

$$f(x) + \sqrt{\varepsilon} \|x - y\| \geq f(y), \forall x \in A, \forall (y, \lambda) \in F. \quad (3.4)$$

Proof. Let x and (y, λ) be the feasible points of (P) and (MD), respectively. Since $0 \in \partial^c f(y) + \sum_{t \in T} \lambda_t \partial^c f_t(y) + N(C, y) + \sqrt{\varepsilon} B^*$, there exist $u \in \partial^c f(y), u_t \in \partial^c f_t(y), t \in T, v \in B^*$ and $w \in N(C, y)$ such that

$$u(x - y) + \sum_{t \in T} \lambda_t u_t(x - y) + \sqrt{\varepsilon} v(x - y) = -w(x - y) \geq 0, \forall x \in C. \quad (3.5)$$

As $x \in A$, we have $f_t(x) \leq 0$ for all $t \in T$. Since $\lambda_t f_t(y) \geq 0$ for all $t \in T$, it derives $f_t(x) \leq f_t(y)$ for all $t \in T(\lambda)$. Using a property of semiconvex function, we deduce that $u_t(x - y) \leq f'_t(y; x - y) \leq 0$ for all $t \in T(\lambda)$. So, this and (3.5) imply that

$$u(x - y) + \sqrt{\varepsilon} \|x - y\| \geq 0.$$

The conclusion follows since f is ε -semiconvex on C . \square

Theorem 3.6 For the problem (P), suppose that C is convex, $f, f_t, t \in T$, are regular on C , and for each $\lambda \in R_+^{(T)}$, $L(\cdot, \lambda)$ is ε -semiconvex on C . Then ε -weak duality between (P) and (MD) holds.

Proof. Let x and (y, λ) be the feasible points of (P) and (MD), respectively. Using a similar argument of the proof of the theorem above, there exist $u \in \partial^c f(y), u_t \in \partial^c f_t(y), t \in T$ such that

$$u(x - y) + \sum_{t \in T} \lambda_t u_t(x - y) + \sqrt{\varepsilon} \|x - y\| \geq 0, \forall x \in C.$$

Since $f, f_t, t \in T$, are regular on C , it follows that

$$L(\cdot, \lambda)(y; x - y) + \sqrt{\varepsilon} \|x - y\| \geq 0, \forall x \in C.$$

Since $L(\cdot, \lambda)$ is ε -semiconvex on C then $L(x, \lambda) + \sqrt{\varepsilon} \|x - y\| \geq L(y, \lambda)$, i.e.,

$$f(x) + \sum_{t \in T} \lambda_t f_t(x) + \sqrt{\varepsilon} \|x - y\| \geq f(y) + \sum_{t \in T} \lambda_t f_t(y).$$

The desired result follows by $f_t(x) \leq 0$ and $\lambda_t f_t(y) \geq 0$ for all $t \in T$. \square

Remark. In the two theorems above, as $x \in A_\varepsilon$, the inequality (3.4) holds if we assume that $f_t(x) \leq f_t(y)$ for all $t \in T(\lambda)$.

The following corollary is a consequence of the previous theorems.

Corollary 3.1 Assume that at least one of the following statements are satisfied:

a) f is ε -semiconvex on C and $f_t, t \in T$, are semiconvex on C ;

b) $f, f_t, t \in T$, are regular on C and for every $\lambda \in R_+^{(T)}$, $L(\cdot, \lambda)$ is ε -semiconvex on C ;

Then, for every feasible point (z, λ) of (MD),

(i) if $z \in A_\varepsilon$ then z is an almost ε -quasisolution of (P);

(ii) if $z \in A$ then z is an ε -quasisolution of (P).

ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU CHO HẦU TỰA ε -NGHIỆM CỦA BÀI TOÁN TỐI ƯU KHÔNG LỖI CÓ VÔ HẠN RÀNG BUỘC

Trần Văn Thạch⁽¹⁾, Tạ Quang Sơn⁽²⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

(2) Trường Đại học Nha Trang

TÓM TẮT: Dựa trên điều kiện Karush-Kuhn-Tucker suy rộng chính xác đến ε , chúng tôi thiết lập một số điều kiện đủ tối ưu cho các hầu tựa ε -nghiệm của bài toán qui hoạch không lỗi có vô hạn ràng buộc. Một số kết quả về ε -đối ngẫu yếu dạng Mond-Weir cho bài toán cũng được giới thiệu.

REFERENCES

- [1] F.H. Clarke, Optimization and non smooth analysis, *Wiley-Interscience*, New York (1983).
- [2] J. Dutta, Necessary optimality conditions and saddle points for approximate optimization in Banach spaces, *TOP*, 13, 127-143 (2005).
- [3] N. Dinh, T.Q. Son, Approximate optimality condition and duality for convex infinite programming problems, *J. Science and Technology Development*, 10, 29-38 (2007).
- [4] S.S. Kutateladze, Convex ε -programming, *Soviet Math Doklady*, 20, 391-393 (1979).
- [5] P.J. Laurent, Approximation et Optimization, Hermann, Paris, 1972.
- [6] P. Loridan, Necessary conditions for ε -optimality, *Math. Program. Study*, 19, 140-152 (1982).
- [7] J.C. Liu, ε -Duality theorem of nondifferentiable nonconvex multiobjective programming, *J. Optim. Theory Appl.*, 69, 153-167 (1991).
- [8] R. Mifflin, Semismooth and semiconvex functions in constrained optimization,

- SIAM J. Control Optim.*, 15, 959-972 (1977).
- [9] A. Hamel, An ε -lagrange multiplier rule for a mathematical programming problem on banach spaces, *Optimization*, 49, 137-149 (2001).
- [10] J.J. Strodiot, V.H. Nguyen, N. Heukemes, ε -Optimal solutions in nondifferentiable convex programming and some related questions, *Math. Programming*, 25, 307-328 (1983).
- [11] C. Scovel, D. Hush, I. Steinwart, Approximate Duality, Los Alamos National Laboratory, *Technical Report La-UR,05-6755* (2005).
- [12] T.Q. Son, N. Dinh, Characterizations of optimal solution sets of convex infinite programs, *TOP*, 16, 147-163 (2008).
- [13] T.Q. Son, J.J. Strodiot, V.H. Nguyen, ε -Optimality and ε -lagrangian duality for a nonconvex programming problem with an infinite number of constraints, *J. Optim. Theory Appl.*, 141, 389-409 (2009).
- [14] K. Yokoyama, ε -Optimality criteria for convex programming problems via exact penalty functions, *Math. Programming*, 56, 233-243 (1992).

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KÍCH THÍCH TÍNH KHÁNG MỘT SỐ VIRUS GÂY BỆNH TRÊN CÂY HỒ TIÊU (*Piper nigrum*) NUÔI *IN VITRO* NHỜ GLYCOPROTEIN CÓ NGUỒN GỐC TỪ CÂY SÂM NAM (*Boerhavia diffusa*)

Bùi Đình Thạch, Vũ Văn Độ, Trịnh Ngọc Đức, Ngô Kế Sương

Viện sinh học nhiệt đới

(Bài nhận ngày 19 tháng 5 năm 2012, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 13 tháng 9 năm 2012)

TÓM TẮT: Chúng tôi khảo sát khả năng kích thích tính kháng virus ở thực vật nhờ glycoprotein từ cây Sâm nam nhằm mục đích ứng dụng nguồn nguyên liệu này để ngăn ngừa các bệnh do virus gây ra cho cây trồng và góp phần hạn chế sử dụng các thuốc hóa học. Kết quả nhận được: Sâm nam có chứa glycoprotein có trọng lượng phân tử 30.200 Da, với hàm lượng 1 mg/100 g TLK; glycoprotein nồng độ 40 µg/100ml có khả năng kích thích tính kháng virus (CMV và TMV) ở cây Hồ tiêu nuôi *in vitro*.

MỞ ĐẦU

Sâm nam (*Boerhavia diffusa*) thuộc họ Nyctaginaceae, gồm hơn 40 loài. Cây được phân bố rộng ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới [12].

Trong hệ thống y học Ấn Độ cổ đại, rễ của cây Sâm nam dùng trị bệnh khó tiêu, bệnh vàng da, sự lớn của lá lách, đau bụng [15] và được xem như một nhân tố kháng stress. Sâm nam được sử dụng rộng khắp thế giới để trị rối loạn thận và có đặc tính kháng tổn thương ở gan.

Cây Sâm nam chứa một lượng lớn các hợp chất như flavonoid, alkaloid, steroid, triterpenoid, lipid, lignin, carbohydrate, protein [2, 9, 20], boeravinone A.F [14, 16], hypoxanthine 9-L-arabinofuranosid [3], acid ursolic, punarnavosid [13], liirodendrin [1] và glycoprotein [22].

Trong những năm gần đây, Sâm nam được chú ý với hoạt tính kích thích tính kháng virus

ở thực vật. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy dịch ly trích từ rễ của cây Sâm nam cung cấp cho cây trồng trước khi ủ/nhiễm virus sẽ kích thích cây trồng kháng lại một số virus [8, 19, 21]. Nhân tố kháng virus căn bản là glycoprotein có trọng lượng phân tử khoảng 30 kDa [18], chịu được nhiệt độ cao [21]. Glycoprotein biểu hiện chức năng như phân tử tín hiệu trong việc kích thích hệ thống kháng của thực vật chống lại virus như virus gây bệnh vàng lá ở Cà chua [7], virus đốm vàng ở cây Đu đủ [5], virus gây thể khảm xanh ở Dưa chuột [8], virus đốm vàng ở cây Đậu [5], virus gây thể khảm ở cây Đậu [19], virus gây thể khảm ở Chanh [6] và virus ở cây Thuốc lá [18].

Nhằm góp phần nghiên cứu vai trò kích thích tính kháng virus của glycoprotein từ cây Sâm nam trên cây trồng, chúng tôi tiến hành đề tài: “Khảo sát hoạt tính kích thích tính kháng một số virus gây bệnh trên cây Hồ tiêu (*Piper nigrum*) nuôi *in vitro* nhờ glycoprotein có

nguồn gốc từ cây Sâm nam (*Boerhavia diffusa*)”

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây Hồ tiêu nuôi *in vitro* sạch virus (Phòng CNTBT- Viện SHND cung cấp).

Cây Hồ tiêu trồng ngoài tự nhiên (huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai)-nguồn virus gây bệnh.

Cây Sâm nam mọc tự nhiên (Phú Yên), thu hoạch vào mùa nắng (tháng 06 âm lịch), mẫu được định danh và đối chiếu với bộ tiêu bản chuẩn Việt Nam được lưu giữ ở Bảo tàng thực vật Viện Sinh học Nhiệt đới.

Phương pháp

Xác định mẫu Hồ tiêu nhiễm virus TMV (*Tobacco Mosaic Virus*), CMV (*cucumber mosaic virus*), ToMV (*Tomato mosaic virus*) bằng phương pháp ELISA [10]

Mẫu được thu thập tại các vườn trồng Hồ tiêu thuộc 2 xã Suối Nho và Phú Túc huyện Định Quán tỉnh Đồng Nai thông qua các triệu chứng gây bệnh của virus [11].

Các bước tiến hành

- Ủ với antibody:

Kháng thể bất kháng nguyên được pha loãng trong buffer (tỷ lệ antibody: buffer 1:500). Kháng thể của từng loại virus được bơm 100 μ l vào từng giếng của đĩa 96 giếng theo Bảng 5. Đĩa kháng thể bất kháng nguyên được ủ ở 37°C trong 3 giờ. Sau đó được rửa với buffer PBS bằng máy rửa.

- Ủ với mẫu:

Mẫu được nghiền trong buffer ly trích với tỉ lệ 1:25, ly tâm lạnh. Phần dịch nổi bên trên được bơm 100 μ l vào từng giếng theo bảng 5. Đối chứng dương của từng virus cũng được bơm vào giếng tương ứng. Đĩa mẫu được ủ ở 37°C trong 3 giờ. Sau đó được rửa với buffer PBS bằng máy rửa.

- Ủ với kháng thể liên kết enzym:

Tiếp tục bơm 100 μ l kháng thể liên kết enzym (tỷ lệ antibody : buffer 1:500) của từng virus vào các giếng theo Bảng 5. Đĩa kháng thể được ủ ở 37°C trong 3 giờ. Sau đó được rửa với buffer PBS bằng máy rửa.

- Ủ với cơ chất tạo màu:

Cơ chất tạo màu pNPP (dinatri p-nitrophenyl phosphate) được hoà tan trong buffer cơ chất (tỷ lệ 0,01 g : 10 ml). Lần lượt bơm 100 μ l dung dịch trên vào tất cả các giếng. Ủ tối ở nhiệt độ phòng. Xác định kết quả dựa trên chỉ số OD (405 nm).

Ly trích virus

Mẫu lá Hồ tiêu sau khi xác định nhiễm bệnh do virus được chuẩn bị: 5 g lá Hồ tiêu được nghiền trong cối sứ với 10 ml nước cất để phá vỡ tế bào phóng thích virus ra ngoài. Sau đó thêm 15 ml nước cất vào, khuấy đều và lọc qua vải để loại cặn. Phần dịch loãng sau đó sẽ được ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Thu phần dịch nổi bên trên bảo quản ở -20°C làm nguồn lây nhiễm virus.

Thu nhận, tách chiết và kiểm tra glycoprotein từ cây Sâm nam ngoài tự nhiên [22]

Rễ Sâm nam rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 50°C và nghiền mịn. Bột rễ cây Sâm nam được ngâm trong dung dịch natri acetat 0,02 M; pH= 5,2 với tỷ lệ bột rễ/dung dịch natri acetat = 1/5 (w/v) và ủ ở 40°C trong 12 giờ. Sau 12 giờ thêm mercaptoethanol vào với tỷ lệ 0,1% (w/v) và đem ủ ở 40°C trong 12 giờ. Hỗn hợp sau đó được lọc qua phin lọc (đường kính 0,1 mm), dịch thu được sau khi lọc được ly tâm loại cận ở tốc độ 8000 v/p trong 20 phút ở 40°C. Tủa protein trong phần dịch nổi thu được sau ly tâm bằng sunphat amon với tỷ lệ 60% (w/v) và ủ ở 40°C trong 4 - 5 giờ. Sau đó ly tâm ở tốc độ 8000 v/p trong 10 phút ở 40°C thu kết tủa. Sấy kết tủa bằng thiết bị sấy hút chân không ở 400°C. Hòa tan protein thô trong một lượng vừa đủ natri acetat 0,02 M; pH = 5,2. Dung dịch này được lọc qua cột Sephadex G-25 thu dịch protein tinh sạch dùng trong các thí nghiệm sau.

Tinh sạch protein bằng sắc ký lọc gel

- Chuẩn bị cột sắc ký:

Sử dụng cột sắc ký Bio - Rad, kích thước 50 x 2,6 cm. Cho bột gel Sephadex G-25 vào dung dịch đệm Natri acetat 20 mM (pH 5,2), để

yên trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Rót đều dung dịch gel vào cột thành một dòng di chuyển nhẹ. Khi cột đã được nạp đầy gel, khóa đầu ra của cột và gắn adaptor vào. Cho chạy máy sắc ký để ổn định cột bằng đệm natri acetat có chứa mercaptoethanol và natri azid với lượng đệm chạy bằng 2 - 3 lần thể tích cột. Nạp mẫu vào trên bề mặt lớp nền gel qua adaptor. Chuẩn bị mẫu: mẫu hòa tan hoàn toàn trong dung dịch đệm natri acetat 20 mM; pH 5,2. Lọc mẫu qua màng lọc 0,45 µm. Dùng xylanh hút mẫu, bơm mẫu vào hệ thống sắc ký, dịch ra khỏi cột được đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm bằng detector trong hệ thống sắc ký và được thể hiện độ hấp thụ dưới dạng sắc ký đồ bằng phần mềm LP-Data View trên máy tính. Dịch được thu tự động bằng máy thu mẫu (collector). Thu các phân đoạn chứa dịch protein đã tinh sạch qua sắc ký lọc gel, tiến hành xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry. Xác định hiệu suất quá trình tinh sạch bằng hệ thống sắc ký lọc gel:

$$\text{Hiệu suất tinh sạch} = \frac{\text{lượng protein thu sau sắc ký}}{\text{lượng protein trước sắc ký}} \times 100\%$$

- Thông số chạy sắc ký:

Đệm sử dụng: natri acetat 20 mM; pH 5,2 ; chứa 0,02% (w/v) natri azid và 0,01% (v/v) 2-mercaptoethanol. Tốc độ qua cột: 0,2 ml/phút; nhiệt độ phòng; độ hấp thụ protein ở bước sóng 280 nm; thể tích mỗi phân đoạn: 5 ml.

Xác định hàm lượng protein

Dựa vào cường độ màu xanh của phức chất đồng protein khử hỗn hợp photpho volphramat để xác định khối lượng protein. Phức chất màu xanh có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 750 nm.

Cho vào ống nghiệm 1 ml dung dịch mẫu thí nghiệm, tính toán sao cho khối lượng protein có trong dung dịch khoảng 0,02 - 0,2 mg/ml (20 µg – 200 µg) protein. Thêm vào ống nghiệm 4 ml dung dịch C, lắc đều, để yên trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm 0,5 ml thuốc thử Folin, lắc đều, để yên 30 – 90 phút, so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 750 nm. Hàm lượng protein được xác định thông qua đường chuẩn (Bảng 1).

Bảng 1. Chuẩn bị dung dịch protein chuẩn

Ống số	Protein 0,1% (ml)	H ₂ O (ml)	Nồng độ protein (µg/ml)	Dung dịch C (ml)	Thuốc thử Folin (ml)
1	0,0	10	0	2	0,2
2	0,5	9,5	50	2	0,2
3	1,0	9,0	100	2	0,2
4	1,5	8,5	150	2	0,2
5	2,0	8,0	200	2	0,2
6	2,5	7,5	250	2	0,2

Điện di SDS-PAGE [4.

- Chuẩn bị hộp điện di:

Cho 10 µl tetramethylethylenediamine (TEMED) vào dung dịch điện di, khuấy đều. Gel sẽ được bơm đến vạch cách lược là 0,5 cm. Chuẩn bị mẫu protein: protein thu sau sắc ký được hòa tan vào dung dịch đệm natri acetat 20 mM; pH 5,2. Đưa mẫu vào các giếng: sau khi gel đông, lắp bộ khung đổ gel vào khung chạy điện di. Đổ đầy dung dịch chạy điện di, lấy lược ra, cho mẫu và thang chuẩn vào các giếng

(lượng mẫu là 20 µl/giếng, thang chuẩn 5 µl/giếng).

- Chạy điện di: sau khi hoàn tất việc đưa mẫu vào, đặt nắp hộp điện di lại và cho dòng điện đi qua. Dòng điện chạy điện di là 100 V, thời gian để chạy điện di dao động từ 1 - 2 giờ.

- Nhuộm gel: gel được lấy ra khỏi hộp gel cẩn thận và cho vào dung dịch nhuộm. Thời gian nhuộm từ 30 - 60 phút.

- Xác định trọng lượng phân tử.

Đo khoảng cách di chuyển của các band protein từ gel phân tách tới các band protein và khoảng cách di chuyển từ gel

phân tách tới vạch màu cuối cùng. Tính giá trị Rf:

$$Rf = \frac{\text{Khoảng cách di chuyển của protein}}{\text{Khoảng cách di chuyển của vạch màu bromophenol blue}}$$

Vẽ biểu đồ Log10 của các giá trị trọng lượng phân tử của các protein chuẩn và các giá trị Rf của chúng. Trọng lượng phân tử của các vạch protein xác định thông qua thang chuẩn.

Thử khả năng kích thích tính kháng virus trên cây Hồ tiêu nuôi in vitro nhờ dịch ly trích chứa glycoprotein từ rễ cây Sâm nam

Kích thích tính kháng virus ở cây Hồ tiêu sạch virus nuôi in vitro bằng dịch chiết chứa glycoprotein từ rễ cây Sâm nam

Glycoprotein thu được sau khi chạy sắc ký được pha loãng với nước cất, lọc qua milipore để loại nguồn bệnh.

Tất cả các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

Sau khi phun xịt dịch chứa glycoprotein, cây Hồ tiêu được nuôi trong điều kiện giống như trước khi phun xịt (ánh sáng trung bình 5000 – 5500 lux thời gian chiếu sáng là 12 giờ/ngày, nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) cho tới khi gây nhiễm virus (24 giờ).

Phương pháp gây nhiễm virus TMV, CMV, ToMV lên cây Hồ Tiêu

Cây Hồ tiêu nuôi in vitro được xử lý với dịch chứa glycoprotein (40 μg

glycoprotein/100 ml H₂O- dựa trên kết quả của Seemi *et al.*, (2007)), sau 24 giờ, tiến hành gây nhiễm virus. Quá trình gây nhiễm được tiến hành theo các bước sau:

Tạo tổn thương nhẹ trên lá Hồ tiêu (tạo điều kiện thuận lợi cho virus gây bệnh) đã được xử lý glycoprotein bằng cách dùng kẹp kẹp nhẹ vào lá tạo thành vị trí tổn thương. Pha loãng dịch chứa virus theo tỉ lệ 1/200 (g trọng lượng tươi của lá/ ml nước vô trùng) và phun xịt đều lên lá cho từng nghiệm thức. Cây Hồ tiêu sau khi gây nhiễm được đưa trở lại nuôi trong điều kiện giống như trước khi gây nhiễm và tiến hành quan sát sự biểu hiện của bệnh sau 2 tuần nuôi.

Cách tính khả năng kích thích tính kháng virus

Khả năng kích thích tính kháng virus của dịch ly trích chứa glycoprotein được tính theo công thức [18]:

$$\frac{A - B}{A} \times 100$$

A: giá trị trung bình số vùng biểu hiện bệnh trên lá của cây trong lô đối chứng dương.

B: giá trị trung bình số vùng biểu hiện bệnh trên lá của cây trong lô thí nghiệm (TN).

Bảng 2. Bố trí thí nghiệm kiểm tra khả năng kích thích tính kháng virus

Nghiệm thức	Thể tích dịch chứa glycoprotein (ml)	Thể tích dung dịch chứa virus gây nhiễm (ml)
1-Đối chứng âm	2	0
2-Thí nghiệm	2	2
3-Đối chứng dương	0	2

Xử lý số liệu

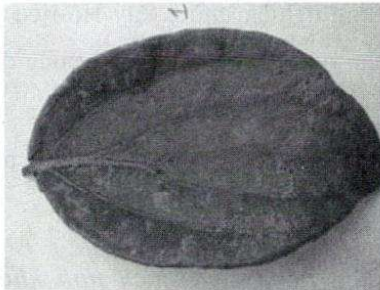
Số liệu thu được từ các thí nghiệm được phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

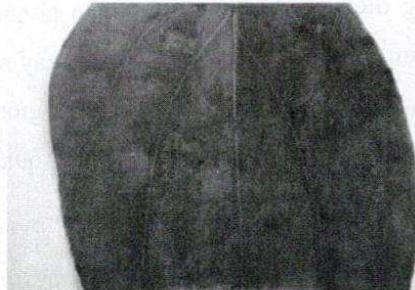
Thu nhận mẫu lá cây Hồ tiêu trồng ngoài tự nhiên nghi ngờ nhiễm virus

Mẫu thu nhận ở các vườn trồng Hồ tiêu tại tỉnh Đồng Nai (Bảng 3) với các triệu chứng:

chấm hoặc đốm vàng nhỏ từ 1 – 3 mm trên các lá phía giữa thân trụ Hồ tiêu, mép lá quăn, gồ ghề, biến dạng biểu hiện ở phần ngọn trụ tiêu, đốm chấm nhỏ 3 – 7 mm giữa các gân lá, lá hình thành những đốm tròn lớn kết dính với nhau tạo thành những vòng tròn xen kẽ sáng tối dày đặc (Hình 1, 2, 3).



Hình 1. Lá Hồ tiêu với triệu chứng bị bệnh do virus.



Hình 2. Lá Hồ tiêu với triệu chứng bị bệnh do virus.



Hình 3. Cây Hồ tiêu có triệu chứng bị bệnh do virus.

Bảng 3. Địa điểm lấy mẫu cây Hồ tiêu có triệu chứng bị bệnh do virus.

Mẫu số	Vườn	Độ tuổi (năm)	Giống	Địa chỉ
1.1 1.2	Lê Văn Thịnh	5	Vĩnh linh	Áp 4, xã Suối Nho, huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai
2.1; 2.2 và 2.3	Lê Văn Quyền	5	Vĩnh linh	Áp 4, xã Suối Nho, huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai

3.1; 3.2 và 3.3	Lê Minh Trực	3	Vĩnh linh	Áp 4, xã Suối Nho, huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai
4.1; 4.2 và 4.3	Lê Văn Trung	4	Vĩnh linh	Áp 4, xã Suối Nho, huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai
5.1; 5.2 và 5.3	Nguyễn Văn Hương	8	Tiêu trâu	Áp 5, xã Suối Nho, huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai
6.1; 6.2 và 6.3	Trần Văn Thanh	6	Tiêu sê	Áp 5, xã Suối Nho, huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai
7.1; 7.2 và 7.3	Nguyễn Thị Pha	5	Tiêu trâu	Áp 5, xã Suối Nho, huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai

Xác định virus gây bệnh trên mẫu lá cây Hồ tiêu trồng ngoài tự nhiên và mẫu in vitro

Mỗi mẫu gồm 3 lá thu từ 3 cây khác nhau trong một vườn (3 lần lặp lại, ngoại trừ mẫu số 1 và mẫu in vitro có 2 lần lặp lại). Các mẫu được bố trí như Bảng 4.

Bảng 4. danh sách mẫu thực hiện kiểm tra virus bằng phương pháp Elisa

Mẫu	Số TT	Mẫu	Số TT	Mẫu	Số TT
1.1	1	4.1	9	7.1	18
1.2	2	4.2	10	7.2	19
2.1	3	4.3	11	7.3	20
2.2	4	5.1	12	<i>in vitro 1</i>	21
2.3	5	5.2	13	<i>in vitro 2</i>	22
3.1	6	5.3	14	B	đối chứng âm
3.2	7	6.1	15	P	đối chứng dương
3.3	8	6.2	16		
		6.3	17		

Bảng 5. Sơ đồ bố trí mẫu trên đĩa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	1	9	17	1	9	17			
B	2	10	18	2	10	18	2	10	18			
C	3	11	19	3	11	19	3	11	19			
D	4	12	20	4	12	20	4	12	20			

E	5	13	21	5	13	21	5	13	21			
F	6	14	22	6	14	22	6	14	22			
G	7	15	B	7	15	B	7	15	B			
H	8	16	P	8	16	P	8	16	P			
		TMV			CMV			ToMV				

Chỉ số OD được xác định sau 60 phút. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6: số liệu đo OD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,021	0,010	0,350	0,021	0,010	0,410	0,008	0,005	0,015
B	0,028	0,037	0,028	0,000	0,030	0,026	0,024	0,015	0,029
C	0,015	0,012	0,010	0,016	0,007	0,015	0,009	0,005	0,012
D	0,018	0,220	0,016	0,018	0,017	0,061	0,006	0,013	0,011
E	0,008	0,009	0,016	0,013	0,016	0,017	0,006	0,008	0,014
F	0,030	0,036	0,031	0,033	0,029	0,032	0,016	0,016	0,028
G	0,020	0,015	0,000	0,089	0,015	0,008	0,004	0,006	0,000
H	0,021	0,018	0,450	0,016	0,105	FFFF	0,005	0,005	0,310
		TMV			CMV			ToMV	

Các chỉ số OD cao trên mức 0,5 được xác định là dương tính, chỉ số đo OD từ 0,1 – 0,5 được nghi ngờ là dương tính.

Các mẫu nghi ngờ dương tính được thử lại với các nồng độ pha loãng khác nhau để loại trừ khả năng phản ứng không đặc hiệu. Mẫu

6.3 (OD 0,350), 5.1 (OD 0,220), 6.2 (OD 0,105) và 6.3 (OD 0,410) được thử lại, kết quả được thể hiện ở Bảng 7.

Bảng 7. Số liệu đo OD thử lại

	Bố trí mẫu		Kết quả OD	
A	6.3	6.3	0,620	0,460
B	6.3	6.3	0,330	0,122
C	6.3	6.3	0,110	0,042
D	5.1	6.2	0,570	0,082
E	5.1	6.2	0,490	0,076
F	5.1	6.2	0,160	0,055
G	ĐC (-)	ĐC (-)	0,002	0,000
H	ĐC (+)	ĐC (+)	1,202	1,636
	TMV	CMV	TMV	CMV

Với kết quả nhận được từ Bảng 6 và thử lại ở Bảng 7, cho thấy:

Mẫu 6.3 (Trần văn Thanh, cây Tiêu sẻ, 6 năm tuổi) bị nhiễm virus CMV và TMV, mẫu 5.1 (Nguyễn văn Hương, Tiêu trâu, 8 năm tuổi) nhiễm TMV.

Với kết quả kiểm tra, chúng tôi chọn mẫu 6.3 (nhiễm virus CMV và TMV) làm nguồn

virus để tiến hành kiểm tra khả năng kích thích tính kháng của glycoprotein từ cây Sâm nam.

Thu nhận, tách chiết và kiểm tra glycoprotein từ cây Sâm nam

Rễ cây Sâm nam (Hình 4) thu nhận tại phường 9, thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên, được sử dụng làm nguyên liệu tách chiết glycoprotein.



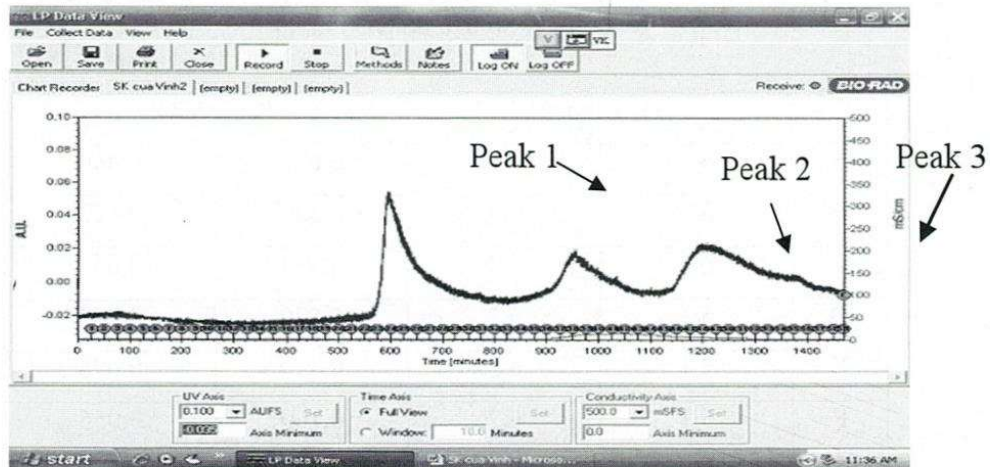
Hình 4. Rễ cây Sâm nam



Hình 5. Cây Sâm nam mọc ở tự nhiên.

Dịch ly trích từ rễ cây Sâm nam được tiến hành chạy sắc ký với tốc độ dòng chảy: 0,2 ml/phút, nhiệt độ phòng, bước sóng đo: 280

nm, thể tích phân đoạn: 5 ml. Kết quả nhận được qua sắc ký đồ (Hình 6).



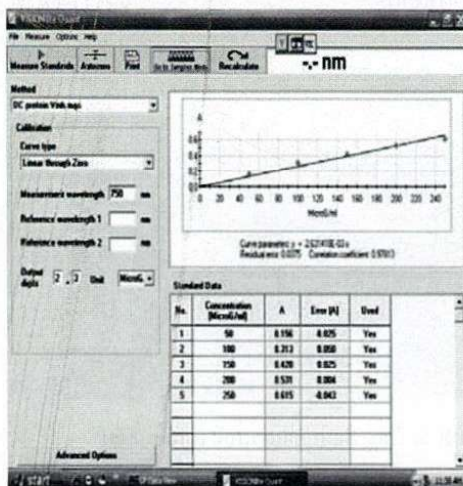
Hình 6. Sắc ký đồ của dịch ly trích chứa glycoprotein từ rễ cây Sâm nam.

Từ kết quả sắc ký đồ cho thấy dịch ly trích chứa 3 loại protein.

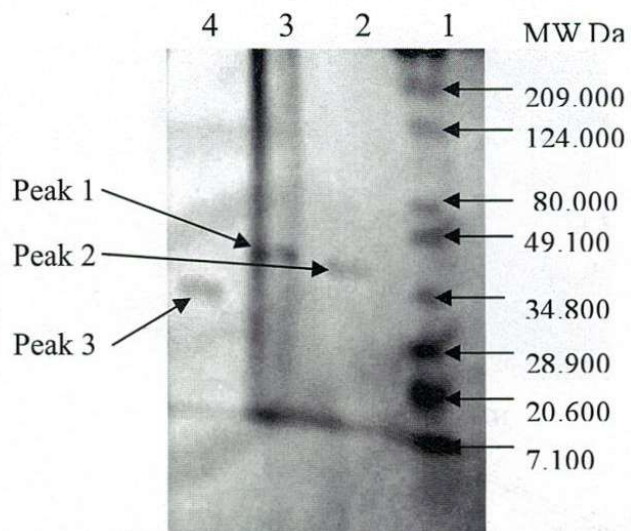
Thông qua đường chuẩn hàm lượng protein (Hình 7), dịch ly trích protein từ cây Sâm nam, qua sắc ký đồ, được xác định hàm lượng protein, độ tinh sạch và hiệu suất thu hồi (Bảng 8).

Bảng 8. Hàm lượng protein, độ tinh sạch và hiệu suất thu hồi sau sắc ký

Tên nghiệm thức	Σ Hàm lượng (mg)	Độ tinh sạch (lần)	Hiệu suất (%)
Trước sắc ký	8,727	1	100
Sau sắc ký	3,299	3,3	37,8



Hình 7. Đường chuẩn hàm lượng protein



Hình 8. Bảng gel biểu hiện sự hiện diện của glycoprotein qua điện di SDS - PAGE

Qua sắc ký chúng tôi thu được 3 phân đoạn chứa protein khác nhau, các phân đoạn này tiến hành chạy điện di để xác định trọng lượng phân tử cùng với thang chuẩn (Hình 8).

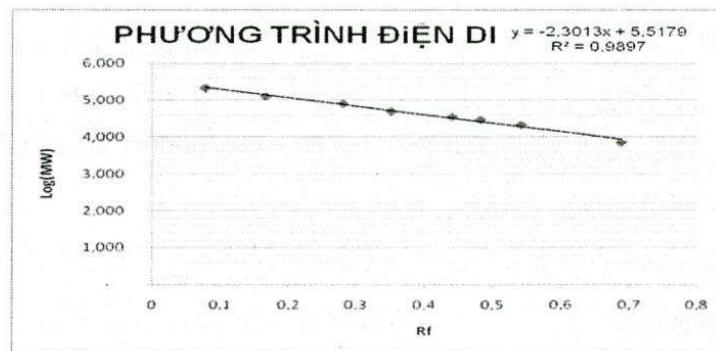
Từ kết quả điện di, chúng tôi xác định được khoảng cách di chuyển của protein từ thang chuẩn và protein từ các phân đoạn thu được (Bảng 9). Từ đó, thiết lập mối tương quan giữa trọng lượng phân tử với khoảng cách di chuyển của protein từ thang chuẩn (Hình 9) và

lập được phương trình tuyến tính cho thang chuẩn:

$$y = -2,3013x + 5,5179$$

Trong đó:

- y: biểu hiện trọng lượng phân tử (theo \log_{10})
- x: tỉ lệ khoảng cách di chuyển của protein với khoảng cách vạch màu bromophenol blue.



Hình 9. Đồ thị - phương trình chạy điện di thang chuẩn protein.

Bảng 9. Tỉ lệ khoảng cách giữa các band

MW thang chuẩn	Log ₁₀	Khoảng cách (cm)	Khoảng cách mẫu (cm)	Rf	Rf mẫu
209.000	5,32	0,48	Peak 1: 2,30	0,078	Rf 1: 0,372
124.000	5,093	1,05	Peak 2: 2,50	0,167	Rf 2: 0,403
80.000	4,903	1,75	Peak 3: 2,80	0,281	Rf 3: 0,451
49.100	4,69	2,20		0,352	
34.800	4,54	2,70	Khoảng cách vạch	0,441	
28.900	4,46	3,00	màu bromophenol	0,482	
20.600	4,31	3,40	blue: 6,20	0,542	
7.100	3,85	4,30		0,689	

Dựa vào phương trình tuyến tính và khoảng cách di chuyển của các peak, xác định trọng lượng phân tử của từng protein theo từng peak, thay vào phương trình ta được:

Peak 1: MW = 46.153 Da, Peak 2 : MW = 38.940 Da, Peak 3 : MW = 30.200 Da

Kết quả tính được cho thấy peak 3 (trọng lượng phân tử 30.200 Da) là peak có trọng lượng phân tử giống với kết quả mà Seemi *et al.*, (2007) đã xác định.

Từ các phân đoạn nhận được sau khi chạy sắc ký và dựa vào đường chuẩn hàm lượng protein, xác định được hàm lượng protein ở peak 3 là 1 mg/100 g rễ khô.

Với kết quả nhận được, chúng tôi tiến hành thu nhận phân đoạn chứa peak 3 để khảo sát hoạt tính kích thích tính kháng virus ở thực vật.

Thử khả năng kích thích tính kháng virus trên cây Hồ tiêu nuôi *in vitro* nhờ dịch ly trích chứa glycoprotein từ cây Sâm nam

Bảng 10. Khả năng kích thích tính kháng virus của glycoprotein ở cây Hồ tiêu nuôi *in vitro*.

Nghiệm thức	số vị trí bị hoại tử trung bình trên lô mẫu
Đối chứng âm	0,0000 ^b
Thí nghiệm	1,667 ^b
Đối chứng dương	8,670 ^{a(*)}

Chú thích: (*): những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức = 0,05 cho phép thử DMRT.

Kết quả nhận được có thể giải thích: ở lô thí nghiệm lá cây Hồ tiêu có đốm vàng và bắt đầu xuất hiện sự hoại tử, điều này chứng tỏ các lá Hồ tiêu bắt đầu biểu hiện bệnh; ở lô đối chứng dương đã xuất hiện những vùng tế bào bị hoại tử là do virus gây nhiễm đã gây bệnh và làm hoại tử các tế bào. Có sự khác biệt giữa lô thí nghiệm và lô đối chứng dương là nhờ khả năng kích thích tính kháng virus của glycoprotein được cung cấp trước khi nhiễm

Cây Hồ tiêu nuôi *in vitro* được phun với dịch ly trích chứa glycoprotein (40 µg/100 ml), sau 24 giờ, được nhiễm với dịch chứa virus, sau 2 tuần nuôi nhận được kết quả (Bảng 10; Hình 10, 11, 12):

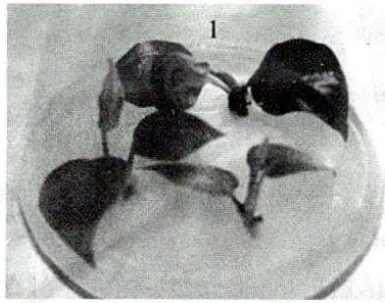
- Lô đối chứng âm lá phát triển bình thường (Hình 10).

- Lô thí nghiệm có biểu hiện bệnh (mặt lá có những đốm ngả màu vàng và bắt đầu biểu hiện sự hoại tử tế bào) (Hình 11).

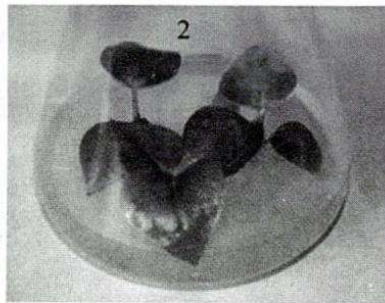
- Lô đối chứng dương biểu hiện bệnh rất rõ (nhiều vùng có đốm màu vàng và vùng tế bào đã bị hoại tử-đốm đen) (Hình 12).

virus ở lô thí nghiệm đã giúp cây có khả năng kháng virus [18, 22], nhưng ở lô thí nghiệm vẫn có biểu hiện của sự hoại tử là do khả năng kháng virus của cây bị giảm theo thời gian, cùng với nó là sự phát triển của virus.

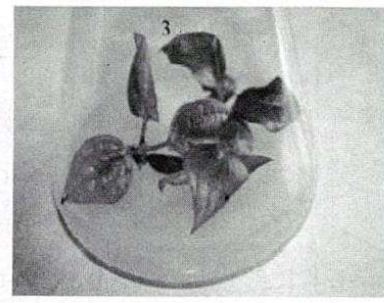
Từ kết quả thí nghiệm trên cho thấy, dịch ly trích chứa glycoprotein từ cây Sâm nam có khả năng kích thích tính kháng virus ở cây Hồ tiêu nuôi *in vitro*.



Hình 10



Hình 11



Hình 12

Hình 10, 11, 12. Khả năng kích thích tính kháng virus của glycoprotein ở cây Hồ tiêu *in vitro*.

KẾT LUẬN

Cây Hồ tiêu ở 2 vườn: Trần văn Thanh, tiêu sê, 6 năm tuổi và Nguyễn văn Hương, tiêu trâu, 8 năm tuổi bị nhiễm virus CMV và TMV.

Cây Sâm nam chứa glycoprotein có trọng lượng phân tử 30.200 Da, hàm lượng 1 mg/100 g TLK.

Glycoprotein (30.200 Da) ở nồng độ 40 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ có khả năng kích thích tính kháng virus CMV và TMV ở cây Hồ tiêu nuôi *in vitro*.

STUDY STIMULATED ANTIVIRUS ACTIVITY IN *PIPER NIGRUM* CULTURE IN *VITRO* BY GLYCOPROTEIN FROM *BOERHAVIA DIFFUSA*

Bui Dinh Thach, Vu Van Do, Trinh Ngoc Duc, Ngo Ke Suong

Institute of Tropical Biology

SUMMARY: We have studied the stimulated antiviral activity in plants by glycoprotein from *Boerhavia diffusa* in order to use this raw material to stimulate antiviral ability and to reduce using chemical compounds for plants. Results showed that *Boerhavia diffusa* have glycoprotein with 30.200 Da molecular weight, content 1 mg/100 g dried weight; *in vitro* condition, glycoprotein 40 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ stimulated antiviral activity (CMV and TMV) in *Piper nigrum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Aftab, S.B. Usmani, S.I. Ahmad, Usmanghani, Naturally occurring calcium channel blockers, *Hamdard Medicus*, 2, 44-54 (1996).
- [2] R.R. Agarwal, S.S. Dutt, Chemical examination of punarnava and Boerhavia diffusa, Isolation of an alkaloid punarnavine, *Chemical Abstract*, 30,3585, (1936).
- [3] K. Ahmad, A. Hossain, Isolation, synthesis and biological action of hypoxanthine-9-Larabinofuranoside, *J. Agricul. Biol. Sciences*, 11, 41-41 (1968).
- [4] Andrews P., Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration, *Biochem. J.*, 91, 222-233 (1964).
- [5] L.P. Awasthi, Protection of crop plants against virus diseases through root extract of Boerhavia diffusa, *Indian Phytopathology*, 54, 508-509 (2000).
- [6] L.P. Awasthi, Prevention of infection and multiplication of water melon mosaic virus disease in water melon, *In: Abstracts, Plant Health for Food Security*, Asian Congress of Mycology and Plant Pathology, 1-4 University of Mysore, Mysore, Karnataka, India, 416 (2002).
- [7] L.P. Awasthi, S.M.A. Rizvi, Effect of Boerhaavia diffusa glycoprotein on the transmission of tomato yellow leaf curl virus by Bemisia tabaci Gen, *In: Abstracts, National Symposium on Vectors of Plant Diseases*, Narendra Dev University of Agriculture and Technology, Kumarganj, Faizabad, Uttar Pradesh, India, 56 (1999).
- [8] L.P. Awasthi, P. Kumar, R.V. Singh, Effect of Boerhavia diffusa inhibitor on the infection and multiplication of cucumber green mottle mosaic virus in musk melon plants, *Indian Phytopathology*, 56, 362-362 (2003).
- [9] N.K. Basu, S.B. Lal, S.N. Sharma, Investigations on Indian medicinal plants, *Quarterly J. Pharm. Pharmacology*, 20, 38-42 (1947).
- [10] M.F. Clark, A.N. Adams, Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses, *J Gen Virol*, 34, 475-483, DOI 10.1099/0022-1317-34-3-475 (1977)
- [11] Đ.T.A. Thuyền, L.V. Dũng, T.X. Du, A.S. Bysov, *Bước đầu nghiên cứu chuẩn đoán bệnh virus trên cây Hồ Tiêu (Piper nigrum L) tại một số tỉnh Miền Đông Nam Bộ*, Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh, 189-195 (2001).
- [12] V.H. Heywood, *Flowering Plants of the World*, Oxford University Press, London, UK., 69-70 (1978).

- [13] G.K. Jain, N.M. Khanna, Punarnavoside: A new antifibrinolytic agent from *Boerhavia diffusa* Linn, *Indian J. Chemistry*, 28, 163-166 (1989).
- [14] S. Kadota, N. Lami, Y. Tezuka, T. Kikuchi, Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* Linn. I. Examination of sterols and structures of new rotenoids (boeravinones A and B), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 3214-3220 (1989).
- [15] K.R. Kirtikar, B.D. Basu, *Indian Medicinal Plants*, 3, 2nd Edition, Lalit Mohan Basu, Allahabad, Uttar Pradesh, India. 2045-2048 (1956).
- [16] N. Lami, S. Kadota, Y. Tezuka, T. Kikuchi, Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* Linn. II. Structure and stereochemistry of a new rotenoid boeravinone C2, *Chemical and Pharmaceutical Journal*, 38, 1558-1562 (1990).
- [17] A.N. Mishra, H.P. Tiwari, Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa*, *Phytochemistry*, 10, 3318-3319 (1971).
- [18] S. Lohani, H.N. Verma., In vivo and in vitro resistance induction in tobacco by *Boerhavia diffusa* systemic resistance inducing protein and transfer of induced resistance in in vitro tobacco plants, *Asian network for scientific information*, 6, 389-392 (2007).
- [19] S. Singh, L.P. Awasthi, Prevention of infection and spread of bean common mosaic virus disease of urd bean and mung bean through botanicals, *Indian J. Mycol. Plant Pathology*, 32 (1), 141-141 (2002).
- [20] S.R. Surange, G.S. Pendse, Pharmacognostic study of roots of *Boerhavia diffusa* Willd. (punarnava), *J. Research in Indian Medicine*, 7,1 (1972).
- [21] H.N. Verma, L.P. Awasthi, Antiviral activity of *Boerhavia diffusa* root extract and physical properties of virus inhibitor, *Canadian J. Botany*, 57, 926-932, (1979).
- [22] H.N. Verma, L.P. Awasthi, K.C. Saxena, Isolation of virus inhibitor from the root extract of *Boerhavia diffusa* inducing systemic resistance in plants, *Canadian Journal of Botany*, 57, 1214-1218 (1979).