

KHẢO SÁT HIỆU ỨNG GÂY TỬ VONG CỦA AZADIRACHTIN LÊN TẾ BÀO ẤU TRÙNG NGÀI GẠO (*CORCYRA CEPHALONICA* ST.) NUÔI CÂY *IN VITRO*

Lê Thị Thanh Phượng¹, Nguyễn Tiên Thắng¹, Bùi Cách Tuyên², Nguyễn Ngọc Như Băng³, Phan Lê Khoa³, Phan Kim Ngọc³

¹Viện Sinh học nhiệt đới

²Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Việc lạm dụng thuốc trừ sâu tổng hợp đã dẫn đến những hậu quả nghiêm trọng như sự kháng thuốc, bùng nổ dịch bệnh và nhiều tác hại khác đối với thiên địch và môi trường, từ đó đã thúc đẩy nhu cầu nghiên cứu thuốc trừ sâu thiên nhiên với hiệu quả phòng trị và độ an toàn sinh học cao. Vì vậy, việc sử dụng hoạt chất sinh học gốc thảo mộc từ lâu đã được khuyến cáo ở nhiều nước. Trong đó, cây neem (*Azadirachta indica* A. Juss) được xem là một trong những ứng cử viên tiềm năng. Hơn 120 hoạt chất sinh học đã được phát hiện từ cây neem; trong đó, tiêu biểu nhất là azadirachtin, hiện diện chủ yếu ở nhân hạt. Azadirachtin được báo cáo là có tác động đến côn trùng qua nhiều phương thức như gây ngán ăn, xua đuổi, gây chết, ức chế sinh trưởng và sinh sản. Tuy nhiên, vẫn còn rất ít nghiên cứu về tác động của azadirachtin lên côn trùng ở mức độ tế bào. Đặc biệt, chưa có công bố nào về tác động của azadirachtin lên tế bào ngài gạo (*Corcyra cephalonica*), một loài côn trùng hại kho rất phổ biến ở nhiều nước. Nghiên cứu này lần đầu tiên báo cáo quy trình nuôi cấy tế bào ngài gạo và tác động của azadirachtin đối với chúng. Tế bào thu từ ấu trùng ngài gạo giai đoạn 3 - 5 ngày tuổi được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường Grace chứa 10% huyết thanh. Sau một thời gian nuôi cấy nhằm đạt số lượng thích hợp, tế bào ngài gạo được cấy vào đĩa 96 giếng để khảo sát đường cong tăng trưởng và xác định pha lũy thừa của tế bào. Tác động gây chết tế bào ngài gạo của azadirachtin được khảo sát bằng phương pháp sử dụng thuốc nhuộm trypan blue. Kết quả bước đầu cho thấy azadirachtin ở nồng độ 5 μM trong môi trường nuôi cấy có hiệu lực gây chết 81,5% tế bào ấu trùng ngài gạo sau 5 ngày xử lý.

Từ khóa: Azadirachtin, hiệu ứng gây tử vong, ngài gạo (*Corcyra cephalonica* St.), tế bào nuôi cấy, trypan blue

MỞ ĐẦU

Azadirachtin, hoạt chất limonoid tiêu biểu nhất của cây neem (*Azadirachta indica* A. Juss) từ lâu được biết đến như là chất ức chế sinh trưởng, xua đuổi, gây ngán ăn và gây chết đối với nhiều loài côn trùng gây hại.

Nhiều mô hình nghiên cứu tác động của azadirachtin đối với cá thể côn trùng đã được thực hiện (Aritakula *et al.*, 2007; Dennis, 1992). Tuy nhiên, vẫn còn rất ít nghiên cứu về tác động của azadirachtin lên tế bào côn trùng. Năm 1993, Rembold và Annadurai lần đầu tiên ghi nhận sự giảm số lượng của lớp đơn tế bào côn trùng Sf9 khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung azadirachtin nồng độ 5 μM sau 48 h. Dù cơ chế tác động của azadirachtin lên tế bào côn trùng vẫn còn nhiều điều chưa sáng tỏ, nhưng azadirachtin được cho là có tác động lên sự phân chia tế bào, giống tác động của colchicine, taxol và *Vinca* alkaloid (Linton *et al.*, 1997; Mordue, 1998; Akudugu *et al.*, 2001). Năm

2003, Salehzadeh và đồng tác giả công bố tác động ức chế sự phân bào của azadirachtin đối với dòng tế bào *Spodoptera frugiperda* Sf9 và *Aedes albopictus* C6/36 với giá trị EC_{50} (nồng độ azadirachtin cần thiết để ức chế 50% sự phân bào) tương ứng là 0,15 nM và 6,3 nM sau 96 h nuôi cấy. Sự tăng sinh của dòng tế bào ruồi *Drosophila melanogaster* Kc167 bị ức chế 50% sau 48 h nuôi cấy trong môi trường chứa 0,17 μM azadirachtin. Ở nồng độ cao hơn 0,5 μM trong môi trường nuôi cấy, azadirachtin có tác dụng phá hủy nhân tế bào *D. melanogaster* Kc167 (Robertson *et al.*, 2007).

Thời gian gần đây, diện tích trồng neem phát triển mạnh ở vài tỉnh phía Nam, đặc biệt, ở Ninh Thuận và Bình Thuận, diện tích trồng neem đạt hơn 5000 ha, trong đó hàng nghìn ha đã cho quả, là nguồn nguyên liệu khá lớn cung cấp hoạt chất limonoid. Các nghiên cứu về nhóm hoạt chất này cũng đã được thực hiện ở nước ta (Dương Anh Tuấn *et al.*, 2001; Nguyễn Tiên Thắng *et al.*, 2003; Trần Kim Qui, 2005), chủ yếu liên quan đến nghiên cứu

thu nhận và sử dụng hoạt chất limonoid trong công tác đấu tranh sinh học, sau thu hoạch... Hiện chưa có công trình nào nghiên cứu hoạt tính gây chết của azadirachtin lên tế bào ngài gạo (*Corcyra cephalonica* St.) nuôi cấy *in vitro*. Nội dung thông báo này liên quan đến việc lần đầu tiên xây dựng được quy trình nuôi cấy tế bào ngài gạo *in vitro* và khảo sát hoạt tính gây chết của azadirachtin ở nồng độ 5 μM lên tế bào ấu trùng ngài gạo nuôi cấy *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất

Azadirachtin A chuẩn có độ tinh sạch 97,51% do công ty Trifolio - M GmbH của Đức cung cấp.

Thu nhận tế bào ngài gạo

Nguồn ấu trùng ngài gạo do Viện Sinh học nhiệt đới cung cấp, được tiếp tục nhân nuôi tại Phòng thí nghiệm của Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ sinh học Động vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. Môi trường nhân nuôi: cám gạo, ẩm độ: 75 - 85%, nhiệt độ: 28 - 30°C (Lê Thị Thanh Phương, 2004). Ấu trùng ngài gạo giai đoạn từ 1 - 5 ngày tuổi đạt độ dài 2 - 13 mm, màu trắng hồng, đốt bụng cuối có 4 đôi móc câu.

Ấu trùng ngài gạo từ 1 - 5 ngày tuổi được gắp ra khỏi môi trường sống, rửa qua bằng cồn 70° và rửa lại bằng nước cất 2 lần. Sau đó, ấu trùng được cho vào đĩa petri vô trùng và dùng kim tiêm để tách lấy phần mô dưới lớp da dưới kính hiển vi soi nổi. Mô được thu nhận vào eppendorf chứa sẵn dung dịch PBSA (2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 136,9 mM NaCl; 8,1 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,4) vô trùng (Lynn, 1996).

Giai đoạn 1: Nuôi cấy sơ cấp tế bào ngài gạo

Quy trình nuôi cấy sơ cấp tế bào ngài gạo được tiến hành như sau: mô sau khi rửa trong PBSA được chuyển vào các đĩa petri Ø 35 mm. Sau đó, đặt lamelle lên trên các mảnh mô, đè nhẹ lamelle để tách rời các tế bào của mảnh mô (do tế bào côn trùng liên kết với nhau rất lỏng lẻo). Tiếp theo bổ sung môi trường Grace chứa 10% huyết thanh vào đĩa nuôi, đặt trong tủ nuôi ở 27°C, 5% CO_2 (Grace, 1962).

Sau mỗi 24 h, sự tăng trưởng của tế bào được ghi nhận thông qua quan sát dưới kính hiển vi soi ngược. Các đĩa nuôi được thay môi trường mới sau

mỗi 48 h. Quá trình trên được lặp lại cho đến khi tế bào phát triển đạt 70 - 80% bề mặt đĩa nuôi cấy (Granados, McKenna, 1995; Vlak *et al.*, 1996; Freshney, 2005).

Giai đoạn 2: Nuôi cấy thứ cấp - cấy chuyển tăng sinh tế bào ngài gạo

Khi số lượng tế bào ngài gạo đạt 70 - 80% bề mặt đĩa nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển nhằm cung cấp không gian và chất dinh dưỡng cho tế bào. Quy trình được tiến hành như sau: loại bỏ môi trường cũ và rửa tế bào bằng PBSA có bổ sung gentamycin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), lặp lại hai lần. Sau đó, bổ sung 0,25% trypsin - EDTA vừa tráng đủ bề mặt đĩa nuôi. Ủ ở 27°C, từ 2 - 3 phút. Sau đó, lắc nhẹ đĩa nuôi cấy để tách tế bào ra khỏi bề mặt nuôi cấy. Tiến hành quan sát dưới kính hiển vi soi ngược, khi thấy tế bào co tròn và tách khỏi bề mặt đĩa nuôi thì bổ sung môi trường Grace chứa 10% huyết thanh để trung hòa trypsin. Dịch huyền phù tế bào được ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút. Cặn tế bào được tái huyền phù bằng môi trường Grace chứa 10% huyết thanh và chia vào các dụng cụ nuôi mới (Lynn, 2002; Vaughn, 2006). Quy trình trên được lặp lại nhiều lần để thu đủ số lượng tế bào phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Khảo sát đường cong tăng trưởng và xác định pha lũy thừa của tế bào ấu trùng ngài gạo

Mật độ tế bào được xác định bằng buồng đếm Neubauer với thuốc nhuộm trypan blue. Điều chỉnh mật độ tế bào về $3,2 \times 10^5$ tế bào/ml. Sau đó cho vào các giếng của đĩa 96 giếng, mỗi giếng 150 μl . Đặt đĩa vào tủ nuôi ở 27°C, 5% CO_2 .

Sau mỗi 24 h, tế bào trong 10 giếng được tách ra và xác định lại mật độ. Thực hiện khảo sát này trong 10 ngày liên tục. Ghi nhận số liệu và xác định đường cong tăng trưởng của tế bào ngài gạo.

Khảo sát hoạt tính gây chết tế bào ngài gạo của azadirachtin

Khảo sát tác động của azadirachtin lên tế bào ấu trùng ngài gạo theo thời gian

Tế bào ấu trùng ngài gạo được nuôi cấy trong bình Roux 25 cm^2 đến khi mọc kín diện tích bề mặt bình nuôi. Hút bỏ môi trường nuôi, tách bằng 0,25% trypsin - EDTA. Ly tâm, loại bỏ dịch nổi, thu huyền phù tế bào bằng môi trường Grace chứa 10% huyết thanh. Cho 20 μl dịch huyền phù vào eppendorf để xác định mật độ tế bào sống trong dịch huyền phù bằng buồng đếm Neubauer với thuốc nhuộm trypan

blue. Mật độ tế bào nằm trong khoảng 10^5 - 10^6 tế bào/ml. Sau đó điều chỉnh mật độ tế bào về $3,2 \times 10^5$ tế bào/ml. Lấy thể tích huyền phù khoảng 250 μ l cho vào các giếng của đĩa 96 giếng. Tế bào được ủ trong tủ nuôi ở 27°C, 5% CO₂. Sau 72 h thay môi trường cũ bằng 250 μ l môi trường mới chứa azadirachtin ở nồng độ 5 μ M và tiếp tục nuôi trong 5 ngày. Sau mỗi 2 ngày, thay môi trường mới chứa azadirachtin ở nồng độ như trên.

Khảo sát tác động gây chết tế bào của azadirachtin sau mỗi 24 h bằng phương pháp sử dụng thuốc nhuộm trypan blue. Lô đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không xử lý azadirachtin. Thí nghiệm được lặp lại 15 lần. Các giếng thí nghiệm luôn được bảo đảm đồng đều về điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, pH, thời gian...), với số lượng tế bào và thể tích môi trường tương đương nhau. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel.

Phương pháp sử dụng trypan blue

Phương pháp sử dụng trypan blue nhuộm tế bào để phân biệt tế bào sống và tế bào chết trong buồng đếm Neubauer. Trypan blue là thuốc nhuộm màu xanh dương chỉ thấm qua màng tế bào đã chết. Do đó khi dịch huyền phù tế bào được hòa với trypan blue, những tế bào sống có kích thước nhỏ, tròn và khúc xạ, còn tế bào chết phồng lên, lớn hơn và có màu xanh đen.

Quy trình được tiến hành như sau: vào thời điểm quan sát, cho 20 μ l 0,25% trypsin - EDTA vào mỗi giếng để tách tế bào. Sau đó thêm 20 μ l môi trường Grace chứa 10% huyết thanh vào, trộn đều, hút 20 μ l cho vào eppendorf. Rửa sạch buồng đếm Neubauer bằng nước cất, lau bằng cồn rồi sấy khô. Đặt miếng lamelle lên buồng đếm và ép nó dính vào buồng đếm. Thêm 20 μ l thuốc nhuộm trypan blue 0,4% vào eppendorf trộn đều rồi cho từ từ dịch tế bào vào buồng đếm. Đếm số tế bào sống trong 5 ô lớn (4 ô ở góc và 1 ô ở trung tâm). Mỗi mẫu đếm 3 lần, số lượng tế bào có trong mẫu được xác định bằng giá trị trung bình của các lần đếm.

Hiệu lực gây chết tế bào ấu trùng ngài gạo của azadirachtin được tính theo công thức Abbott như sau:

$$H(\%) = [(N_{DC} - N_{TN}) / N_{DC}] \times 100\%$$

H: Hiệu lực gây chết tế bào ấu trùng ngài gạo;

N_{DC}: Số lượng tế bào sống ở lô đối chứng;

N_{TN}: Số lượng tế bào sống ở lô xử lý azadirachtin.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận tế bào ngài gạo

Kết quả xử lý cho thấy, tế bào ngài gạo thu nhận từ ấu trùng ngài gạo 3 - 5 ngày tuổi đạt hiệu quả nuôi cao nhất: sau 8 ngày nuôi, số đĩa có tế bào sống và tăng trưởng là 28 đĩa, kết quả tương tự cho ấu trùng 1 - 2 ngày tuổi là 11 và ấu trùng lớn hơn 5 ngày tuổi là 2.

Nguyên nhân là do ấu trùng 3 - 5 ngày tuổi có kích thước vừa phải nên dễ dàng tách bỏ phần da ngoài và thu nhận lớp mô bên dưới, cũng như tách bỏ phần ruột chứa vi sinh bên trong. Bên cạnh đó, tế bào đã đủ trưởng thành và có sức đề kháng tốt nên tỷ lệ sống của tế bào trong giai đoạn này là cao nhất. Do đó, ấu trùng ngài gạo 3 - 5 ngày tuổi được chọn để thu nhận tế bào phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Giai đoạn 1: Nuôi cấy sơ cấp tế bào ngài gạo

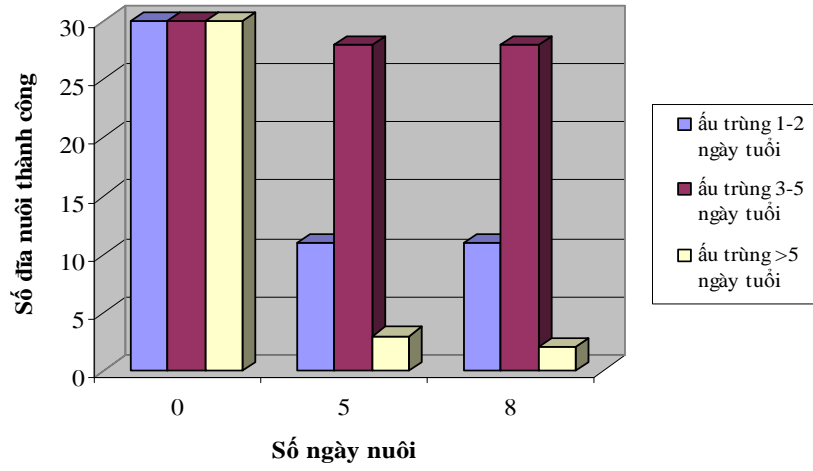
Sau 2 ngày nuôi cấy ở giai đoạn 1, các tế bào ngài gạo bắt đầu liên kết lại với nhau và bám vào bề mặt đĩa nuôi. Trong giai đoạn này, các tế bào hồi phục dần những tổn thương do quá trình phân tách tế bào gây ra.

Sau 3 ngày nuôi cấy, môi trường nuôi được loại bỏ và thay vào môi trường mới nhằm cung cấp chất dinh dưỡng cũng như loại bỏ tế bào chết và các tạp chất gây trở ngại cho sự tăng sinh của tế bào. Lúc này, tế bào đã thích nghi với môi trường nên bám tốt và bắt đầu tăng sinh.

Sau 5 ngày nuôi cấy, quần thể tế bào phát triển tốt, hình dạng bên ngoài của tế bào thay đổi, thường có dạng hơi kéo dài. Đây là giai đoạn tế bào phát triển tốt nhất, quá trình tăng sinh và phân chia tế bào diễn ra mạnh mẽ.

Sau 8 ngày nuôi cấy, tế bào ngài gạo bám đều và chiếm 70 - 80% diện tích đĩa nuôi, tiến hành cấy chuyển để cung cấp không gian sống và dưỡng chất cho chúng.

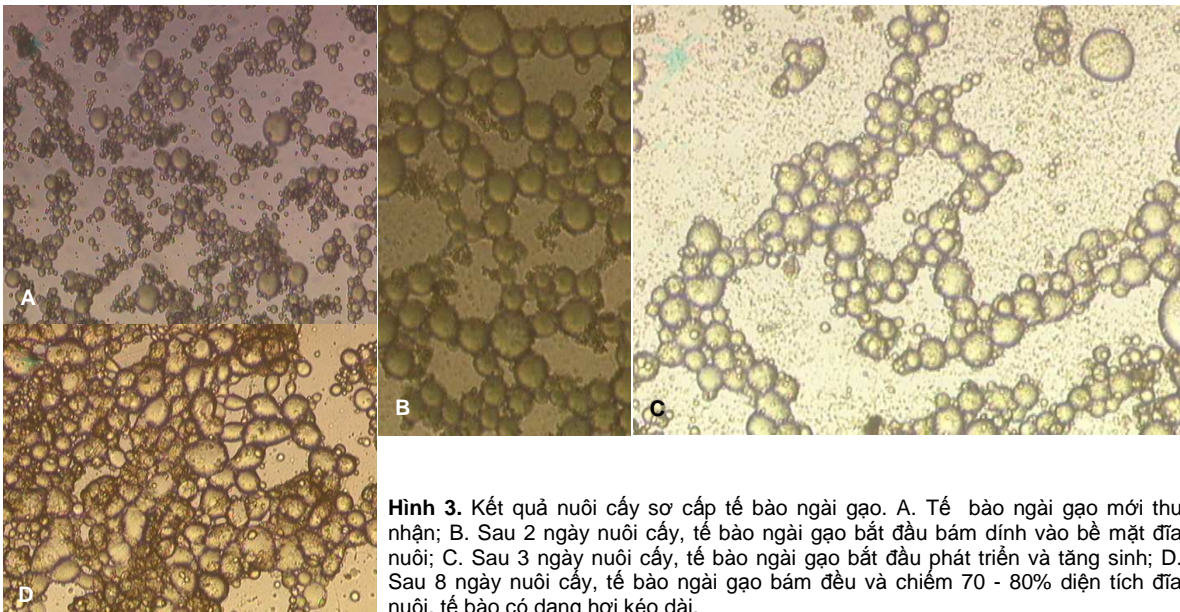
Sau khi cấy chuyển, tế bào ngài gạo có dạng hình tròn và trôi lơ lửng trong môi trường nuôi. Sau 2 ngày nuôi cấy, tế bào ngài gạo bắt đầu bám và tăng sinh. Tế bào tăng sinh mạnh sau 3 ngày nuôi cấy. Quá trình trên được lặp lại nhiều lần cho đến khi thu được đủ số lượng tế bào phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Biểu đồ số đĩa nuôi mô tế bào ngài gạo thành công theo độ tuổi ấu trùng: 1 - 2 ngày, 3 - 5 ngày và > 5 ngày.



Hình 2. A. Ấu trùng ngài gạo 3 ngày tuổi; B. 4 ngày tuổi; C. 5 ngày tuổi.



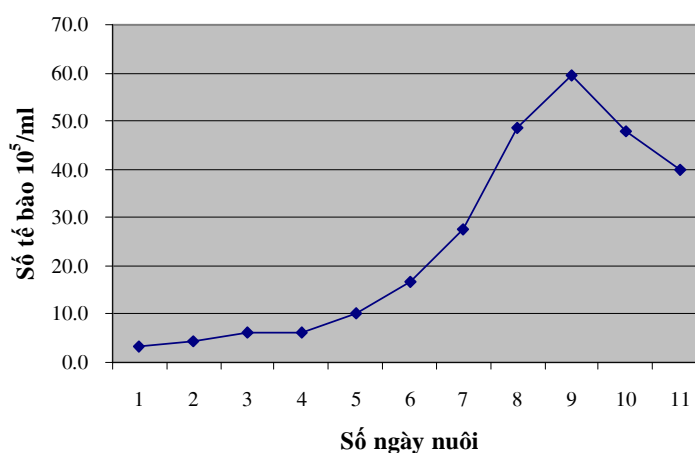
Hình 3. Kết quả nuôi cấy sơ cấp tế bào ngài gạo. A. Tế bào ngài gạo mới thu nhận; B. Sau 2 ngày nuôi cấy, tế bào ngài gạo bắt đầu bám dính vào bề mặt đĩa nuôi; C. Sau 3 ngày nuôi cấy, tế bào ngài gạo bắt đầu phát triển và tăng sinh; D. Sau 8 ngày nuôi cấy, tế bào ngài gạo bám đều và chiếm 70 - 80% diện tích đĩa nuôi, tế bào có dạng hơi kéo dài.

Khảo sát đường cong và xác định pha lũy thừa tăng trưởng của tế bào ngàii gạo

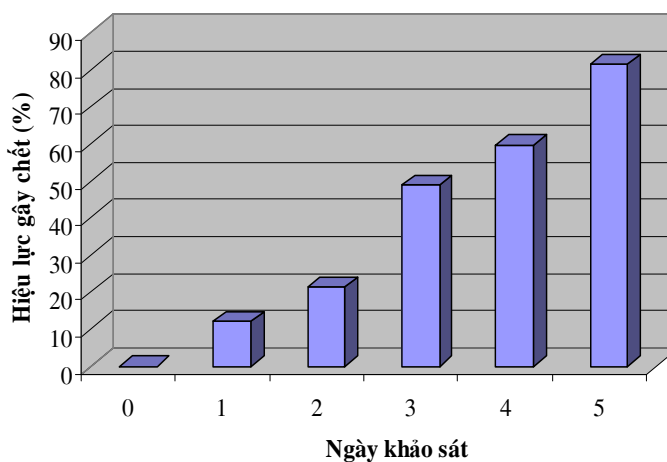
Kết quả khảo sát đường cong tăng trưởng cho thấy, có thể chia quá trình tăng trưởng của tế bào ngàii gạo nuôi cấy *in vitro* làm 3 giai đoạn: Giai đoạn đầu (ngày 0 - ngày thứ 4): số lượng tế bào thay đổi không đáng kể, chỉ tăng từ $3,2 \times 10^5$ tế bào/ml đến $10,1 \times 10^5$ tế bào/ml. Đây là giai đoạn tế bào phục hồi các tổn thương do quá trình phân tách tế bào gây ra và bắt đầu thích nghi với môi trường nuôi cấy. Giai đoạn hai (ngày thứ 5 - ngày thứ 8): tế bào ổn định và đi vào pha tăng trưởng. Tế bào phát triển và tăng sinh mạnh. Dưới các điều kiện nuôi cấy tối ưu, mật độ tế bào tăng liên tục và đạt cao nhất ($5,95 \times$

10^6 tế bào/ml) vào ngày thứ 8. Giai đoạn ba (ngày thứ 9 - ngày thứ 10): số lượng tế bào bắt đầu giảm, chỉ còn $4,8 \times 10^6$ tế bào/ml vào ngày thứ 9 và tiếp tục giảm còn $3,99 \times 10^6$ tế bào/ml vào ngày thứ 10. Đây là giai đoạn suy thoái do tế bào đã phủ kín giếng nuôi nên không còn không gian cho tế bào tăng sinh, tế bào càng già đi và tế bào mới sinh ra ít hơn.

Đường cong tăng trưởng cho thấy tế bào ấu trùng ngàii gạo nuôi cấy *in vitro* sau 3 ngày nuôi đã ổn định và đi vào pha tăng trưởng từ ngày thứ 3 đến thứ 8 trong một lần nuôi. Như vậy, thời điểm tối ưu để khảo sát tác động của azadirachtin lên tế bào ngàii gạo bắt đầu từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 8, kéo dài trong 5 ngày.



Hình 4. Đồ thị đường cong tăng trưởng của tế bào ngàii gạo.



Hình 5. Biểu đồ hiệu lực gây chết của azadirachtin đối với tế bào ngàii gạo.

Hiệu lực gây chết tế bào ngài gạo của azadirachtin

Kết quả khảo sát bằng phương pháp sử dụng trypan blue cho thấy: azadirachtin ở nồng độ 5 μM có khả năng gây chết tế bào ngài gạo nuôi cấy *in vitro* và hiệu lực này tăng dần theo thời gian xử lý. Cụ thể trong 2 ngày đầu, hiệu lực gây chết tế bào của azadirachtin chưa cao, chỉ đạt từ 11,9% đến 21,3% so với đối chứng. Tuy nhiên, sang ngày thứ 3 và thứ 4, hiệu lực này tăng đột biến lên 48,9 - 59,8% và đạt đến 81,5% vào ngày thứ 5 sau xử lý.

KẾT LUẬN

Ấu trùng ngài gạo từ 3 - 5 ngày tuổi là thích hợp để tách tế bào. Đã tách và nuôi cấy thành công tế bào ngài gạo thu nhận từ ấu trùng ngài gạo 3 - 5 ngày tuổi trong môi trường Grace có bổ sung 10% huyết thanh.

Đã xác định được đường cong tăng trưởng của tế bào ngài gạo nuôi cấy *in vitro*: pha tăng trưởng của tế bào ngài gạo kéo dài từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 8, tế bào đạt mật độ cao nhất ($5,95 \times 10^6$ tế bào/ml) vào ngày thứ 8.

Azadirachtin ở nồng độ 5 μM gây chết tế bào ngài gạo nuôi cấy *in vitro* với hiệu quả gây chết đạt xấp xỉ 50% vào ngày thứ 3 và đạt 81,5% vào ngày thứ 5 sau khi xử lý, tương ứng là ngày thứ 6 và ngày thứ 8 trên đường cong tăng trưởng.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng Nghiên cứu Công nghệ biến đổi sinh học, Phòng Nghiên cứu Các chất có hoạt tính sinh học, Viện Sinh học nhiệt đới và Phòng thí nghiệm của Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ sinh học động vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh đã giúp chúng tôi thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akudugu J, Gade G, Bohm L (2001) Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines. *Life Sci* 68: 1153-1160.

Aritakula A, Ramaswamy SA, Shashidhara LS (2007) Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 627-634.

Dennis DIR (1992) *Neem, a tree for solving global problems*. National Academy Press, Washington, D.C.,

USA, 141.

Dương Anh Tuấn, Nguyễn Minh Phương, Dương Ngọc Tú, Lưu Tham Mưu, Nguyễn Văn Giáp, Nguyễn Duy Trang (2001) Azadirachtin, hoạt chất gây ngăn ăn mạnh đối với sâu khoang được phân lập từ hạt neem (*Azadirachta indica*) di thực vào Việt Nam. *Báo cáo Hội nghị Khoa học công nghệ và hữu cơ Toàn quốc lần thứ 2, Hà Nội*: 333-337.

Freshney RI (2005) *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. John Wiley & Sons, Inc.

Grace TDC (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissue grown *in vitro*. *Nature* 195: 788-789.

Granados RR, McKenna KA (1995) Insect cell culture methods and their use in virus research, In: Schuler ML, Wood HA, Granados RR, Hammer DA (Editors), *Baculovirus expression systems and biopesticides*. New York: Wiley-Liss: 13-39.

Lê Thị Thanh Phương (2004) Chiết xuất hoạt chất từ nhân hạt neem (*Azadirachta indica* A. Juss) và khảo sát tác động của chúng đối với ngài gạo (*Corcyra cephalonica* St.). *Luận văn Thạc Sĩ Khoa học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm, thành phố Hồ Chí Minh*.

Linton YM, Nisbet AJ, Mordue AJ (1997) The effects of azadirachtin on the testes of the desert locust, *Sch. gregaria* (Forsk.). *J Insect Physiol* 43: 1077-1084.

Lynn DE (1996) Development and characterization of insect cell lines. *Cytotechnology* 20: 3-11.

Lynn DE (2002) Methods for maintaining insect cell cultures. *J Insect Sci* 2: 9.

Mordue AJ (1998) Azadirachtin - A review of its mode of action in insects. In: Kleeberg H (Ed.), *Practice oriented results on use and production of neem-ingredients and pheromones*. Druck und Graphic, Wetzlar, Deutschland: 1-4.

Nguyễn Tiến Thắng, Vũ Văn Độ, Vũ Đăng Khánh, Lê Thị Thanh Phương, Diệp Quỳnh Như (2003) Nghiên cứu và sử dụng cây xoan chịu hạn (*Azadirachta indica* A. Juss) trồng tại Việt Nam. *Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp nhà nước theo nghị định thư*, Bộ Khoa học và Công nghệ, Hà Nội.

Rembold H, Annadurai RS (1993) Azadirachtin inhibits proliferation SF-9 cells in monolayer culture. *Naturforsch C* 48: 495-499.

Robertson SL, Ni W, Dhadialla TS, Nisbet AJ, McCusker C, Ley SV, Mordue W, Mordue AJ (2007) Identification of a putative azadirachtin-binding complex from *Drosophila* Kc167 cells. *Arch Insect Biochem Physiol* 64(4): 200-208.

Salehzadeh A, Akhka A, Cushley W, Adams RLP, Kusel JR, Strang RHC (2003) The antimetabolic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 681-689.

Trần Kim Qui (2005) Hoàn thiện qui trình trích ly

limonoid trên qui mô pilot từ cây neem và điều chế các phụ gia thích hợp để làm nguyên liệu pha chế thuốc trừ sâu bảo vệ thực vật. Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp thành phố giai đoạn I (TP.HCM), 75 trang.

Vaughn JL, Goodwin RH (2006) Large-scale culture of

insect cells for virus production. Allanheld, Osmun & Co. Publishers, Inc.

Vlak JM, Gooijer CD, Tramper J, Miltenburger HG (1996) Insect cell cultures: Fundamental and applied aspects. Kluwer Academic.

MORTALITY EFFECT OF AZADIRACHTIN ON *IN VITRO* CULTURED CELLS OF RICE MOTH (*CORCYRA CEPHALONICA* ST.) LARVAE

Le Thi Thanh Phuong^{1, *}, Nguyen Tien Thang¹, Bui Cach Tuyen², Nguyen Ngoc Nhu Bang³, Phan Le Khoa³, Phan Kim Ngoc³

¹Institute of Tropical Biology

²Nong Lam University, Ho Chi Minh City

³University of Natural Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

The growing awareness of environmental hazards from synthetic pesticides and associated problems of pest resistance to pesticides, pests resurgence, detrimental effects on non-target organisms and environmental quality dictate the need for biopesticides, which are effective, economical and safe insecticides. Therefore, biopesticides originated from plants have been interested in recent years. One promising candidate for such potential pesticides is the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). So far, over 120 kinds of bioactive compounds has been identified and the main representative of which is azadirachtin, a very complex limonoid mainly derived from neem seed kernel. Azadirachtin and other bioactive compounds of the neem tree have been reported to influence the insect's activity and behavioural ecology as antifeedant, repellent, insecticidal, growth disrupting, ovipositional inhibiting, egg impairing agents and so on. However, there have been a few studies on affects of azadirachtin against insect cells. Specially, no study has ever recorded on *in vitro* cultured cells of rice moth (*Corcyra cephalonica*), one of common store-pests in many countries. This paper first describes the successful procedure of rice moth cell culture and affect of azadirachtin on them. *Corcyra cephalonica* cells derived from 3 - 5 day-old larvae were cultured in Grace medium supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum). After the sufficient quantity of cultured cells collected, the cell suspension was diluted to the appropriate seeding concentration and transferred into the 96 well plates for investigation on its growth curve. Mortality effect of azadirachtin on cultured cells of *C. cephalonica* was evaluated by trypan blue exclusion assay. The preliminary result showed that mortality rate of *C. cephalonica* cells was 81.1% in the present of 5 μ M azadirachtin on the fifth day after treatment.

Keywords: Azadirachtin, cultured cells, mortality effect, rice moth (*Corcyra cephalonica* St.), trypan blue

* Author for correspondence: Tel: 84-8-22157511; Fax: 84-8-38978791; E-mail: phuonglth@itb.ac.vn