

## TÌM HIỂU CÁC BIẾN ĐỔI HÌNH THÁI TRONG SỰ PHÁT SINH RỄ TAM THẮT HOANG (*PANAX STIPULEANATUS* H.T.TSAI ET K.M.FENG) NUÔI CÂY *IN VITRO* VÀ BƯỚC ĐẦU ĐỊNH TÍNH OLEANOLIC ACID TRONG RỄ TẠO THÀNH

Nguyễn Thị Ngọc Hương, Trần Hùng, Trương Thị Đẹp

Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 23.02.2016

Ngày nhận đăng: 26.3.2016

### TÓM TẮT

Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng) thuộc chi *Panax*, họ Ngũ gia bì Araliaceae, là một dược liệu quý ở Việt Nam và Trung Quốc. Trong thân rễ Tam thất hoang chứa nhiều hợp chất saponin thuộc nhóm olean, giúp tăng cường trí lực và làm giảm nguy cơ bị ung thư cho cơ thể người. Cho đến nay, vẫn chưa có nghiên cứu về các biến đổi hình thái trong sự tạo rễ bất định từ thân rễ của loài này. Trong nghiên cứu này, sự phát sinh hình thái mô sẹo từ thân rễ và sự phát sinh hình thái rễ bất định từ mô sẹo này được phân tích. Khúc cắt thân rễ có đường kính 1-1,5 cm và dày 1cm được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 6 g/l agar, 0,5 mg/l 2,4-D và đặt trong tối. Mô sẹo được hình thành trên bề mặt thân rễ sau bốn tuần. Sự phân chia đầu tiên trong quá trình hình thành mô sẹo xảy ra trong hai tuần đầu, ở các tế bào nhu mô vỏ cấp hai và tượng tầng libe – mộc. Mô sẹo 26 tuần tuổi với các tế bào bên trong cụm chậm tăng trưởng và các tế bào ở phía ngoài cụm có xu hướng kéo dài được chuyển sang môi trường hoạt hóa có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D và 0,1 mg/l TDZ trong 6 tuần. Mô sẹo phát triển trên môi trường này trở nên chặt hơn và hình thành nhiều cụm. Sự hình thành rễ bất định xảy ra sau 10 tuần khi mô sẹo được chuyển sang môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA. Mô sẹo hình thành các cấu trúc hình cầu giống phôi tuy nhiên chỉ phát triển một cực rễ. Trong các rễ hình thành từ mô sẹo thân rễ có sự hiện diện của saponin thuộc nhóm olean. Kết quả sắc ký bản mỏng với hệ dung môi  $\text{CHCl}_3$  và methanol (9:1) cho thấy chất trích của rễ có nguồn gốc từ mô sẹo thân rễ Tam thất hoang có sự hiện diện của oleanolic acid.

**Từ khóa:** Mô sẹo, oleanolic acid, *Panax*, rễ, Tam thất hoang, thân rễ

### MỞ ĐẦU

Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng) là loài cây thuốc thuộc chi *Panax*, họ Ngũ gia bì Araliaceae (Võ Văn Chi, 2012). Những nghiên cứu gần đây trên thế giới cho thấy các saponin thuộc nhóm olean từ rễ và thân rễ của Tam thất hoang là những hợp chất có khả năng kìm hãm hoạt động của một số dòng tế bào ung thư (Liang *et al.*, 2010; 2011). Vì vậy, hiện nay tại Việt Nam, Tam thất hoang đang bị săn lùng và khai thác một cách bừa bãi khiến cho số lượng cá thể bị giảm sút nghiêm trọng và có nguy cơ bị tuyệt chủng.

Đôi với những loài khác của chi *Panax* như: Nhân sâm (*Panax ginseng* C.A.Mey), sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), Tam thất (*Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen), việc nuôi cấy rễ bất định với mục đích thu nhận saponin đã được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm nghiên cứu (Palazón *et al.*, 2003; Nhut *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2002). Trong

khí đó, đối với Tam thất hoang, các nghiên cứu về nuôi cấy rễ bất định vẫn còn rất hạn chế. Đa phần các nghiên cứu chỉ tập trung vào việc xác định các saponin thuộc nhóm olean trong thân rễ Tam thất hoang (Chongren *et al.*, 1985) và khảo sát tác động chống ung thư của các saponin này (Liang *et al.*, 2010, 2011). Vì vậy, trong bài báo này, chúng tôi tìm hiểu sự phát sinh rễ bất định từ mô sẹo thân rễ và bước đầu xác định sự hiện diện của oleanolic acid trong rễ nhằm đóng góp thêm những hiểu biết cụ thể về sự phát sinh hình thái ở Tam thất hoang trong mục đích nhân giống bảo tồn và thu nhận hợp chất thứ cấp của loài cây thuốc quý này trong tương lai.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Thân rễ cây Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng) có đường kính 1-1,5 cm được trồng tại huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai và

được định danh tại bộ môn Thực vật - Khoa Dược, Trường Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh.

### Phương pháp

#### *Thí nghiệm tạo mô sẹo từ thân rễ*

Khúc cắt thân rễ có bề dày 10 mm được khử trùng với 0,1% HgCl<sub>2</sub> (10 phút) đặt trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D. Các mẫu được đặt trong tối ở điều kiện nhiệt độ 22 ± 2°C và ẩm độ 65%. Các mẫu mô sẹo 14 tuần tuổi được tách khỏi mô mẹ và tiếp tục được cấy chuyển trên môi trường tương tự sau mỗi 6 tuần. Hình thái của mô sẹo được quan sát lần lượt ở các thời điểm 2, 4 và 26 tuần sau nuôi cấy.

#### *Thí nghiệm tạo rễ từ mô sẹo*

Mô sẹo 26 tuần tuổi (từ môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D) được lần lượt chuyển sang các môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l TDZ trong 6 tuần và môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA trong 10 tuần. Hình thái của mô sẹo và rễ được ghi nhận ngay sau đó.

#### *Quan sát hình thái giải phẫu*

Cắt ngang thân rễ, mô sẹo và cắt dọc các cấu trúc giống phôi bằng dao lam. Các lát cắt có bề dày 200-300 µm được nhuộm bằng phương pháp nhuộm kép của Bộ môn Thực vật - Khoa Dược. Quy trình nhuộm: Ngâm vi phẫu vào nước Javel đến khi trắng. Rửa sạch. Tiếp tục ngâm vi phẫu trong dung dịch acid acetic 10% trong 10 phút. Nhuộm vi phẫu với thuốc nhuộm son phen-lục iod trong 15 phút. Rửa sạch. Quan sát vi phẫu đã nhuộm bằng kính hiển vi quang học và chụp ảnh ở vật kính 4 và 10 (độ phóng đại 40X, 100X).

#### *Định tính saponin bằng sắc ký lớp mỏng*

Nghiền 200 mg rễ có nguồn gốc từ mô sẹo thân rễ đã được sấy khô trong methanol. Dịch chiết methanol được cô đến cạn, hòa trong 5 ml hỗn hợp HCl 10% + methanol 50% và tiến hành thủy phân trong 4 giờ ở 80°C. Sau đó dịch thủy phân được cô bớt methanol và lắc phân bố với CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Dịch CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> được cô đến cạn và hòa lại trong một ít CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> thu được hỗn hợp dịch trích.

Chất chuẩn là oleanolic acid được hòa trong methanol. Dịch trích và chất chuẩn được chấm thành các điểm cố định trên tờ sắc ký bản mỏng silica gel

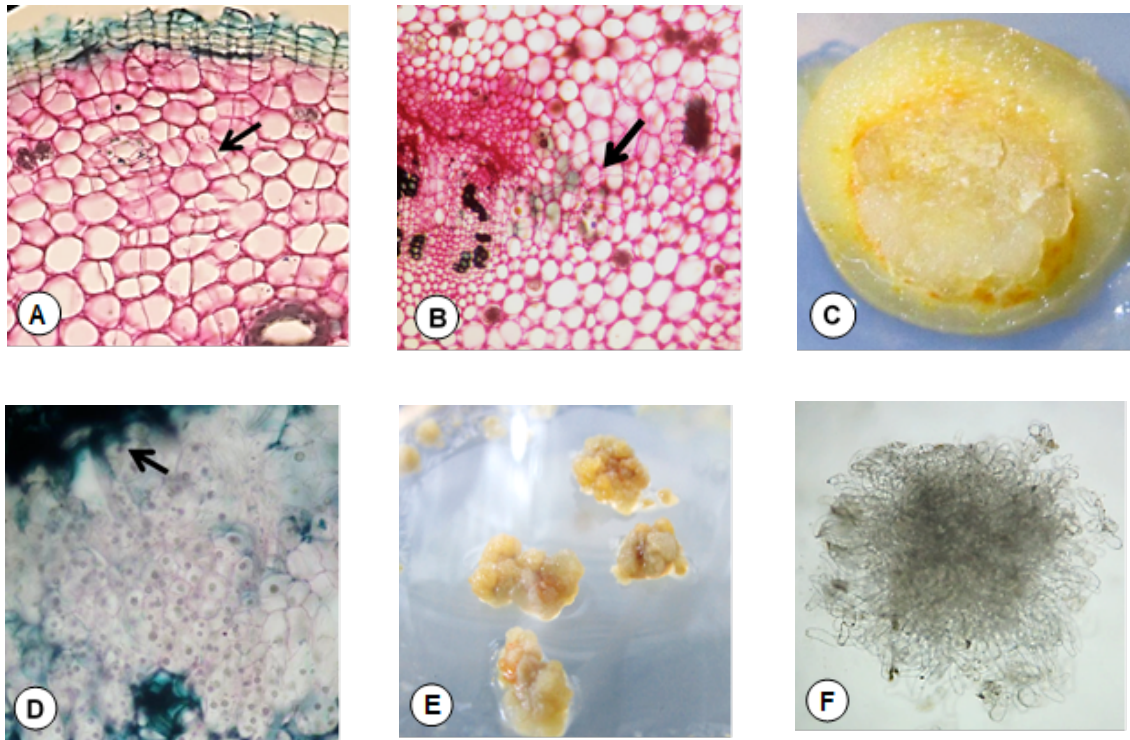
(60F25) và thực hiện sắc ký với hệ dung môi: CHCl<sub>3</sub> - methanol (9:1). Sau đó, oleanolic acid được phát hiện bằng cách phun hỗn hợp H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% + methanol 96% lên tờ sắc ký, sấy ở 100°C và quan sát dưới ánh sáng thường và ánh sáng UV 365 nm.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### *Sự hình thành mô sẹo*

Khúc cắt thân rễ được đặt nuôi trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D có màu từ vàng đến nâu, xuất hiện nhiều vết màu cam ở mặt cắt bên trên. Mẫu cấy ở tuần thứ hai có sự phân chia theo hướng xuyên tâm ở các tế bào nhu mô vỏ cấp hai và vùng tầng libe mộc (Hình 1A và hình 1B). Ở tuần thứ tư, mô sẹo hình thành trên mặt cắt, tập trung tại vùng trụ giữa, có màu từ trắng đến vàng nhạt (Hình 1C). Điều này cho thấy 2,4-D kích thích sự phân hóa tại các vị trí đã nêu trong mẫu cấy để hình thành các khối mô sẹo. Nhưng các tế bào mô sẹo khi phát triển nhô lên khỏi mô mẹ sẽ xa nguồn tác động của 2,4-D. Lúc này, các tế bào mô sẹo phía bên trong có vách cellulose mỏng, đẳng kính trong khi các tế bào ngoài cùng, xa mô mẹ, có xu hướng hóa bản (Hình 1D). Điều này đã gây cản trở về mặt cơ học khiến các khối mô sẹo càng chặt hơn và có màu sậm dần theo thời gian. Do đó, các khối mô sẹo cần được tiếp xúc trực tiếp với nguồn 2,4-D của môi trường nuôi cấy để giảm sự hóa bản của mô sẹo. Nên, trong lần cấy chuyển đầu, các khối sẹo 14 tuần tuổi được tách khỏi mô mẹ và chuyển sang môi trường có 2,4-D ở nồng độ tương tự và tiếp tục cấy chuyển mỗi 6 tuần.

Mô sẹo 26 tuần tuổi ở trạng thái gồm nhiều cụm tròn rời rạc với màu sắc thay đổi từ vàng đến nâu sậm, các khối mô sẹo bên ngoài mới hình thành có màu xám nhạt (Hình 1E). Các tế bào của các cụm bên trong khối mô sẹo ở trạng thái chậm tăng trưởng với các tế bào không còn đẳng kính, trong khi các tế bào ở phía ngoài cụm có xu hướng kéo dài (Hình 1F). Do tiếp xúc trực tiếp với môi trường, các khối mô sẹo tiếp nhận được 2,4-D và các tế bào bên ngoài của các cụm mô sẹo phân chia nhanh nhưng luôn ở trạng thái kéo dài. Các tế bào không đẳng kính và rời rạc như vậy tạo ra độ mềm của mô sẹo. Như vậy, 2,4-D vẫn ở nồng độ quá cao để dẫn đến sự phát sinh hình thái tiếp tục cho các tế bào mô sẹo.



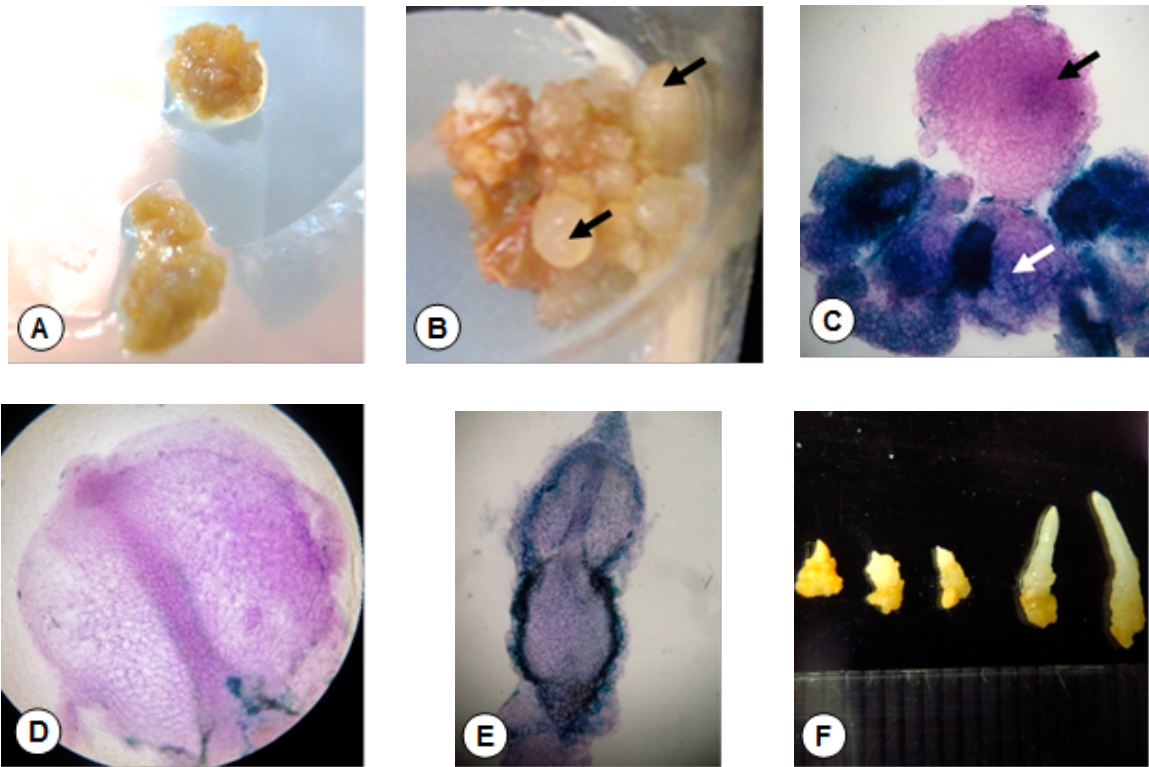
**Hình 1.** Sự hình thành mô sẹo từ thân rễ Tam thất hoang trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D. A, B. Phẫu thức ngang thân rễ 2 tuần tuổi trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D (ở độ phóng đại 100X) với các nhóm tế bào nhu mô vỏ và vùng tượng tầng đang phân chia mạnh (mũi tên); C, D. Khúc cắt thân rễ 4 tuần tuổi với mô sẹo xuất hiện tập trung ở vùng trụ và hình thái cụm tế bào mô sẹo này (ở độ phóng đại 100X) với các tế bào bên ngoài cụm đã hóa bần (mũi tên); E, F. Mô sẹo 26 tuần tuổi trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D với các cụm tròn dính nhau và hình thái một cụm tròn nhỏ đã được tách rời (ở độ phóng đại 100X).

### Sự phát sinh rễ từ mô sẹo

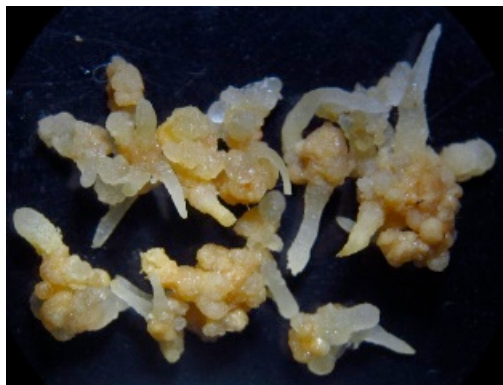
Các nghiên cứu gần đây chứng tỏ TDZ chỉ cần tiếp xúc với mẫu cấy trong thời ngắn cũng đủ giúp mẫu cấy sau đó dễ dàng tiếp nhận các kích thích cảm ứng khác. Do đó TDZ sẽ thúc đẩy hàng loạt các đáp ứng phát sinh hình thái của mẫu (Guo *et al.*, 2013). Như vậy, việc tiền xử lý với TDZ có vai trò quan trọng để thúc đẩy sự phát sinh hình thái của đám mô sẹo đang phân chia. Đối với mẫu cấy là cơ quan địa sinh như thân củ hoặc lá cây sâm Ngọc Linh để đáp ứng hình thành và tăng sinh mô sẹo khi sử dụng môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 0,2 mg/l TDZ (Triệu *et al.*, 2013; Nhật *et al.*, 2014). Vì vậy, trong nghiên cứu này, các khối mô sẹo 26 tuần tuổi trên môi trường có 2,4-D đang ở trạng thái chậm tăng trưởng cần thiết phải được chuyển sang môi trường 0,5 mg/l 2,4-D có bổ sung 0,1 mg/l TDZ với mục đích gia tăng khả năng đáp ứng với sự phát sinh hình thái rễ về sau.

Đối với Lan vũ nữ *Oncidium* sự kết hợp 2,4-D và TDZ làm mô sẹo có màu vàng, tạo cụm và trở thành mô sẹo có khả năng sinh phôi với kết cấu bờ hoặc chặt hơn (Guo *et al.*, 2013). Thêm vào đó, TDZ làm gia tăng sự sinh tổng hợp, tích lũy và vận chuyển của auxin trong mô dẫn đến thúc đẩy sự hình thành rễ ở nhiều loài (Guo *et al.*, 2013). Đối với Tam thất hoang, mô sẹo 26 tuần tuổi trên môi trường 2,4-D khi được chuyển sang môi trường có bổ sung TDZ cho thấy màu sắc của mô sẹo chuyển thành nâu sẫm ở tuần thứ ba và các cụm mô sẹo trở nên chặt hơn (Hình 2A).

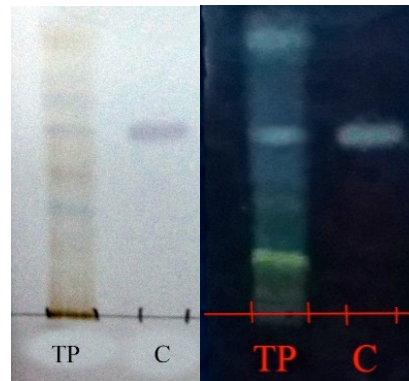
Ở tuần thứ sáu trên môi trường có TDZ, mô sẹo thân rễ Tam thất hoang có cấu trúc không thay đổi so với tuần thứ ba và được chuyển sang môi trường có bổ sung 0,5 mg/l NAA để tiếp nhận sự kích thích hình thành rễ. Sau 10 tuần, mỗi cụm trong khối mô sẹo này hình thành một nốt tròn (Hình 2B và hình 2C) và mỗi nốt chỉ hình thành duy nhất một rễ (Hình 2D và hình 2E).



**Hình 2.** Sự hình thành rễ từ mô sẹo thân rễ Tam thất hoang. A. Mô sẹo ba tuần tuổi trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D và 0,1 mg/l TDZ; B,C. Hình thái và cấu trúc giải phẫu (ở độ phóng đại 40X) của mô sẹo 10 tuần tuổi trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA với sự xuất hiện các nốt tròn (mũi tên); D,E,F. Các nốt sẹo tròn với cấu trúc giải phẫu (ở độ phóng đại 40X) giống phôi nhưng chỉ phát triển của cực rễ và hình thái của các rễ này.



**Hình 3.** Rễ từ mô sẹo 10 tuần trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA.



**Hình 4.** Hiện diện của oleanolic acid trong mẫu rễ. TP: mẫu rễ Tam thất hoang, C: oleanolic acid chuẩn  $C_{30}H_{48}O_3$ .  $H_2SO_4$  10%/EtOH 96%, ánh sáng thường (trái).  $H_2SO_4$  10%/EtOH 96%, ánh sáng UV 365 nm (phải).

Các nốt tròn từ các cụm mô sẹo đã được hình thành trên môi trường có bổ sung TDZ khi chuyển sang NAA có cấu trúc giống như phôi hình cầu, các nốt tròn này nằm trong khối mô sẹo rời rạc và có thể

đễ dàng tách ra thành các nốt độc lập. Tuy nhiên, cấu trúc này chỉ phát triển một cực rễ dưới tác động của NAA (Hình 2E và Hình 2F). Sự kéo dài cực rễ này xảy ra sau đó nhưng nốt tròn vẫn duy trì cấu trúc của

nó và bắt đầu phân hóa mạch (Hình 2E). Không có nốt tròn nào tạo hơn một rễ, điều này khẳng định đây là một cấu trúc tương tự phôi nhưng cực chồi không thể phát triển (Hình 3).

#### Xác định saponin thuộc nhóm olean trong rễ từ mô sẹo có nguồn gốc thân rễ

Kết quả sắc ký bản mỏng với hệ dung môi  $\text{CHCl}_3$ -và methanol (9:1) cho thấy chất trích của rễ có nguồn gốc từ mô sẹo thân rễ có sự hiện diện của oleanolic acid, một saponin thuộc nhóm olean (Hình 4).

#### KẾT LUẬN

2,4-D ở nồng độ 0,5 mg/l kích thích sự phân hóa chủ yếu ở nhu mô vỏ cấp hai và tương tầng libe - mộc của thân rễ ở tuần thứ 2 và tạo khối sẹo trên bề mặt mẫu cấy ở tuần thứ 4 sau sự nuôi cấy.

Mô sẹo 26 tuần tuổi trên môi trường MS có 0,5 mg/l 2,4-D được xử lý trong 6 tuần với 0,1 mg/l TDZ và chuyển sang môi trường MS có 0,5 mg/l NAA có khả năng hình thành các cấu trúc giống phôi nhưng chỉ phát triển một cực rễ.

Rễ hình thành từ các cấu trúc giống phôi trong mô sẹo thân rễ có chứa oleanolic acid.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ môn Sinh lý thực vật, khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện để nghiên cứu được tiến hành thuận lợi tại phòng thí nghiệm của bộ môn. Xin cảm ơn Tiến sĩ Võ Văn Chi và Bộ môn Thực vật thuộc Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ định danh cây Tam thất hoang. Xin cảm ơn Bộ môn Dược liệu và Ban nghiên cứu khoa học thuộc Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ phân tích oleanolic acid trong rễ nuôi cấy.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chongren Y, Zhidong J, Jun Z, Ryoji K, Osamu T (1985) Two new oleanolic acid-type saponins from *Panax*

*stipuleanatus*. *Acta Bot Yunnan* 7(1): 103-108.

Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu LL, Wei YH (2013) Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *Afr J Biotechnol* 10(45): 8984-9000.

Liang C, Ding Y, Nguyen HT, Kim JA, Boo HJ, Kang HK, Nguyen MC, Kim YH (2010) Oleanane-type triterpenoids from *Panax stipuleanatus* and their anticancer activities. *Bioor Med Chem Lett* 20(23): 7110-7115.

Liang C, Ding Y, Kim JA, Yang SY, Boo HJ, Kang HK, Nguyen MC, Kim YH (2011) Polyacetylenes from *Panax stipuleanatus* and their cytotoxic effects on human cancer cells. *Bull Kor Chem Soc* 32(9) 3513.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.

Murch SJ, Saxena PK (2001) Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Plant Growth Regul* 35(3): 269-275.

Nhut DT, Luan VQ, Binh NV, Phong PT, Huy BN, Ha DTN, Hang LTM (2009) The effects of some factors on *in vitro* biomass production of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) and preliminary analysis of saponin content. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 7(3): 365-370.

Nhut DT, Huy NP, Luan VQ, Binh VN, Nam NB, Thuy LNM, Cuong LK (2014) Shoot regeneration and micropropagation of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. from *ex vitro* leaf-derived callus. *Afr J Biotechnol* 10(84): 19499-19504.

Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Mallol A, Moyano E, Morales C, Piñol M T (2003) Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiol Biochem* 41(11): 1019-1025.

Triệu NB, Tùng NT, Phượng TTB (2013) Nuôi cấy *in vitro* sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế* 79(1).

Võ Văn Chi (2012) Từ điển cây thuốc Việt Nam (Tập II (Bộ mới)). *NXB Y học*, 140.

Wang W, Zhong JJ (2002) Manipulation of ginsenoside heterogeneity in cell cultures of *Panax notoginseng* by addition of jasmonates. *J Biosci Bioeng* 93(1): 48-53.

**A STUDY ON MORPHOGENESIS OF ROOTS OF *PANAX STIPULEANATUS* H.T.TSAI ET K.M.FENG *IN VITRO* AND PRELIMINARY DETERMINATION OF OLEANOLIC ACID IN ROOTS**

**Nguyen Thi Ngoc Huong<sup>✉</sup>, Tran Hung, Truong Thi Dep**

*University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh City*

**SUMMARY**

*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng which belongs to the genus *Panax* (Araliaceae family) is an valuable medicinal herbs in Vietnam and China. In the rhizome of *Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng contains many olean-type triterpenoid saponins, which can improve mental stamina and reduces risks of cancers in humans. Up to now, there is no research on the morphological changes in adventitious root formation from the rhizome of this species. In this study, the callus morphogenesis from the rhizome and the adventitious root morphogenesis from callus were analyzed. The rhizome segments 1-1.5 cm in diameter and 1 cm thick were cultured on MS medium supplemented 30 g/l sucrose, 6 g/l agar and 0.5 mg/l 2.4-D in dark. Callus formed on the surface of the rhizome after four weeks. The first cell divisions occurred in the first two weeks, in secondary cortex parenchyma cells and vascular cambium of the rhizome. 26-week-old callus with slow cell proliferation within the cluster and the long cells outside clusters were transferred to the induced medium supplemented with 0.5 mg/l 2.4-D and 0.1 mg/l TDZ within 6 weeks. The calli were more tight and formed many clusters. The adventitious roots formed 10 weeks after the transfer to MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA. Callus formed spherical structures called embryo-like but only developed the root pole. Results of the thin layer chromatography using chloroform-methanol (9:1, v/v) showed the presence of oleanolic acid in extracts of adventitious roots formed from callus-derived rhizomes of *Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng.

**Keywords:** *Callus, oleanolic acid, Panax, rhizomes, roots, Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng

---

<sup>✉</sup> *Author for correspondence:* Tel: +84-933386054; E-mail: [ngochuongyd82@gmail.com](mailto:ngochuongyd82@gmail.com)