

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

PHÓ THỊ THÚY HÀNG

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HỆ GENE LỤC LẠP VÀ
HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ
LOÀI DƯƠNG ĐỒNG (*Adinandra* spp.)

Ngành: Di truyền học

Mã số: 9420121

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

THÁI NGUYÊN, NĂM 2024

Công trình được hoàn thành tại
Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS Nguyễn Hữu Quân

TS. Nguyễn Thị Thu Nga

Phản biện 1:.....

Phản biện 2:.....

Phản biện 3:.....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường
hợp tại: Trường Đại học sư phạm – Đại học Thái Nguyên

Vào hồi..... giờ..... ngày..... tháng..... năm 2024

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc Gia;
- Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên;
- Trung tâm Số - Đại học Thái Nguyên.

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Chi Dương đồng (*Adinandra*) được phát hiện có khoảng 85 loài trên thế giới và khoảng 17 loài phân bố ở Việt Nam [16], [97], [159]. Theo Sách đỏ Việt Nam, một số loài thuộc chi *Adinandra* là nguồn gene quý, hiếm và có nguy cơ tuyệt chủng, hiện đang được xếp vào mức đánh giá "Nguy cấp" (VU) như loài Sum lá lớn (*A. megaphylla* Hu) [2]. Do đó, việc nhận diện đúng loài để bảo tồn và phát triển các loài quý hiếm này là việc làm cần thiết. Phương pháp sinh học phân tử với việc sử dụng các mã vạch DNA hỗ trợ định danh cho hiệu quả nhận diện và phân biệt loài cao hơn khi chỉ sử dụng phương pháp hình thái so sánh.

Mặc dù, hệ gene lục lạp có tính bảo thủ cao nhưng trong đó vẫn có những vùng dễ biến đổi. Chính sự sai khác trong trình tự nucleotide của các gene ở vùng biến đổi là cơ sở để phân biệt loài này với loài khác, xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài ở mức độ phân tử. Hiện nay, hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Adinandra* có rất ít thông tin, chỉ có bốn trong tổng số 85 loài được giải trình tự hoàn toàn hệ gene lục lạp. Những công bố về sử dụng và đề xuất mã vạch DNA cho nhận diện các loài thuộc chi *Adinandra* rất hạn chế và chỉ có gene *matK* được đề xuất làm mã vạch DNA giúp nhận diện loài *A. megaphylla*, *A. lienii* [13], [102].

Trong dự án sàng lọc hoạt tính sinh học của thực vật ở Việt Nam, dịch chiết của một số loài thuộc chi *Adinandra*, (họ Pentaphylacaceae) được xác định có hoạt tính chống ung thư [14], [108], [136]. Ngoài ra, một số công trình nghiên cứu cho thấy, các loài thuộc chi *Adinandra* có tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, chống oxy hóa cũng như điều trị bong gân, rắn cắn [3], [6], [38], [106]. Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu trên thế giới về thành phần hóa học của chi *Adinandra* tập trung chủ yếu ở loài *A. nitida*, còn nhiều loài khác thuộc chi *Adinandra* chưa được quan tâm nghiên cứu. Ở Việt Nam, những nghiên cứu về phân lập và thử hoạt tính sinh học của các hợp chất mới được thực hiện ở loài *A. hainanensis*, *A. poilanei*, *A. lienii* trong tổng số 17 loài được phát hiện.

Xuất phát từ những lý do trên, luận án được thực hiện với tên đề tài: "**Nghiên cứu đặc điểm hệ gene lục lạp và hợp chất có hoạt tính sinh học của một số loài Dương đồng (*Adinandra* spp.)**".

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Phân tích được đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *Adinandra bockiana*
- Phân tích được mối quan hệ di truyền giữa các loài và đề xuất ứng viên mã vạch DNA hỗ trợ định danh loài thuộc chi *Adinandra*.
- Xác định được thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ ba loài thuộc chi *Adinandra*.

3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*

- Phân tích chi tiết đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*
- So sánh hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* với một số loài khác thuộc chi *Adinandra* trên GenBank.

Nội dung 2: Nghiên cứu sự phát sinh chủng loại của chi *Adinandra*, tìm kiếm gene tiềm năng để đề xuất làm mã vạch DNA lục lạp

- Xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự hệ gene lục lạp và trình tự các gene *matK*, *trnL* và *rbcL* của các loài thuộc chi *Adinandra*.
- Phân tích các sơ đồ cây phát sinh chủng loại và tìm kiếm ứng viên mã vạch DNA để nhận diện loài thuộc chi *Adinandra*.

Nội dung 3: Nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ ba loài nghiên cứu.

- Phân lập các hợp chất bằng các phương pháp sắc ký.
- Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được trên cơ sở các phép xác định thông số vật lý, các phương pháp đo phổ đồng thời kết hợp với phân tích và tra cứu tài liệu tham khảo.
- Đánh giá một số hoạt tính sinh học (kháng khuẩn, gây độc tế bào ung thư, ức chế α -glucosidase) của một số hợp chất phân lập được từ ba loài nghiên cứu.

4. Những đóng góp mới của luận án

(1) Luận án là công trình nghiên cứu mới ở Việt Nam và trên thế giới, đã phân tích chi tiết và đầy đủ đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*. Đề xuất vùng gene *matK* và *rbcL* là ứng viên mã vạch DNA tiềm năng giúp nhận diện loài thuộc chi *Adinandra*.

(2) Luận án là nghiên cứu đầu tiên đã phân lập được 37 hợp chất từ lá của loài *A. megaphylla*, *A. bockiana*, *A. glischroloma*; trong đó

có hai hợp chất mới (debutyldorycnic acid và adinanquercetiside được phân lập từ lá của loài *A. megaphylla*).

(3) Lần đầu tiên phát hiện hợp chất 23-hydroxyursolic acid từ loài *A. glischroloma* có khả năng ức chế α -glucosidase và gây độc dòng tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư vú (MCF-7); hợp chất ursolic acid từ các loài *A. megaphylla*, *A. bockiana*, *A. glischroloma* có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*; hợp chất isoquercetine (từ loài *A. megaphylla*, *A. glischroloma*) ức chế mạnh sự phát triển của vi khuẩn *Citrobacter freundii* và *Streptococcus milleri*.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Về mặt khoa học

Kết quả nghiên cứu của luận án sẽ là cơ sở cho nghiên cứu ứng dụng những mã vạch DNA đã được đề xuất để nhận diện loài và phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra*.

Luận án đã xác định được thành phần hóa học có trong lá của ba loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam, từ đó cho thấy sự khác biệt so với các loài *Adinandra* ở Trung Quốc. Cụ thể, các loài *Adinandra* ở Việt Nam giàu hợp chất triterpenoid, trong khi các loài *Adinandra* Trung Quốc giàu hợp chất flavonoid.

Kết quả thử hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được làm cơ sở khoa học để giải thích cho hoạt tính kháng khuẩn, gây độc tế bào ung thư của cao chiết cũng như cách dùng một số loài thuộc chi *Adinandra* trong điều trị ung thư ở Việt Nam.

Các bài báo được đăng tải trên các tạp chí khoa học trong nước và quốc tế, cùng với các trình tự gene công bố trên GenBank là những tư liệu có giá trị tham khảo trong nghiên cứu và giảng dạy.

Về mặt thực tiễn

Phát hiện khả năng ức chế α -glucosidase và gây độc dòng tế bào HepG2, MCF-7 của hợp chất 23-hydroxyursolic acid có thể cung cấp cơ sở và mở ra cơ hội cho việc phát triển các phương pháp điều trị mới cho bệnh đái tháo đường, ung thư gan và ung thư vú.

Phát hiện hợp chất ursolic acid có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của vi khuẩn *P. aeruginosa*, isoquercetine ức chế sự phát triển của vi khuẩn *C. freundii*, *S. milleri* có thể mở ra cơ hội cho việc sử dụng các hợp chất từ thực vật trong chữa trị một số bệnh do những vi khuẩn này gây ra.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Chi *Adinandra* và hệ gene lục lạp

1.1.1. Đặc điểm của chi *Adinandra*

1.1.1.1. Phân loại chi *Adinandra*

1.1.1.2. Đặc điểm hình thái của chi *Adinandra*

1.1.1.3. Sự phân bố các loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam

1.1.2. Nghiên cứu về hệ gene lục lạp

1.1.2.1. Hệ gene lục lạp của thực vật bậc cao

1.1.2.2. Hệ gene lục lạp của một số loài thuộc chi *Adinandra*

Hiện nay, chỉ có bốn loài thuộc chi *Adinandra* đã được giải trình tự toàn bộ hệ gene lục lạp và đăng ký trên GenBank, đó là loài *A. megaphylla* (mã số MW697901.1), loài *A. millettii* (mã số NC_035678.1), loài *A. bockiana* (mã số MW699853.1) và loài *A. angustifolia* (mã số NC_035653.1) [104], [105], [145], [146].

Hệ gene lục lạp đều có cấu trúc điển hình với bốn vùng gồm: một vùng LSC có kích thước khoảng 86 kb, một vùng SSC có kích thước khoảng 18 kb và một cặp vùng IRs (IRa và IRb) có kích thước hơn 26 kb mỗi vùng. Kích thước hệ gene lục lạp dao động từ 156-156,5 kb, có từ 129-132 gene. Hàm lượng GC trung bình khoảng 37,4% [104], [145], [146].

Ngoài nghiên cứu của Nguyen và cs (2019, 2021) đề xuất và sử dụng gene *matK* để nhận diện loài Sum lá lớn (*A. megaphylla*) và Sum liên (*A. lienii*) thì chưa có nghiên cứu nào đề xuất ứng viên mã vạch mới mặc dù trong hệ gene lục lạp có rất nhiều gene [13], [102].

1.2. Phân tích di truyền tiến hóa phân tử

1.2.1. Cơ sở di truyền của sự tiến hoá phân tử

1.2.2. Phân tích tiến hóa phân tử dựa trên hệ gene lục lạp

1.2.2.1. Nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các loài thực vật dựa trên hệ gene lục lạp

Hội nghị Thực vật học không biên giới (2008) đã chỉ ra rằng, hệ gene lục lạp chứa nhiều thông tin giống như trình tự mã vạch ty thể nên được sử dụng ở động vật. Do đó, hệ gene lục lạp được đề xuất là một siêu mã vạch [37].

1.2.2.2. Nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các loài thực vật dựa

trên mã vạch DNA lục lạp

Mã vạch DNA

Nghiên cứu mối quan hệ di truyền và nhận diện loài bằng mã vạch DNA lục lạp

Trong hệ gene lục lạp, có bảy vùng DNA được chọn làm ứng cử viên mã vạch DNA cho thực vật trên cạn gồm: gene *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, vùng đệm *psbK-psbI*, *atpF-atpH* và vùng đệm *trnH-psbA*. Trong đó, có bốn vùng là các phần gene mã hóa (gene *matK*, *rbcL*, *rpoB* và *rpoC1*) và ba vùng đệm không mã hóa cho protein (*atpF-atpH*, *trnH-psbA* và *psbK-psbI*) [32], [60].

Tuy nhiên, với mỗi loài, mỗi chi sẽ có những mã vạch DNA phù hợp. Do đó, việc tìm kiếm gene tiềm năng trở thành mã vạch DNA cho đối tượng nghiên cứu của mình là rất cần thiết.

1.3. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi *Adinandra*

1.3.1. Thành phần hóa học của chi *Adinandra*

Trên thế giới và ở Việt Nam đã có khá nhiều nghiên cứu về thành phần hợp chất có trong các loài thuộc chi *Adinandra*. Đa số các nghiên cứu đều thống nhất, các loài thuộc chi *Adinandra* chứa các nhóm chất chủ yếu như: flavonoid, phenolic, triterpenoid, saponin triterpenoid, aldehyde, coumarin.... Trong đó, flavonoid và triterpenoid là thành phần chủ yếu [84], [85], [86], [138], [153].

Hiện nay, các nghiên cứu về phân lập các hợp chất mới chỉ được thực hiện ở một số loài như: *A. nitida*, *A. lienii*, *A. poilanei*, *A. hainanensis* trong tổng số 85 loài thuộc chi *Adinandra*. Các nghiên cứu đã phân lập được 47 hợp chất, cụ thể: nhóm flavonoid (8 hợp chất), saponin triterpenoid (8 hợp chất), triterpenoid (17 hợp chất), sterol (4 hợp chất), phenolic (3 hợp chất). Ngoài ra, từ một số loài thuộc chi *Adinandra* đã phân lập được một số hợp chất thuộc các nhóm khác (7 hợp chất) như: diterpenoid, coumarin, aldehyde, quinone, lignan, tocopherol, phytol.

1.3.2. Hoạt tính sinh học của chi *Adinandra*

1.3.2.1. Hoạt tính sinh học của cao chiết và nhóm hợp chất từ một số loài thuộc chi *Adinandra*

Các cao chiết và hợp chất có trong các loài thuộc chi *Adinandra* có các hoạt tính như: kháng khuẩn, chống oxy hóa, gây độc tế bào

ung thư, chống dị ứng, ức chế sự tích tụ lipid máu, giảm huyết áp, bảo vệ gan, bảo vệ dạ dày... Đặc biệt, cao chiết của các loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam như: *A. bockiana*, *A. megaphylla* đã được nghiên cứu khá kỹ về tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa và gây độc tế bào ung thư.

1.3.2.2. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập từ một số loài thuộc chi *Adinandra*

Trên thế giới, những nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ các loài thuộc chi *Adinandra* cũng chủ yếu tập trung vào hoạt tính chống oxy hóa và gây độc tế bào ung thư [49], [86], [149], [150]. Ngoài ra, các loài thuộc chi *Adinandra* còn thể hiện hoạt tính sinh học khác như: chống dị ứng, ức chế sự tích tụ lipid máu, giảm huyết áp, bảo vệ gan, ức chế α -glucosidase ...[3], [11], [86], [134], [147], [148].

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Ba loài thuộc chi *Adinandra* được sử dụng gồm loài *A. megaphylla* Hu và *A. bockiana* E. Pritz. ex Diels thu tại xã Liêm Phú, huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai. Trong đó, loài *A. megaphylla* được thu ở độ cao 1200-1800 m, tọa độ 21°59'15"N; 104°19'28"E; loài *A. bockiana* thu ở độ cao 800 m, tại tọa độ 21°59'15"N; 104°19'28"E. Loài *A. glischroloma* được thu tại xã Y Tý, huyện Bát Xát, tỉnh Lào Cai ở độ cao 1844m, tại tọa độ 103°37'42"Đ, 22°37'35"B. Lá của ba loài được sử dụng để tạo cao chiết, phân lập các hợp chất và thử hoạt tính sinh học của các hợp chất thu được.

2.1.2. Chúng vi khuẩn kiểm định

Các vi khuẩn kiểm định sử dụng trong nghiên cứu để xác định hoạt tính kháng khuẩn của các hợp chất thu được từ các loài thuộc chi *Adinandra* gồm: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC13709), *Streptococcus milleri*. Đây đều là những vi khuẩn gây bệnh ở người, trong đó vi khuẩn *S. aureus* thuộc nhóm Gram (+), các chủng vi khuẩn còn lại thuộc nhóm Gram (-).

2.1.3. Các dòng tế bào thử nghiệm

Sử dụng các dòng tế bào thử nghiệm gồm: Tế bào ung thư biểu mô phổi (SK-LU-1), ung thư biểu mô dạ dày (MKN-7), ung thư biểu mô tế bào gan (HepG2) và ung thư vú (MCF7), dòng tế bào thận phổi người (HEK-293A) làm đối chứng.

2.1.4. Dữ liệu nghiên cứu

Sử dụng dữ liệu hệ gene lục lạp của một số loài đã được công bố trên GenBank, gồm loài *A. megaphylla* (Mã số MW697901.1) [104], loài *A. millettii* (Mã số NC_035678.1) [146], loài *A. angustifolia* (Mã số NC_035653.1) [145] để so với hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* về sự đa dạng di truyền hệ gene lục lạp của chi *Adinandra*. Ngoài ra, dữ liệu của các trình tự gene khác được khai thác trên GenBank theo địa chỉ truy cập <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>[160].

2.2. Hóa chất, thiết bị và địa điểm nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện tại các phòng thí nghiệm của Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm - Đại học Thái Nguyên; Phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học; Viện Hóa sinh biển thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hệ gene lục lạp

Hệ gene lục lạp của loài *A. angustifolia* (mã số GenBank MF179491) và *A. millettii* (mã số GenBank MF179492) [145], [146] đã được sử dụng để so sánh, đối chiếu với hệ gene lục lạp của các loài nghiên cứu.

2.3.2. Phương pháp phân tích di truyền tiến hóa phân tử

Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự nucleotide của gene *matK*, *trnL* và *rbcL* bằng phương pháp Maximum Likelihood với giá trị bootstrap được lặp lại 1000 của phần mềm Mega X [79].

2.3.3. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học

2.3.3.1. Nhóm phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học

Phương pháp tạo cao chiết tổng/cận chiết

Bột lá khô mỗi loài (*A. megaphylla* - 3,5 kg; *A. glischroloma* - 3,2 kg và *A. bockiana* - 3,3 kg) được tạo các cao chiết tổng, cận chiết theo sơ đồ [hình 2.2](#).

Phương pháp phân lập các hợp chất

Sử dụng các phương pháp như sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột (CC), sắc ký khí (GC) [\[12\]](#).

Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của hợp chất

Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định trên cơ sở sử dụng các phép xác định thông số vật lý và các phương pháp đo phổ (NMR) bằng các thiết bị hiện đại đồng thời kết hợp với phân tích và tra cứu tài liệu tham khảo.

2.3.3.2. Nhóm phương pháp xác định hoạt tính sinh học của các hợp chất

Phương pháp thử hoạt tính kháng khuẩn: Bằng phương khuếch tán giếng thạch theo nghiên cứu của Mahesh và Satish (2008) [\[91\]](#).

Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào: Theo phương pháp của Skehan và cs (1990) [\[121\]](#).

Phương pháp thử hoạt tính ức chế α -glucosidase: Theo Tran và cs (2014) [\[128\]](#).

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu và phân tích kết quả

Sử dụng phần mềm phân tích thống kê SPSS và các phần mềm tin sinh học: BioEdit, BLAST trong NCBI để phân tích hệ gene [\[58\]](#), [\[75\]](#), [\[85\]](#), [\[160\]](#).

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*

3.1.1. Cấu trúc và thành phần hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*

Hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài *A. bockiana* có kích thước 156284 bp, có cấu trúc 4 vùng điển hình, gồm vùng sao chép đơn lớn (LSC) có kích thước 85693 bp, vùng sao chép đơn nhỏ (SSC) 18411

bp và cặp vùng đảo ngược lặp lại (IR) 26090 bp, hàm lượng GC là 37,4% (Hình 3.1).

Phân tích hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* cho thấy, có 129 gene bao gồm 84 gene mã hóa protein (PCG), 37 gene mã hóa tRNA và 8 gene mã hóa rRNA. Căn cứ vào chức năng, 129 gene được phân chia trong 18 nhóm (Bảng 3.1).

3.1.2. Bộ dữ liệu về trình tự lặp lại ở loài *A. bockiana*

Tổng số chuỗi lặp đơn giản (SSR) trong hệ gene lục lạp là 51; với kiểu lặp lại đơn bao gồm A (18 SSR), T (32 SSR) G hoặc C (1 SSR) có độ dài từ 10-19 bp. Phần lớn các SSR nằm ở vùng LSC (35), số lượng SSR ở vùng SSC và IR rất ít với 6 và 4 SSR tương ứng ở mỗi vùng. Hệ gene lục lạp được xác định với 70 trình tự lặp, gồm 48 trình tự lặp giống nhau, 20 trình tự lặp xuôi và 2 trình tự lặp đảo ngược và không có sự lặp lại bổ sung (Hình 3.2)

3.1.3. Số lượng và tần suất sử dụng codon của gene mã hóa protein trong hệ gene lục lạp ở loài *A. bockiana*

Trong hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*, tại vùng mã hóa đã tìm thấy 52057 codon của các gene mã hóa protein (Bảng 3.2). Số codon có tận cùng là A và U được tìm thấy thường xuyên hơn so với G và C. Trong 64 loại codon, có 30 loại codon được sử dụng thường xuyên so với mức dự kiến ở trạng thái cân bằng (giá trị RCSU > 1) và 29 loại codon có mức độ sử dụng ít (giá trị RCSU < 1). Tần suất sử dụng của các codon mở đầu AUG (mã hóa methionine) và UGG (mã hóa tryptophan) không có độ lệch (RCSU = 1) so với mức sử dụng codon dự kiến ở trạng thái cân bằng. Các codon kết thúc bao gồm UAA, UGA, UAG (Bảng 3.2).

3.1.4. So sánh hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* với *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia*

3.1.4.1. Sự đa dạng về kích thước và số lượng gene trong hệ gene lục lạp

So sánh hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài *A. bockiana* [105] với các loài: *A. megaphylla* [104], *A. angustifolia* [145] và *A. millettii* [146] cho thấy, hệ gene lục lạp của các loài có sự đa dạng về kích thước và khối lượng của hệ gene, kích thước của từng vùng, số lượng gene (Bảng 3.3)

Bảng 3.3. Sự đa dạng về kích thước và số lượng gene trong hệ gene lục lạp của một số loài thuộc chi *Adinandra*

T T	Đặc điểm hệ gene	Tên loài			
		<i>A. bockiana</i>	<i>A. megaphylla</i>	<i>A. millettii</i>	<i>A. angustifolia</i>
1	Kích thước hệ gene (bp)	156284	156298	156311	156344
2	Kích thước LSC (bp)	85693	85688	85698	85743
3	Kích thước SSC (bp)	18411	18424	18421	18419
4	Kích thước IR (bp)	26090	26093	26096	26091
5	Hàm lượng GC (%)	37,4	37,4	37,4	37,4
6	Số lượng gene	129	131	132	132
7	Số lượng PCG	84	86	87	87
8	Số lượng tRNA	37	37	37	37
9	Số lượng rRNA	8	8	8	8

3.1.4.2. Sự sai khác trong trình tự gene của hệ gene lục lạp

So với vùng IR, vùng LSC và SSC có sự khác biệt cao hơn. Các vùng mã hóa có xu hướng được bảo tồn nhiều hơn so với các vùng không mã hóa và các biến thể được phát hiện chủ yếu ở các vùng không mã hóa. Các gene *matK*, *psaA*, *ndhK*, *ndhG* và *rbcL* có các đoạn nucleotide khác nhau giữa bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* (Hình 3.3).

Giá trị đa dạng nucleotide (Pi) giữa các trình tự gene lục lạp của 4 loài thuộc chi *Adinandra* khác nhau giữa các loài và khác nhau giữa các vùng của hệ gene lục lạp trong cùng một loài. Giá trị Pi trung bình của bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* là 0,00105.

3.1.4.3. Sự co lại và mở rộng của hệ gene lục lạp

Kích thước mỗi vùng IR của bốn hệ gene lục lạp dao động từ 26.090-26.096 bp. Kết quả phân tích cho thấy, không có sự mở rộng và co lại của vùng IR trong hệ gene lục lạp ở các loài nghiên cứu. Trong hệ gene lục lạp của loài *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia*, gene *ycf1* có 4543 bp thuộc vùng SSC (phần đầu gene) và 1067 bp nằm ở vùng IRa (phần đuôi gene), gene *ycf1* là ranh giới

giữa IRa và SSC. Tuy nhiên, gene *ycf1* không được trình bày ở vùng này trong hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* (Hình 3.5).

3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền và phát sinh chủng loại của chi *Adinandra*

3.2.1. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh

Cây phát sinh loài được thiết lập dựa trên trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh cho độ tin cậy và ổn định rất cao (giá trị bootstrap là 100% ở tất cả các nhánh). Bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* đều tạo thành một nhánh với giá trị bootstrap 100% (Hình 3.6).



Hình 3.6. Cây phát sinh của loài *A. bockiana* và các loài khác dựa trên trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh

3.2.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene *matK*, *trnL* và *rbcL*

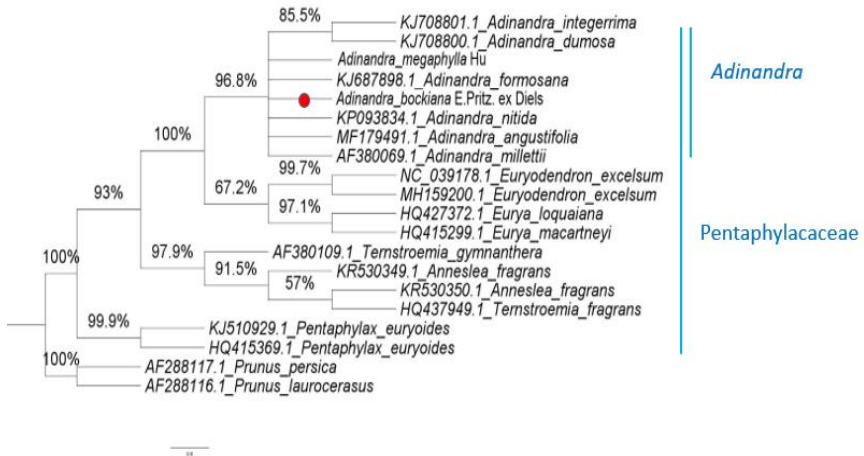
3.2.2.1. Đặc điểm gene *matK*, *trnL* và *rbcL* của loài *A. bockiana*

3.2.2.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene *matK*

Loài *A. bockiana* có tỷ lệ tương đồng 100% với các loài *A. megaphylla* và *A. nitida*. Trình tự gene *matK* của loài *A. bockiana* có sự tương đồng rất cao với trình tự gene *matK* của các loài trong chi *Adinandra* từ 99,27-100% (Bảng 3.5).

Hệ số sai khác về trình tự gene *matK* giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank dao động từ 0,001 – 1,100 (Bảng 3.6). Trong đó, hệ số sai khác nhỏ nhất là 0,001 (với loài *A. formosana*), tiếp đến là 0,003 (với loài *A. integerrima* và *A. angustifolia*). Các loài *A. megaphylla* và *A. nitida* không có sự sai khác trong trình tự gene *matK* so với loài *A. bockiana* (hệ số sai khác là 0,000).

Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gene *matK* mang lại độ tin cậy và ổn định rất cao, giá trị bootstrap hầu hết lớn hơn 90% ở đa số các nhánh (Hình 3.7).



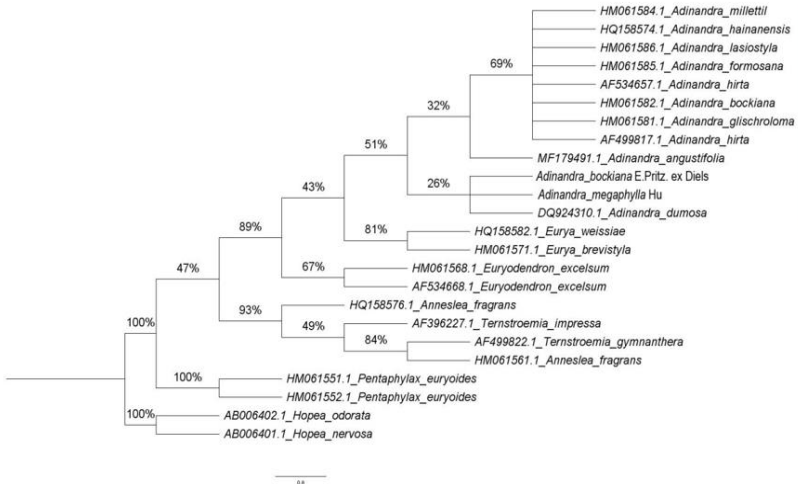
Hình 3.7. Cây phát sinh loài của *A. bockiana* và các loài khác liên quan dựa trên trình tự gene *matK*

3.2.2.3. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene *trnL*

Trình tự gene *trnL* của loài *A. bockiana* có tỷ lệ tương đồng rất cao (từ 99,33-100%) với các loài thuộc chi *Adinandra*. Trong đó, loài *A. bockiana* có tỷ lệ tương đồng cao nhất với loài *A. glischroloma* và *A. hainanensis* là 100% (Bảng 3.7).

Kết quả phân tích sự sai khác trong trình tự gene *trnL* giữa loài *A. bockiana* và những loài khác trên GenBank cho thấy, hệ số sai khác dao động từ 0,002-1,130. Trong đó, trình tự gene *trnL* của loài *A. bockiana* có sự sai khác ít nhất (hệ số sai khác là 0,002) với các loài thuộc cùng chi *Adinandra* như loài *A. millettii*, *A. bockiana* (HM061582.1), *A. glischroloma*, *A. hirta* (AF534657.1), *A. hirta* (AF499817.1), *A. hainanensis*, *A. lasiostyla*, *A. formosana* (Bảng 3.8).

Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gene *trnL* (Hình 3.8) cho thấy, gene *trnL* mang lại độ tin cậy và ổn định thấp tại nhánh của chi *Adinandra* (giá trị bootstrap là 51%). Trong hình 3.8, chi *Adinandra* đã được tách ra thành hai phân nhóm. Trong mỗi phân nhóm độ ổn định cũng rất thấp (giá trị bootstrap lần lượt là 26; 32 và 69%)



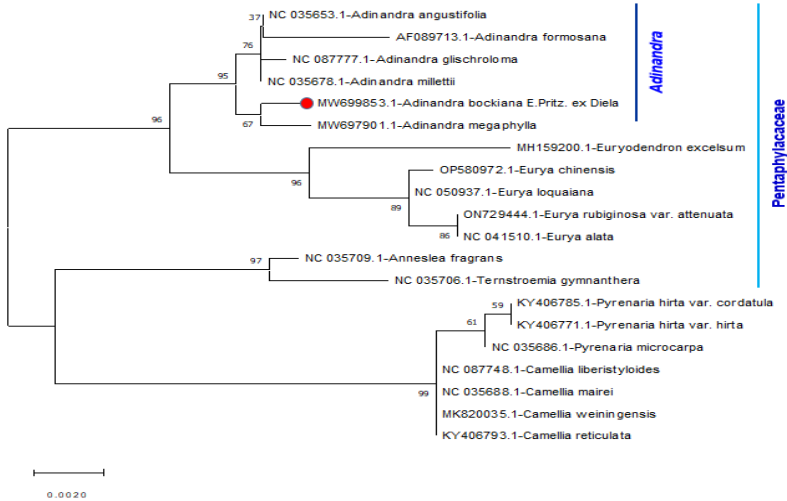
Hình 3.8. Cây phát sinh loài của *A. bockiana* và các loài liên quan dựa trên trình tự gene *trnL*

3.2.2.4. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene *rbcL*

Loài *A. bockiana* có tỷ lệ tương đồng cao nhất với loài *A. megaphylla*, *A. milletii* và *A. angustifolia* (99,72%), thấp nhất (98,18%) với các loài thuộc chi *Camellia*, họ Chè (Theaceae). Không có trình tự *rbcL* của loài nào tương đồng 100% với loài *A. bockiana* (Bảng 3.9).

Hệ số sai khác về trình tự gene *rbcL* giữa loài *A. bockiana* với 19 loài khác dao động từ 0,003–0,018 (Bảng 3.10). Các loài *A. milletii*, *A. angustifolia* và *A. megaphylla* có mối quan hệ di truyền gần nhất với loài *A. bockiana* (Hệ số sai khác 0,003), tiếp đến là loài *A. glischroloma* và *A. formosana* với hệ số sai khác lần lượt là 0,004 và 0,006.

Phân tích cây phát sinh loài dựa trên trình tự gene *rbcL* cho thấy, các loài thuộc chi *Adinandra* phân bố trên cùng một nhánh và được chia thành hai phân nhóm có mối quan hệ rất gần nhau về mặt di truyền (giá trị bootstrap đạt 95%); loài *A. bockiana* cùng với *A. megaphylla* tạo nên phân nhóm 1; phân nhóm 2 gồm loài *A. glischroloma*, *A. angustifolia*, *A. milletii* và *A. formosana* (Hình 3.9).



Hình 3.9. Cây phát sinh loài của *A. bockiana* và các loài liên quan dựa trên trình tự gene *rbcL*

Kết quả phân tích độ tương đồng, hệ số sai khác và cây phát sinh loài của các gene cho thấy, trình tự gene *matK* và *rbcL* thích hợp và được đề xuất là ứng viên mã vạch DNA để nhận diện loài, phân loại và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra* và một số loài thuộc họ Pentaphylacaceae.

3.3. Kết quả phân tích thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của ba loài nghiên cứu

3.3.1. Cấu trúc hoá học của một số hợp chất phân lập từ ba loài nghiên cứu

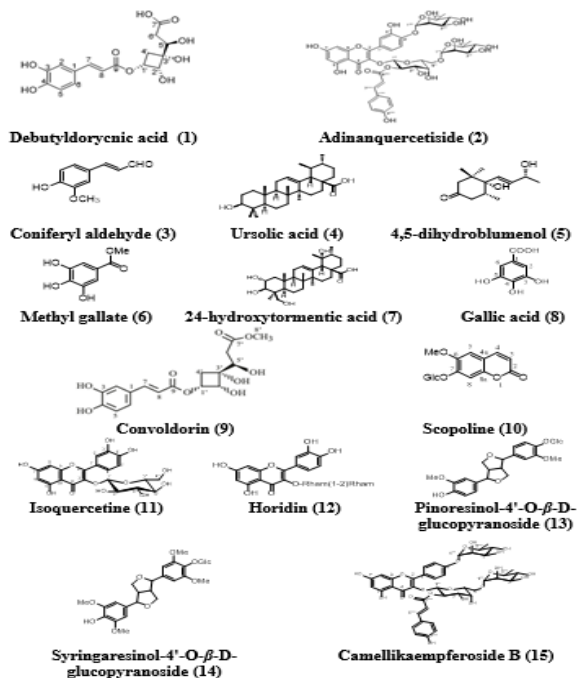
3.3.1.1. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ loài *A. megaphylla*

Từ lá của loài *A. megaphylla* đã phân lập được 15 hợp chất (Bảng 3.11, Hình 3.12). Trong 15 hợp chất có hai hợp chất mới lần đầu được mô tả là debutyldorycnic acid (1) và adinanquercetiside (2); 13 hợp chất còn lại (ký hiệu (KH) từ 3-15) đã biết bao gồm coniferyl aldehyd (3), ursolic acid (4), 4,5-dihydroblumenol (5), methyl gallat (6), 24-hydroxytormentonic acid (7), gallic acid (8), convoldorin (9), scopolin (10), isoquercitrin (11), horridin (12), pinosresinol-4'-O- β -D glucopyranoside (13), syringaresinol β -D-glucoside (14) và cammellikaempferoside B (15).

Bảng 3.11. Kết quả phân lập và xác định công thức hóa học của các hợp chất từ lá của loài *A. megaphylla*

TT	Phân đoạn	Phương pháp phân lập	KH hợp chất	TLTK	Tên hợp chất	KL hợp chất (mg)
1	F3.2	RP-18 (M:W 1:1)	AHL2 (3)	[98]	Coniferyl aldehyde	3,7
2	F5.2	Rửa acetone	AHL3 (4)	[19]	Ursolic acid	45,0
3	F5.3	RP-18 (M:W 1:1)	AHL4 (5)	[43]	4,5-dihydroblumenol	8,2
4	F5.3.1	Silicagel c, c (D:A 9:1)	AHL6 (6)	[118]	Methyl gallate	4,1
5	F6.7.2	Silicagel c, c (D:A 9:1)	AHL7 (7)	[61], [80]	24-hydroxytormentic acid	3,1
6			AHL8 (8)	[8]	Gallic acid	4,2
7	F9.1	RP-18 (M:W 1:3)	AHL1 3 (9)	[54]	Convoldorin	16,5
8	F9.2.1	RP-18 (M:W 1:4)	AHL1 9 (10)	[1]	Scopoline	5,1
9	F9.3	RP-18 (M:W 1:3)	AHL1 5 (1)		Debutyldorynic acid	8,6
10	W3.2.3	RP-18 (M:W 1:1)	WAM 1 (11)	[75]	Isoquercetine	3,6
11			WAM 2 (12)	[48]	Horidin	4,2
12	W3.4.1	RP-18 (M:W 1:1)	WAM 11A (13)	[112]	Pinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside	7,1
13	W3.4.2	Silicagel c, c (D:M 1:9)	WAM 16 (14)	[119]	Syringaresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside	5,3
14	W3.8.4	RP-18 (M:W 1:3)	WAM 15 (15)	[143]	Camellikaempferoside B	3,8
15			WAM 11.5 (2)		Adinanquercetinide	5,1

Chú thích: KH: Kí hiệu; KL: Khối lượng



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ lá của loài *A. megaphylla*

3.3.1.2. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ loài *A. bockiana*

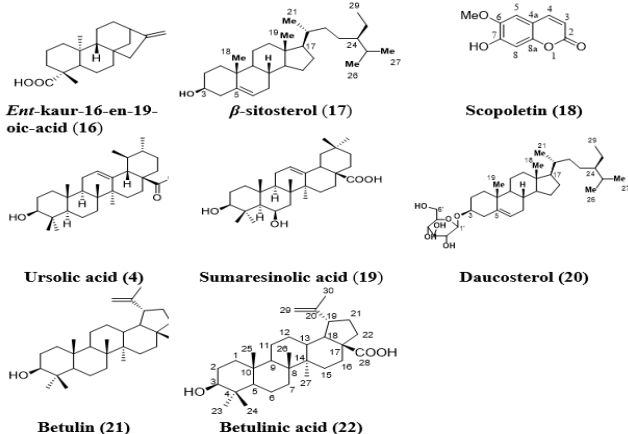
Từ lá của loài *A. bockiana* đã phân lập được 8 hợp chất (Bảng 3.14, Hình 3.13), đây đều là những hợp chất đã được tìm thấy ở các loài thực vật khác, trong đó ursolic acid đã được phân lập từ loài *A. megaphylla*.

Bảng 3.14. Kết quả phân lập và xác định công thức hóa học của các hợp chất từ lá của loài *A. bockiana*

TT	Phân đoạn	Phương pháp phân lập	KH hợp chất	TLTK	Tên hợp chất	KL hợp chất (mg)
1	E6.4.2	RP-18 (M:W 1,5:1)	BA1 (16)	[70]	Ent-kaur-16-en-19-oic-acid	5,0
2	E6.4.3	Silicagel c, c (H:E 9:1)	BA2 (17)	[123]	β -sitosterol	12,0

3	E10.8	Silicagel c, c (H:A 9:1)	BA15 (21)	[137]	Betulin	6,5
4	E10.10	Kết tinh	BA16 (22)	[65]	Betulinic acid	4,6
5	E16.1	Silicagel c, c (H:E 1:1)	BA3 (18)	[20]	Scopoletin	3,0
6	E16.4	RP-18 (M:W 3:1)	BA5 (4)	[19]	Ursolic acid	5,0
7	E21.1	Kết tinh	BA7 (20)	[47]	Daucosterol	15,0
8	E21.2	RP-18 (M:W 1,5:1)	BA4 (19)	[31]	Sumaresinolic acid	3,0

Chú thích: KH: Kí hiệu; KL: Khối lượng



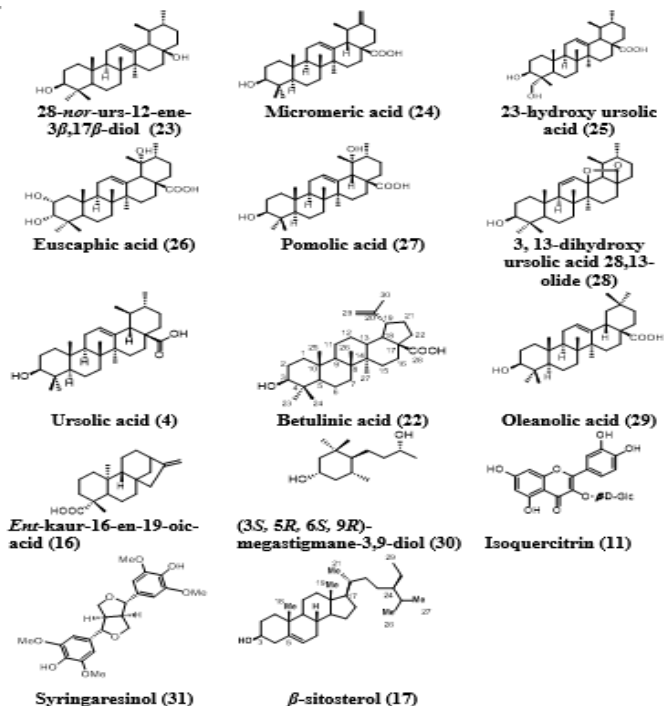
Hình 3.13. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ lá của loài *A. bockiana*

3.3.1.3. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ loài *A. glischroloma*

Từ lá của loài *A. glischroloma* phân lập được 14 hợp chất, cụ thể là: 28-nor-urs-12-ene-3 β ,17- β -diol (23), micromeric acid (24), 23-hydroxy ursolic acid (25), euscaphic acid (26), pomolic acid (27), 3,13-dihydroxy ursolic acid -28,13-olide (28), ursolic acid (4), betulinic acid (22), oleanolic acid (29), ent-kaur-16-en-19-oic-acid (16), (3S, 5R, 6S, 9R)-megastigmane-3,9-diol (30), quercetine-3-glucoside hoặc isoquercetin (11), syringaresinol (31) và β -sitosterol (17) (Bảng 3.15, Hình 3.14).

Bảng 3.15. Kết quả phân lập và xác định công thức hóa học của các hợp chất từ lá của loài *A. glischroloma*

TT	Phân đoạn	Phương pháp phân lập	KH hợp chất	TLTK	Tên hợp chất	KL hợp chất (mg)
1	E3.7	Silicagel c, c (H:E 9:1)	AG16 (16)	[70]	Ent-kaur-16-en-19-oic-acid	3,1
2	E4	Silicagel c, c (H:D 5:1)	AG29 (17)	[123]	β -sistosterol	7,2
3	E4.2	Silicagel c, c (H:A 30:1)	AG2 (23)	[28]	28-nor-urs-12-ene-3 β ,17 β -diol	3,4
4	E6.6.3	RP-18 (M:W 10:1)	AG14 (22)	[65]	Betulinic acid	6,2
5	E6.6.5	RP-18 (M:W 10:1)	AG15 (29)	[19]	Oleanolic acid	5,5
6	E9.4	Silicagel c, c (H:E 9:1)	AG10 (28)	[18]	3, 13-dihydroxy ursolic acid 28, 13-olide	2,2
7	E9.7.1	Sephadex (MeOH)	AG18 (30)	[122]	(3S, 5R, 6S, 9R)-megastigmane-3,9-diol	3,2
8	E9.7.4	Silicagel c, c (H:E 9:1)	AG3 (24)	[21]	Micromeric acid	2,3
9	E9.7.6	RP-18 (M:W 1:1)	AG8 (27)	[127]	Pomolic acid	10,0
10	E12.2	Silicagel c, c (H:A 4:1)	AG28 (25)	[22], [27]	23-hydroxyursolic acid	4,2
11			AG11 (4)	[19]	Ursolic acid	3,2
12	E15.2.1	Silicagel c, c (D:M 100:1)	AG21 (31)	[114]	Syringaresinol	4,0
13	E15.2.5	RP-18 (A:W 1:1)	AG7 (26)	[147]	Euscaphic acid	2,0
14	W3.7.1	Sephadex (MeOH)	AG19 (11)	[75]	Isoquercetine	6,0



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ lá của loài *A. glischroloma*

3.3.2. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập từ ba loài nghiên cứu

3.3.2.1. Hoạt tính kháng khuẩn của một số hợp chất phân lập được

Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của các hợp chất được thể hiện ở **bảng 3.18**.

Có 2/14 hợp chất ((**1**) và (**12**)) không có khả năng ức chế sự phát triển của bất kỳ chủng vi khuẩn nào ($H = 0$), trong đó (**1**) là hợp chất mới (Debutyldorycnic acid). Các hợp chất còn lại có hoạt tính kháng khuẩn với các mức độ khác nhau tùy thuộc vào nồng độ hợp chất và chủng vi khuẩn thử nghiệm. Hầu hết các hợp chất ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ không có khả năng ức chế sự phát triển của bất kỳ một chủng vi khuẩn nào (trừ (**4**) và (**11**)). Với mỗi chủng vi khuẩn nhất định thì khả năng kháng khuẩn của mỗi hợp chất tỷ lệ thuận với nồng độ thử nghiệm, các hợp chất có hoạt tính mạnh nhất ở nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$ (**Bảng 3.18**).

Bảng 3.18. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của một số hợp chất phân lập từ ba loài nghiên cứu

KH hợp chất	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Chủng vi khuẩn và đường kính vùng ức chế (mm)				
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. milleri</i>	<i>E. coli</i>
1	Không biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn ở bất kỳ nồng độ nào ($H = 0$)					
2	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	0	0	5,09 $\pm$ 1,05	0
3	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	17,23 $\pm$ 0,08	0	12,36 $\pm$ 1,12	0
4	100	4,21 $\pm$ 0,05	0	0	0	0
	200	20,22 $\pm$ 0,98	0	0	15,12 $\pm$ 0,89	0
	400	23,02 $\pm$ 1,05	0	0	20,13 $\pm$ 1,21	10,55 $\pm$ 0,73
6	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	6,78 $\pm$ 2,02	7,56 $\pm$ 1,47	0	8,86 $\pm$ 0,32	6,24 $\pm$ 1,19
7	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	0	9,21 $\pm$ 1,03	0	10,21 $\pm$ 0,82
8	100	0	0	0	0	0
	200	16,11 $\pm$ 1,03	0	0	17,47 $\pm$ 1,14	12,55 $\pm$ 0,84
	400	18,26 $\pm$ 1,07	16,48 $\pm$ 0,09	0	21,21 $\pm$ 1,42	14,02 $\pm$ 0,04
10	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	4,12 $\pm$ 0,67	11,12 $\pm$ 2,03	9,34 $\pm$ 0,75	0
11	100	6,67 $\pm$ 1,54	0	0	0	0
	200	17,09 $\pm$ 1,04	0	17,31 $\pm$ 0,25	18,26 $\pm$ 1,36	5,08 $\pm$ 1,57
	400	21,01 $\pm$ 2,11	0	22,18 $\pm$ 0,48	23,15 $\pm$ 1,66	17,32 $\pm$ 1,09
12	Không biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn ở bất kỳ nồng độ nào ($H = 0$)					
17	100	0	0	0	0	0
	200	0	4,56 $\pm$ 0,93	0	5,22 $\pm$ 0,99	6,36 $\pm$ 1,13
	400	0	17,35 $\pm$ 1,4	0	17,92 $\pm$ 0,0	18,21 $\pm$ 1,5

KH hợp chất	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Chủng vi khuẩn và đường kính vùng ức chế (mm)				
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. milleri</i>	<i>E. coli</i>
1	Không biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn ở bất kỳ nồng độ nào ($H = 0$)					
			7		8	4
22	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	$6,15 \pm 1,32$	0	0
	400	$8,05 \pm 1,04$	0	$9,65 \pm 0,86$	0	$7,23 \pm 0,76$
27	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	$6,34 \pm 1,05$	$10,22 \pm 1,75$	$8,58 \pm 0,05$	$5,08 \pm 1,52$
31	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	0	0	$6,12 \pm 0,98$	0
DMSO	1%	0	0	0	0	0
KS	200	$22,85 \pm 0,67$	$23,01 \pm 1,65$	$18,14 \pm 0,21$	$26,57 \pm 1,02$	$23,00 \pm 0,86$

Chú thích: 1: Debutyldorycnic acid; 2: Adinanquercetiside, 3: Coniferyl aldehyde; 4: Ursolic acid; 6: Methyl gallate; 7: 24-hydroxytormentic acid; 8: Gallic acid; 10: Scopoline; 11: Isoquercetine; 12: Horidin; 17: β -sistosterol; 22: Betulinic acid; 27: Pomolic acid; 31: Syringaresinol.

Trong phạm vi nghiên cứu thì ursolic acid (**4**), isoquercetine (**11**) là những hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất. Cụ thể, hợp chất (**4**) ức chế mạnh vi khuẩn *P. aeruginosa* và hợp chất (**11**) với đối *C. freundii*, *S. milleri*.

3.3.2.2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được

Kết quả xác định hoạt tính gây độc tế bào ung thư của 18 hợp chất cho thấy, hợp chất 23-hydroxyursolic acid (**25**) có hoạt tính gây độc mạnh trên cả hai dòng tế bào HepG2 ($IC_{50} = 3,28 \mu\text{g/mL}$), MCF-7 ($IC_{50} = 1,16 \mu\text{g/mL}$) và không gây độc với dòng tế bào phôi thận bình thường (HEK-293A).

Bảng 3.19. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất

KH hợp chất	Tên hợp chất	IC ₅₀ (µg/mL)				
		SK- LU-1	MKN- 7	HEK- 293A	HepG2	MCF-7
1	Debutyldorycnic acid	> 200	> 200	> 200	> 200	-
2	Adinanquercetiside	> 200	> 200	> 200	> 200	-
4	Ursolic acid	> 200	> 200	> 200	> 200	-
5	4,5-dihydroblumenol	> 200	> 200	> 200	> 200	-
7	24-hydroxytormentic	181,89± 3,11	189,03± 3,02	191,87± 2,94	179,37± 2,86	-
9	Convoldorin	> 200	> 200	> 200	> 200	-
10	Scopoline	> 200	> 200	> 200	32,00±0,75	43,63±1,34
12	Horidin	> 200	> 200	> 200	> 200	-
13	Pinoresinol-4'-O-β-D-glucopyranoside	> 200	> 200	> 200	> 200	-
14	Syringaresinol-4'-O-β-D-glucopyranoside	> 200	> 200	> 200	> 200	-
15	Camellikaempferoside B	> 200	> 200	> 200	> 200	-
16	Kaurenoic acid	-	-	>128	67,03±1,62	65,19±1,69
23	28-nor-urs-12-ene-3β,17 β-diol	-	-	>128	72,41±1,03	79,44±0,79
24	Micromeric acid	-	-	>128	>128	>128
25	23-hydroxyursolic acid	-	-	>128	3,28±0,17	1,16±0,03
26	Euscaphic acid	-	-	>128	>128	>128
29	Oleanolic acid	-	-	>128	>128	98,28±3,23
30	3S, 5R, 6S, 9R)-megastigmane-3,9-diol	-	-	>128	>128	>128
ĐC (+)	Ellipticine	0,34 ± 0,05	0,42 ± 0,05	0,32± 0,03	0,47± 0,06	0,43±0,02
ĐC (-)	DMSO	Không có khả năng gây độc bất kỳ dòng tế bào nào				

Chú thích: (-): Không thử nghiệm

3.3.2.3. Hoạt tính ức chế α-glucosidase của các hợp chất phân lập được

Kết quả **bảng 3.20** cho thấy, có 7/18 hợp chất có tác dụng ức chế α-glucosidase với các mức độ khác nhau, 11 hợp chất không có hoạt tính này (trong đó có hai hợp chất mới). Cụ thể, các hợp chất **(4)**, **(5)**, **(7)**, **(16)**, **(23)**, **(25)** và **(29)** có khả năng ức chế α-glucosidase với giá trị IC₅₀ dao động từ 1,00-98,91 µg/mL; các hợp chất này đều có hiệu

quả ức chế mạnh hơn đối chứng ($IC_{50} = 147 \mu\text{g/mL}$) và giá trị IC_{50} lần lượt của các hợp chất **(4)**, **(5)**, **(7)**, **(16)**, **(23)**, **(25)**, **(29)** là 27,52; 13,67; 18,38; 13,08; 98,91; 1,00; 4,16 $\mu\text{g/mL}$. Trong đó, 23-hydroxyursolic acid **(25)** có hoạt tính mạnh nhất với $IC_{50} = 1,00 \mu\text{g/mL}$ cao gấp khoảng 147 lần đối chứng. Các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase ($IC_{50} > 128 \mu\text{g/mL}$) trong đó có hai hợp chất mới.

Bảng 3.20. Hoạt tính ức chế α -glucosidase của các hợp chất phân lập được

KH hợp chất	Tên hợp chất	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	KH hợp chất	Tên hợp chất	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	Debutylorycnic acid	> 128	15	Camellikaempferoside B	> 128
2	Adinanquercetiside	> 128	16	Kaurenoic acid	13,08 $\pm$ 0,94
4	Ursolic acid	27,52 $\pm$ 0,51	23	28-nor-urs-12-ene-3 β ,17 β -diol	98,91 $\pm$ 5,78
5	4,5-dihydroblumenol	13,67 $\pm$ 0,42	24	Micromeric acid	>128
7	24-hydroxytormentic	18,38 $\pm$ 0,41	25	23-hydroxyursolic acid	1,00 $\pm$ 0,07
9	Convoldorin	> 128	26	Euscaphic acid	>128
10	Scopoline	> 128	29	Oleanolic acid	4,16 $\pm$ 0,27
12	Horidin	> 128			
13	Pinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside	> 128	30	3S, 5R, 6S, 9R)-megastigmane-3,9-diol	>128
14	Syringaresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside	> 128	ĐC	Acarbose	147,86 $\pm$ 4,69

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* (mã số MW699853.1) với kích thước 156284 bp, có cấu trúc bốn vùng điển hình gồm: vùng LSC (85693 bp), vùng SSC (18411 bp) và cặp vùng IRa và IRb (26090 bp/vùng), hàm lượng GC chiếm 37,4%, có 129 gene, 70 trình tự lặp lại và 51 SSR. Trong hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*, gene *ycf1* không được tìm thấy tại ranh giới giữa IRa và SSC giống như các loài khác trong chi *Adinandra*. Các loài thuộc chi *Adinandra* có sự sai khác về số lượng gene của hệ gene lục lạp, loài *A. bockiana* (129 gene), loài *A. megaphylla* (131 gene), loài *A. millettii* và loài *A. angustifolia* (132 gene).

1.2. Các biến thể trình tự gene tìm thấy chủ yếu ở vùng không mã hóa. Trong vùng mã hóa, các gene *matK*, *psaA*, *ndhK*, *ndhG* và *rbcL* có các đoạn nucleotide khác nhau giữa bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia*. Vùng LSC và SSC chứa nhiều biến thể hơn vùng IR, trong đó vùng LSC chứa nhiều biến thể nhất. Gene *matK* và *rbcL* được đề xuất là ứng viên mã vạch DNA tiềm năng giúp hỗ trợ nhận diện loài thuộc chi *Adinandra*.

1.3. Phân lập được 15 hợp chất từ loài *A. megaphylla*, 8 hợp chất từ loài *A. bockiana*, 14 hợp chất từ loài *A. glischroloma*; trong đó có hai chất mới được đặt tên là debutyldorycnic acid và adinanquercetiside. Các hợp chất phân lập được từ ba loài đa số thuộc nhóm triterpenoid. Hợp chất 23-hydroxyursolic acid phân lập từ loài *A. glischroloma* có hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan (HepG2) và ung thư vú (MCF-7) mạnh nhất với giá trị IC_{50} lần lượt là 3,28 $\mu\text{g/mL}$ và 1,16 $\mu\text{g/mL}$. Hợp chất 23-hydroxyursolic acid có hoạt tính ức chế α -glucosidase mạnh nhất ($IC_{50} = 1,00 \mu\text{g/mL}$). Ursolic acid có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất với chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* và isoquercetine với chủng *C. freundii*, *S. milleri*.

2. Kiến nghị

2.1. Tiếp tục phân tích trình tự hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Adinandra* để cung cấp thêm dữ liệu, tìm kiếm các vùng gene tiềm năng làm mã vạch DNA phục vụ định danh loài.

2.2. Tiếp tục đánh giá các hoạt tính chống oxy hóa, kháng viêm, kháng virus của hai hợp chất mới (debutyldorycnic acid và adinanquercetiside) nhằm xác định tiềm năng ứng dụng của các hợp chất này trong thực tiễn.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Pho Thi Thuy Hang**, Nguyen Thi Thu Nga, Sy Danh Thuong, Le Nguyen Thanh, Nguyen Van Phuong, Chu Hoang Mau, Nguyen Huu Quan (2024), “Chemical constituents of *Adinandra glischroloma* Hand.-Mazz. and their chemotaxonomic significance”, *Biochemical Systematics and Ecology*, (SCIE, Q3, IF: 1,4), 113, 104803. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2024.104803>
2. Quan N. H., **Hang P. T. T.**, Nga N. T. T., Duc H. V., Hue V. T., Thuong S. D., Thanh L. N., Mau C. H. (2023), “Chemical constituents and biological activities of the leaves of *Adinandra megaphylla*”, *Phytochem. Lett*, (SCIE, Q2, IF: 1,873), 56, pp. 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.06.002>
3. Nga Thi Thu Nguyen, **Hang Thi Thuy Pho**, Quan Huu Nguyen, Nhung Thi Doan, Lan Thi Ngoc Nguyen, Huong Mai Pham, Lam Tung Le, Thuong Danh Sy, Ha Hoang Chu, Lien Thi Kim Vu, Mau Hoang Chu (2023), “Characteristics of the chloroplast genome of *Adinandra bockiana* and comparative analysis with species of *Pentaphylacaceae* family”, *Plant Molecular Biology Reporter*, (SCIE, Q2, IF: 1,816), 41, pp. 611-621. <https://doi.org/10.1007/s11105-023-01389-3>.
4. **Phó Thị Thúy Hằng**, Trần Đại Dương, Nguyễn Thị Thu Nga, Từ Quang Tân, Nguyễn Hữu Quân, Chu Hoàng Mậu (2022), “Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cao chiết từ thân của loài Sum lông”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 227(05), tr. 186-194. DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5561>