucleotit), 100 μM d-NTP's và 1 unit Taq-polymera được phủ 2 giọt dầu khoáng và chuyển vào máy khuếch đại ADN (Thermojet

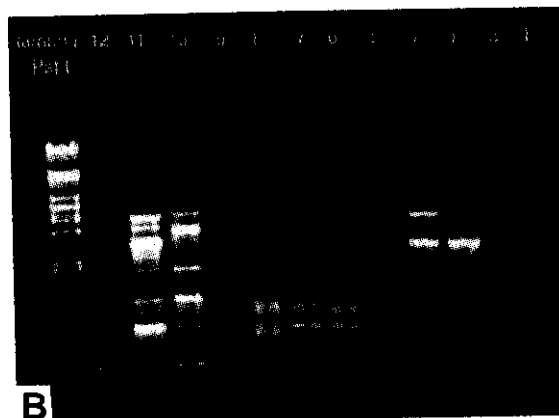
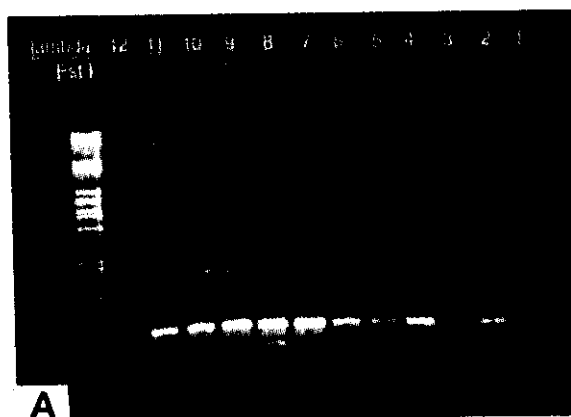
thermocycler-Euro-Getec) theo chương trình sau: 1 chu kỳ 2 phút 94° ; 40 chu kỳ 45 giây 92° , 1 phút 36°C , 2 phút 72°C ; 1 chu kỳ 5 phút 72°C . Sản phẩm khuếch đại ADN được đưa vào điện di trong gels agaró 1% nhuộm ethidium bromit. Đọc băng trên gels dưới ánh sáng tia cực tím (UV light) và chụp ảnh bằng máy Polaroid. 12 primers (trong số 35 primers được thử) đã sử dụng cho nghiên cứu là: OPA-12; OPA-7; OPA-17; OPA-19; OPE-1; OPE-9; OPJ-6; OPJ-13; OPO-10; OPO-15; OPT-7; OPT-15.

Xử lý số liệu: sử dụng chương trình NTSYS-PC [5].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Sản phẩm khuếch đại RAPD:

Kết quả được trình bày ở hình 1. Kỹ thuật đã cho phép ghi nhận một số lớn băng (locus). Ở mẫu đối chứng (không có ADN) luôn không xuất hiện băng. Số primer sử dụng cho *Narcissus*, số locus và số băng/locus/primer được liệt kê ở bảng 1. Trong số 35 primers kiểm tra, chỉ có 12 primers đủ tin cậy cho việc khuếch đại ADN của *Narcissus*. Đã thu được 19 sản phẩm khuếch đại khác nhau. 19 băng được chọn cho xử lý số liệu có trọng lượng phân tử dao động từ ~594 bp đến 1.700 bp (1 kb = 1000 bp). Mỗi cá thể *Narcissus* có thể sản sinh từ 0 - 9 băng/primer với trung bình là 2,8 băng. Mỗi cá thể cho các băng khác nhau.



Hình 1. Sản phẩm khuếch đại RAPD của ADN phân lập từ *N. pseudonarcissus* với OPE-1 (A) và OPE-9 (B) (Vạch 1-11). Vạch 12: Mẫu không chứa ADN. Vạch 13: Phase lamda AND gắn với Pst-1

2. Khoảng cách di truyền:

Các mẫu từ 12 quần thể đã đại diện cho 5 địa điểm mang những đặc điểm sinh thái, địa lý khác nhau và chịu tác động khác nhau từ môi trường - con người: Hallerbos, Huizingen, Raspaljebos, Moerlekebos và Zonienbos.

Những phân tích "UPG MA Cluster" đã cho thấy có 3 nhóm cá thể tách biệt nhau về mặt di truyền. Đó là: A-C-P-B, D-G, F-H-I.

Trong từng nhóm, quần thể có khoảng cách di truyền xa nhất so với quần thể còn lại là quần thể I thuộc nhóm F-H-I ($D = 0,840$); quần thể D thuộc nhóm D-G ($D = 0,600$) và quần thể P thuộc nhóm A-C-B-P ($D = 0,737$). Khoảng cách di truyền trung bình tính được khi phân tích các locus RAPD liên quan một cách có ý nghĩa với khoảng cách về địa lý gợi ý rằng sự phân chia quần thể thành các quần thể nhỏ hơn (subpopulations) đã luôn xảy ra do giảm dòng gen giữa chúng.

Bảng 1

Số primer sử dụng để khuếch đại ADN của *Narcissus* và số sản phẩm được khuếch đại (băng hoặc locus) từ một primer

Primer	Trình tự nucleotit theo hướng 5'-3'	Số băng nghiên cứu	Kích thước băng trung bình (kb)
OPA-2	TGCCGAGCTG	02	0,809-1,159
OPA-7	GAAACGGGTG	02	0,514-0,809
OPA-17	GACCGCTTGC	02	0,809-1,159
OPA-19	CAAACGTCGG	02	0,809-1,159
OPE-1	CCCAAGGTCC	01	0,514-0,809
OPE-9	CTTCACCCGA	02	0,809-1,700
OPJ-6	TCGTTCCGCA	01	1,159-1,700
OPJ-13	CCACACTACC	02	0,809-1,093
OPO-10	TCAGAGCGCC	01	1,159-1,700
OPO-15	TGGCGTCCTT	02	0,809-1,700
OPT-7	GGCAGGCTGT	02	0,809-1,159
OPT-15	GGATGCCACT	01	1,093-1,159
Tổng số:		19	

Các cluster chính đã đại diện cho rừng Hallerbos (quần thể A, B, C). Quần thể P tạo nên một cluster từ những cá thể xa nhau về mặt di truyền (ví dụ, A-P có $D = 0,737$) (bảng 2, hình 2) và lý do địa lý (Hallerbos cách Moerlekebos 25 km). Xét về giá trị D có thể dễ nhận thấy rằng quần thể I gần với nhóm G-D và quần thể D gần với nhóm A-B-C (hình 2, bảng 2).

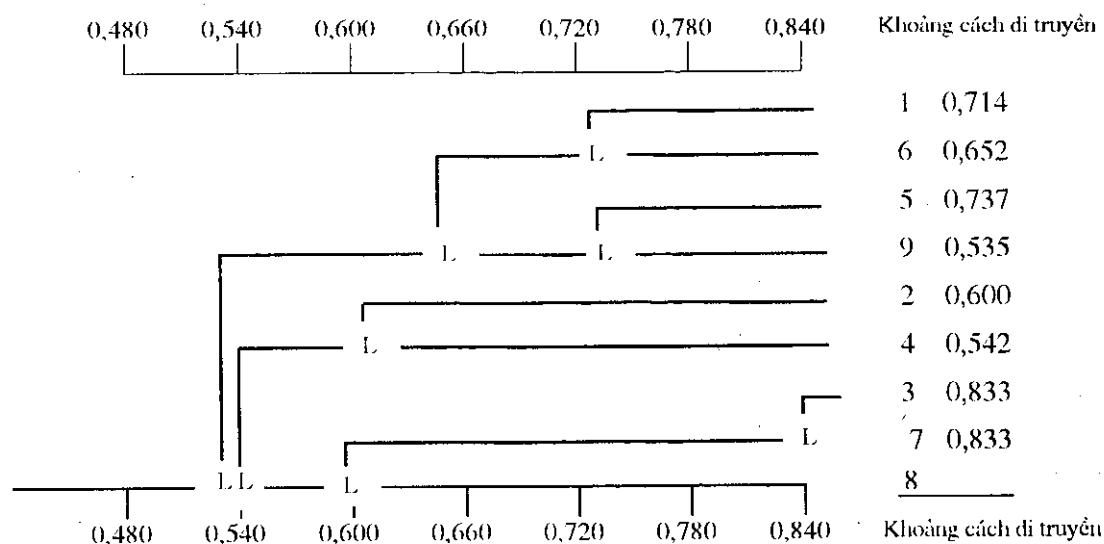
Trục PCOORDA thứ nhất đã giải thích 66,6% sự thay đổi các điểm (quần thể), đồng thời đại diện cho 2 nhóm cá thể thuộc Hallerbos (A-B-C-D) và Huizingen+Hallerbos (G-I) (hình 3). Những phân tích PCOORDA đã cung cấp những thông tin khá rõ về vấn đề địa lý và những biến đổi đột ngột của môi trường đến quần thể *Narcissus*.

Những thông tin thu được từ phân tích UPGMA-cluster phù hợp với những dữ liệu khi phân tích mặt tọa độ (principal coordinate hay PCOORDA).

Hệ số khoảng cách di truyền giữa các quần thể dựa trên số liệu RAPD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1,000								
2	0,538	1,000							
3	0,600	0,571	1,000						
4	0,462	0,600	0,538	1,000					
5	0,625	0,667	0,611	0,500	1,000				
6	0,714	0,538	0,625	0,500	0,647	1,000			
7	0,563	0,533	0,833	0,571	0,737	0,471	1,000		
8	0,438	0,467	0,611	0,571	0,316	0,529	0,579	1,000	
9	0,688	0,600	0,444	0,500	0,737	0,647	0,579	0,474	1,000

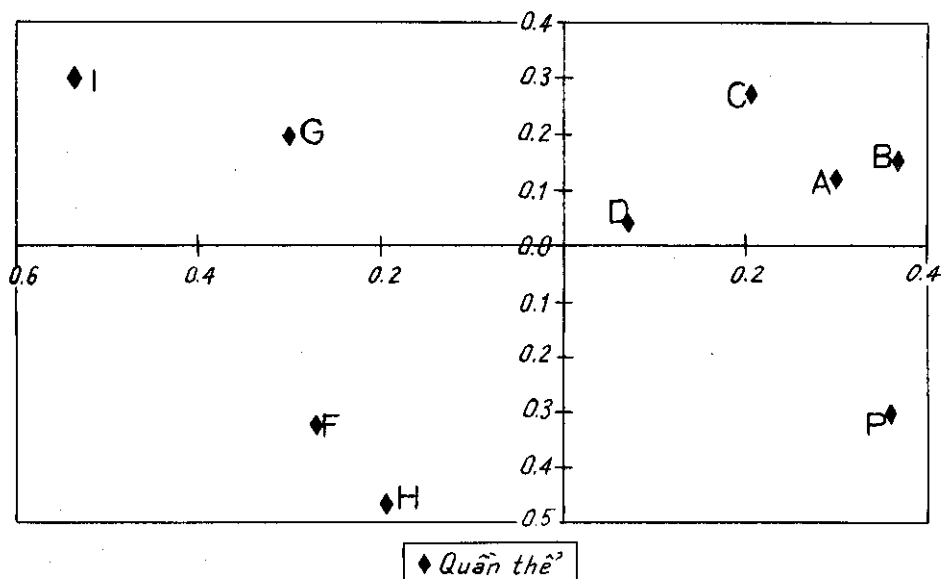
Ghi chú: 1- Quần thể A(A); 2-(D); 3-(F); 4-(G); 5-(P); 6-(C); 7-(H); 8-(I); 9-(B).



Hình 2. Sơ đồ phân tích mối quan hệ di truyền (UPGMA clustering) ở *N.pseudonarcissus* (19 locus)

Ghi chú: 1- Quần thể A(A); 2-(D); 3-(F); 4-(G); 5-(P); 6-(C); 7-(H); 8-(I); 9-(B).

Dấu hiệu của sự đa dạng di truyền nhận được từ sự phân tích RAPDs đã cho thấy rằng không nên coi quần thể thực vật như một đơn vị lớn độc lập (panmictic) khi nghiên cứu cấu trúc di truyền quần thể mà phải nghiên cứu nó trong mối quan hệ với những quần thể khác xung quanh (metapopulations). Điều này cũng phù hợp khi áp dụng cho những loài thực vật khác có hệ sinh sản thụ phấn ngoài vì mức độ đa hình di truyền ở những loài này cao hơn hẳn những loài tự thụ phấn.



Hình 3. Phân tích mặt phẳng tọa độ dựa trên số liệu của *N. pseudonarcissus* L. (19 locus)

III. KẾT LUẬN

Khoảng cách di truyền trung bình tính được khi phân tích các locus RAPD liên quan một cách có ý nghĩa với khoảng cách về địa lý: khoảng cách di truyền (KCDT) $D = 0,840$ (nhóm quần thể F-H-I) giữa Hallerbos và Huizingen có khoảng cách địa lý là 37,15 km, trong khi đó KCDT $D = 0,737$ (nhóm quần thể A-C-B-P) giữa Hallerbos và Moerlekebos có khoảng cách địa lý là 25 km. Điều đó gợi ý rằng sự phân chia quần thể thành các quần thể nhỏ hơn (subpopulations) luôn xảy ra do giảm dòng gen giữa chúng.

Những số liệu về RAPD tỏ ra có lợi khi xác nhận mối quan hệ di truyền giữa các nhóm cá thể của quần thể và giữa các quần thể của *Narcissus* (ví dụ ở mức độ các khu rừng). Tuy nhiên kỹ thuật RAPD cũng có thể được áp dụng trong lai tạo và chọn giống, đặc biệt đối với những loài thực vật có mức độ đa hình di truyền ADN cao như lúa, đậu đỗ (*Vigna* spp.) để xác định mối quan hệ di truyền giữa các cá thể bố mẹ trước khi tiến hành lai tạo. Dữ liệu về RAPD cũng có thể ứng dụng trong phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài cây trồng bản địa và họ hàng hoang dại của chúng trong công tác bảo tồn các loài cây trồng quý hiếm tại chỗ (*in-situ conservation*).

Những nghiên cứu về hình thái học (locus biểu thị về lượng), biến động quần thể và các đoạn ADN (ví dụ RAPD), tất cả đều quan trọng khi nghiên cứu phát hiện, bảo tồn và sử dụng thực vật hoang dại và đa hình di truyền của chúng như một nguồn gen cho việc cải tiến-chọn tạo giống cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hamrick J. L. and Godt M., 1989: Allozyme diversity in plant species. In Brown, A., Clegg, M. Kahler, A. & Weir, B. (eds). Genetic relationship and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genom*, 36: 43-49.
2. IUCN/WWF, 1984: Plant conservation program 1984-1985. WWF, Publ. UK.
3. IUCN, WHO and WWF, 1993: Guidelines on the conservation of medical plants. Switzerland.
4. Murray M. and Thompson W., 1980: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.*, 8: 4321-432.
5. Rolhf J., 1993: NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariable analysis system version 1.80. Exeter software, Applied

Biostatistics Inc., New York.

6. Seitz A. and Loeschke V., 1991: Species conservation: A population-Biological approach, Birkhouser Verlag, Switzerland
Rohlf, J., 1993. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 1.80. Exeter software. Applied Biostatistics Inc., New York.

7. Triest D., De Graff B., De Bondt R., Vanden Bossche D., D'haeseleer M., Van Slycken J. and Coart E., 1997: Use of RAPD markers to estimate hybridization in *Salix alba* and *Salix fragilis*. Belg. J. Bot., 129(2): 140-

148.

8. URL: http://www.environment.gov.au/life/end_vuln/general/strategy.html. (29.11.96).

9. Vekemans X. and Jacquemart A. L. 1997: Perspectives on the use of molecular markers in plant population biology. Belg Journ. Bot 129(2): 91-100.

10. Williams J., et al., 1990: DNA polymorphism amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

RESEARCH ON PLANT GENETIC POLYMORPHISM USING PCR-RAPD TECHNIQUE

TRAN THI HOA, L. TRIEST

SUMMARY

The assessment of the genetic structuring of populations can be achieved through the use of co-dominant markers such as allozymes (allelic forms of enzymes obtained after electrophoresis) and of dominant markers such as at random amplified polymorphic pieces (RAPD). Application of molecular fragments of populations of plants from 5 different forests in Belgium.

The survey was conducted on leaves collected from 372 individuals in 12 populations.

The genetic variation within and among these 12 populations of *N.pseudonarcissus* L. was estimated by RAPD loci.

From UPGMA cluster analysis, it was evident three groups of individuals. The least similar population was population F for group F-H-I ($D = 0.8330$); population D for group D-G ($D = 0.600$); population P for group A-C-B-P ($D = 0.737$). The major clusters correspond to Hallerbos forest (population A, B, C). Population P considered separate clusters of genetically deviating individuals within the group due to D ($D = 0.737$) and the effect of geographical reason. This analysis provided a good fit to the data, as obtained by the principal coordinate analysis (PCORDA). The PCORDA analysis provided fairly good agreement considering information about geography and environmental stress.

Ngày nhận bài: 26-8-1998

NATIONAL CENTRE FOR NATURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY OF VIETNAM
JOURNAL OF BIOLOGY
VOLUME 22 - NUMBER 2
6 - 2000

CONTENTS

	<i>Pages</i>
1 HO THU CUC : The frog genus <i>Leptobrachium</i> (Anura, Megophryidae in Vietnam.	1-5
2 NGUYEN THI NGAN et al. : <i>Leptospira</i> on man and on domestic animals in the North Vietnam.	6-10
3 LE GIA HY et al. : Alkaliphilic microbial strains isolated in Vietnam and taxonomic characteristics of the alkaliphilic <i>Streptomyces</i> strain CD 2-1 producing the alkaline enzyme.	11-17
4 NGUYEN THI KIM CUC, PHAM VIET CUONG : Selection cellulose degrading microorganisms isolated from coffee waste and sugar plantation of Taynguyen and some their properties.	18-24
5 HOANG THI MINH HIEN et al. : Genetic variability of <i>Gracilaria</i> species (Red algae) sampled from Truongsa archipelago area Vietnam.	24-28
6 NGUYEN THI THANH HUYEN et al. : Construction of the gene bank for cloning the promoters of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	29-33
7 VU NGOC PHUONG et al. : Micropropagation of Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.) by tissue culture.	34-39
8 DO TUYET NGA et al. : Primary study about the PSP toxin in some bivalve species collected at the coas water of Nhatrang and Phanthiet cities.	40-45
9 NGUYEN THI HAI YEN, TRAN DUY NGA : Primary research about the influence of the philatov product on the odult process of the sea crab species <i>Scylla serrata</i> (Forsk.).	46-51
10 LE KHUONG THUY : Checklist of the family Carabidae (Coleoptera) in Vietnam. Part II: Subfamily Harpalinae.	52-28
11 TRAN THI HOA, L. TRIEST : Research on plant genetic polymorphism using PCR-RAPD technique.	59-64

TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
TẠP CHÍ SINH HỌC
TẬP 22 - SỐ 2
6 - 2000

MỤC LỤC

		Trang
1 HỒ THU CÚC	: Giống cóc mây <i>Leptobrachium</i> (Anura, Megophryidae) ở Việt Nam.	1-5
2 NGUYỄN THỊ NGÂN và cộng sự	: Các chủng xoắn khuẩn ở người và gia súc tại miền Bắc Việt Nam.	6-10
3 LÊ GIA HY và cộng sự	: Vi sinh vật ưa kiềm và đặc điểm phân loại của chủng xạ khuẩn ưa kiềm CD 2-1 sinh enzym chịu kiềm phân lập được ở Việt Nam.	11-17
4 NGUYỄN THỊ KIM CÚC, PHẠM VIỆT CUỒNG	: Tuyển chọn và nghiên cứu một số tính chất của các chủng vi sinh vật phân giải xenlulo phân lập từ vỏ cà phê, đất trồng mía ở Tây Nguyên.	18-24
5 HOÀNG THỊ MINH HIỀN và cộng sự	: Tính đa dạng di truyền của các loài rong câu (<i>Gracilaria</i>) ở vùng quần đảo Trường Sa.	24-28
6 NGUYỄN THỊ THANH HUYỀN và cộng sự	: Xây dựng ngân hàng gen để phân lập các promoter của nấm men <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	29-33
7 VŨ NGỌC PHƯỢNG và cộng sự	: Nhân giống vô tính cây xoan Ấn Độ (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.) bằng nuôi cấy mô.	34-39
8 ĐỖ TUYẾT NGÀ và cộng sự	: Nghiên cứu bước đầu về độc tố PSP trong một số loài hai mảnh vùng biển Nha Trang và Phan Thiết.	40-45
9 NGUYỄN THỊ HẢI YẾN, TRẦN DUY NGÀ	: Bước đầu thăm dò ảnh hưởng của chế phẩm phylatop lên sự phát dục của loài cua biển <i>Scylla serrata</i> (Forskall).	46-51
10 LÊ KHUÔNG THÚY	: Danh lục các loài côn trùng cánh cứng chân chạy thuộc họ Carabidae (Coleoptera) ở Việt Nam. Phần II: Phân họ Hapthalinae.	52-28
11 TRẦN THỊ HÒA, LUDWIG TRIEST	: Sử dụng kỹ thuật PCR-RAPD trong nghiên cứu tính đa dạng di truyền ở thực vật.	59-64