

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT PHỤ GIA VÀ TỔ HỢP KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY ĐÔNG HẦU VÀNG (*Turnera ulmifolia* L.) *IN VITRO*

Phan Thị Thúy, Phạm Thị Thanh Nhân*

Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Cây Đông hầu vàng (*Turnera ulmifolia* L.) được biết đến như một loại thảo dược nổi tiếng ở châu Mỹ với công dụng tăng cường sức khỏe sinh sản, giúp trị xuất tinh sớm và bất lực ở nam. Arbutin trong cây có tác dụng làm trắng da nhờ khả năng ức chế enzyme sản sinh melanin mà không có tác dụng phụ, chống lão hóa và ngăn các gốc tự do, làm căng da, mịn da. Dịch chiết lá kích thích hoạt độ của enzyme chống oxy hóa. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất phụ gia và tổ hợp kích thích sinh trưởng đến sự sinh trưởng của cây Đông hầu vàng nhập từ châu Mỹ nhằm tìm ra quy trình nhân nhanh để phát triển cây này ở Việt Nam.

Công thức môi trường bổ sung tổ hợp kích thích sinh trưởng thích hợp nhất cho sự phát sinh chồi cây Đông hầu vàng là môi trường MS cơ bản + sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l + BAP 1,0 mg/l + IBA 0,3 mg/l (với 2,43 chồi/mẫu sau 8 tuần). Các chất phụ gia gồm nước dừa, dịch chiết khoai tây, dịch chiết chuối, dịch chiết cà chua và than hoạt tính không thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây Đông hầu vàng *in vitro*.

Từ khóa: BAP, IBA, *Turnera ulmifolia* L., làm trắng da, chất phụ gia, phát sinh chồi

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, nhu cầu làm đẹp của phái nữ ngày một tăng mạnh mẽ. Tuy nhiên, các mỹ phẩm tổng hợp và pha chế được bán trên thị trường thường gây hại cho da sau một thời gian sử dụng. Vì vậy, các công ty dược- mỹ phẩm phải tìm đến những hợp chất được chiết xuất từ những cây có tự nhiên để thỏa mãn các khách hàng ngày một “khó tính”. Cây Đông hầu vàng (*Turnera ulmifolia* L.) được biết đến như một loại thảo dược nổi tiếng ở châu Mỹ với nhiều công dụng đối với cơ thể. Arbutin trong cây có tác dụng làm trắng da nhờ khả năng ức chế enzyme sản sinh melanin mà không có tác dụng phụ, chống lão hóa và ngăn các gốc tự do, giảm đau bụng kinh, kinh nguyệt không đều, làm căng da, mịn da [2]. Chất thymol có tác dụng kích thích lên cơ thể và giúp hồi phục hệ thần kinh trong điều trị bệnh suy nhược ở mức độ nhẹ cho đến vừa phải. Chất nhựa trong cây có tác dụng như dịch vị dạ dày giúp tiêu hóa tốt, do đó cây cũng được dùng để trị bệnh táo bón do cơ ruột co bóp kém [2], [6]. Theo các nhà khoa học Brazil, hoạt chất chủ yếu trong thân và lá của

cây Đông hầu vàng là các hợp chất flavonoid, glutathione có tác dụng chống oxy hóa và chống các vết loét ở các cơ quan tiết niệu và tiêu hóa [9]. Dịch chiết từ lá kích thích hoạt độ của enzyme chống oxy hóa (glutathione peroxidase, superoxide dismutase và catalase) trong cơ thể [4], [6], [9]. Kalimuthu R. Prabakaran và Preeetha (2014) [7] đã nghiên cứu môi trường nhân nhanh *Turnera ulmifolia* L. phục vụ cho việc cung cấp nguồn dược liệu. Ở Việt Nam, cây Đông hầu vàng là cây nhập nội với số lượng hạn chế. Nhân giống cây Đông hầu vàng tự nhiên chậm, phụ thuộc vào tự nhiên và cây chỉ phát triển vào mùa hè. Nuôi cấy *in vitro* là phương pháp nhân giống cho số lượng lớn, giống sạch bệnh và không phụ thuộc môi trường. Nước dừa, chuối xanh, khoai tây và cà chua là những chất tự nhiên giàu dinh dưỡng, có ảnh hưởng tốt đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng phát sinh chồi của cây *in vitro* [5].

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất phụ gia và tổ hợp kích thích sinh trưởng đến sự sinh trưởng của cây Đông hầu vàng (*Turnera ulmifolia* L.) nhập từ châu Mỹ nhằm tìm ra quy trình nhân nhanh và phát triển cây này ở Việt Nam.

* Tel: 0989 516346; Email: ptnhansptn@gmail.com

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**Vật liệu và hóa chất nghiên cứu**

Hạt cây Đông hầu vàng do Viện Y học bản địa, tỉnh Thái Nguyên cung cấp.

Các hóa chất như thành phần môi trường MS cơ bản, sucrose, agar, than hoạt tính, chất điều hòa sinh trưởng BAP, NAA, IBA có nguồn gốc từ Việt Nam, Đức.

Phương pháp nghiên cứu**Phương pháp tái sinh chồi từ đoạn thân**

Môi trường được sử dụng: MS + sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l và bổ sung thêm chất kích thích sinh trưởng với nồng độ khác nhau (BAP 1,0 mg/l kết hợp với NAA hoặc IBA nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5 mg/l), pH là 5,8. Môi trường đối chứng là MS + sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l.

Các loại chất phụ gia được khảo sát gồm: Nước dừa, dịch chiết chuối, dịch chiết khoai tây, dịch chiết cà chua, than hoạt tính. Công thức môi trường được sử dụng trong các thí nghiệm này là MS cơ bản có bổ sung sucrose

30 g/l + agar 8,5 g/l + chất phụ gia (nồng độ lần lượt là 50 ml/l, 100 ml/l, 150 ml/l và 200 ml/l đối với các loại dịch chiết hoặc nồng độ lần lượt là 0,5 g/l; 1,0 g/l; 1,5 g/l và 2,0 g/l đối với than hoạt tính). Trong đó, mỗi loại dịch chiết được tạo ra bằng cách nghiền 200 g chất chiết dạng tươi đun sôi trong 1000 ml nước cất. Môi trường đối chứng là môi trường MS cơ bản có bổ sung sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l.

Phương pháp: Cắt thân cây Đông hầu vàng *in vitro* thành các đoạn dài 1,0 - 1,5 cm, mỗi đoạn chứa một nách lá mầm, cắt bỏ lá, đem cấy vào môi trường đã chuẩn bị sẵn. Mỗi công thức cấy 30 đoạn thân vào 5 bình thí nghiệm, mỗi công thức lặp lại 3 lần. Sau đó theo dõi sự phát triển của cây sau 2, 4, 6 và 8 tuần. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 25 - 27°C, thời gian chiếu sáng 12/24 h, cường độ chiếu sáng 2000 lux.

Phương pháp xử lý kết quả: Các số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Excel theo Chu Văn Mẫn (với $P < 0,05$ và $\alpha = 0,05$) [1].

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất phụ gia đến sự sinh trưởng của cây Đông hầu vàng

Công thức	Nồng độ chất phụ gia (ml/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
ĐC	0	1,00 ± 0,00	1,65 ± 0,10	+++
Nước dừa				
CT1	50	1,13 ± 0,12	1,52 ± 0,21	++
CT2	100	1,20 ± 0,16	1,60 ± 0,19	++
CT3	150	1,07 ± 0,04	1,51 ± 0,13	++
CT4	200	1,13 ± 0,13	1,44 ± 0,03	++
Dịch chiết chuối				
CT1	50	1,17 ± 0,14	1,23 ± 0,21	+
CT2	100	1,10 ± 0,15	1,14 ± 0,22	+
CT3	150	1,17 ± 0,04	1,10 ± 0,11	+
CT4	200	1,20 ± 0,12	1,20 ± 0,03	+
Dịch chiết khoai tây				
CT1	50	1,23 ± 0,13	1,27 ± 0,13	+
CT2	100	1,15 ± 0,15	1,34 ± 0,11	+
CT3	150	1,27 ± 0,14	1,37 ± 0,12	+
CT4	200	1,15 ± 0,04	1,33 ± 0,05	+
Dịch chiết cà chua				
CT1	50	1,10 ± 0,18	1,34 ± 0,23	+
CT2	100	1,17 ± 0,16	1,28 ± 0,08	+
CT3	150	1,22 ± 0,07	1,45 ± 0,11	+
CT4	200	1,13 ± 0,12	1,24 ± 0,19	+
Than hoạt tính				
CT1	0,5 g/l	1,00 ± 0,00	1,47 ± 0,21	++
CT2	1,0 g/l	1,00 ± 0,00	1,52 ± 0,10	++
CT3	1,5 g/l	1,00 ± 0,00	1,65 ± 0,10	++
CT4	2,0 g/l	1,00 ± 0,00	1,39 ± 0,14	++

Ghi chú: (+): Chồi yếu, lá to, màu xanh nhạt; (++) : Chồi khỏe, lá nhỏ, màu xanh nhạt; (+++): Chồi khỏe, lá to xanh đậm, phát triển cân đối

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của chất phụ gia đến sự sinh trưởng, phát triển của cây Đông hầu vàng

Kết quả theo dõi ảnh hưởng của chất phụ gia đến sự sinh trưởng của cây Đông hầu vàng sau 8 tuần được thể hiện trong bảng 1 và hình 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, tất cả các môi trường đều tạo chồi. Trong đó, môi trường có dịch chiết khoai tây 150 ml/l cho số chồi/mẫu cao nhất (1,27 chồi/mẫu). Tuy nhiên, chiều cao chồi thấp hơn so với mẫu cây trong môi trường bổ sung than hoạt tính 1,5 g/l và môi trường đối chứng. Trong các môi trường bổ sung nước dừa, nồng độ nước dừa càng cao thì chất lượng chồi càng kém, có hiện tượng xoắn lá và chồi yếu. Trong môi trường bổ sung các loại dịch chiết khác, mẫu cây cho chồi yếu, lá vàng úa và có hiện tượng “thủy tinh hóa”. Xét về chất lượng chồi thì môi trường đối chứng cho chất lượng chồi tốt nhất, chồi khỏe, lá to xanh đậm, phát triển cân đối.

Ảnh hưởng của tổ hợp kích thích đến khả năng phát sinh chồi cây Đông hầu vàng**Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng phát sinh chồi cây Đông hầu vàng**

Hình 1. Ảnh hưởng của nước dừa 100 ml/l (A) và than hoạt tính 1,5 g/l (B) đến sự sinh trưởng của cây Đông hầu vàng

Từ kết quả nghiên cứu ảnh hưởng riêng rẽ của từng loại chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin (BAP, kinetin) cho thấy, sự phát sinh chồi cây Đông hầu vàng trong các môi trường này còn thấp (sau 8 tuần, môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l là tối ưu cho hệ số nhân là 1,46 chồi/mẫu, môi trường bổ sung kinetin 1,5 mg/l là tối ưu cho hệ số nhân là 1,54 chồi/mẫu) [10]. Để tăng hệ số nhân, ảnh hưởng của tổ hợp BAP và NAA hoặc tổ hợp BAP và IBA được nghiên cứu. Mẫu nghiên cứu được nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản bổ sung sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l + BAP 1,0 mg/l và NAA nồng độ 0,1; 0,3; 0,5 mg/l. Kết quả thu được sau 2, 4, 6 và 8 tuần được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP 1,0 mg/l và NAA đến sự sinh trưởng của cây Đông hầu vàng

Công thức	Nồng độ NAA (mg/l)	Số chồi/ mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
Sau 2 tuần				
ĐC	0	1,00 ± 0,00	0,52 ± 0,05	+++
CT1	0,1	1,34 ± 0,05	0,65 ± 0,07	+++
CT2	0,3	1,57 ± 0,09	0,69 ± 0,12	+++
CT3	0,5	1,27 ± 0,12	0,50 ± 0,11	+++
Sau 4 tuần				
ĐC	0	1,00 ± 0,00	1,04 ± 0,07	+++
CT1	0,1	1,41 ± 0,20	1,31 ± 0,17	+++
CT2	0,3	1,62 ± 0,11	1,37 ± 0,09	+++
CT3	0,5	1,32 ± 0,04	1,24 ± 0,05	+++
Sau 6 tuần				
ĐC	0	1,00 ± 0,00	1,36 ± 0,08	+++
CT1	0,1	1,44 ± 0,14	1,87 ± 0,12	+++
CT2	0,3	1,67 ± 0,06	1,94 ± 0,05	+++
CT3	0,5	1,37 ± 0,22	1,67 ± 0,13	+++
Sau 8 tuần				
ĐC	0	1,00 ± 0,00	1,65 ± 0,10	+++
CT1	0,1	1,46 ± 0,06	2,24 ± 0,05	+++
CT2	0,3	1,71 ± 0,21	2,27 ± 0,14	+++
CT3	0,5	1,43 ± 0,09	1,85 ± 0,11	+++

Ghi chú:(+ +): Chồi yếu; (+ + +): Chồi khỏe, mập, lá xanh đậm và phát triển cân đối

Bảng 2 cho thấy, môi trường có bổ sung BAP và NAA cho tỉ lệ mẫu phát sinh chồi là 100%, chồi khỏe, mập, lá xanh đậm và phát triển cân đối. Sau 2, 4, 6 và 8 tuần, công thức CT2 (môi trường bổ sung NAA 0,3 mg/l) đều cho số chồi/mẫu và chiều cao chồi cao nhất. Sau 8 tuần, công thức CT2 cho số chồi/mẫu là 1,71, cao hơn so với môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l (1,46 chồi/mẫu), chứng tỏ tổ hợp BAP và NAA có tác dụng kích thích tạo đa chồi tốt hơn khả năng kích thích tạo đa chồi của BAP riêng rẽ. Kết quả này cho thấy nghiên cứu ảnh hưởng tạo đa chồi theo hướng tổ hợp nhóm cytokinin và auxin khả quan hơn tác động của cytokinin riêng rẽ.

Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA đến khả năng phát sinh chồi cây Đông hâu vàng

IBA cũng là một auxin có hoạt tính rất mạnh. Do vậy, tổ hợp BAP và IBA được nghiên cứu để đánh giá ảnh hưởng tới sự phát sinh chồi cây Đông hâu vàng. Mẫu cây là các đoạn thân

mang 1 nách lá mầm được cấy trong môi trường MS cơ bản bổ sung sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l + BAP 1,0 mg/l và IBA với nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5 mg/l. Kết quả sau 2, 4, 6 và 8 được thể hiện trong bảng 3 và hình 2.

Kết quả bảng 3 cho thấy, khả năng tạo đa chồi của tổ hợp BAP và IBA cao hơn so với đối chứng và cao nhất trong các môi trường kích thích tạo đa chồi. Sau 8 tuần, môi trường CT2 (bổ sung IBA 0,3 mg/l) cho số chồi/mẫu là 2,43 chồi/mẫu. Trong khi đó môi trường đối chứng chỉ cho 1,00 chồi/mẫu, môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l cho 1,46 chồi/mẫu và môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l và NAA 0,3 mg/l là 1,71 chồi/mẫu. Số chồi/mẫu tăng lên khi nồng độ IBA tăng từ 0,1 đến 0,3 mg/l, khi nồng độ IBA tiếp tục tăng lên thì số chồi/mẫu giảm dần. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả trước đó như Adhikarimayum H. (2011) [3] và Mohammad H. R., Mohammad M. S. (2013) [8].



Hình 2. Hình ảnh cây Đông hâu vàng trên môi trường ĐC (A), CT2 (B) và CT3 (C) sau 4 tuần

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP 1,0 mg/l và IBA đến sự sinh trưởng của cây Đông hâu vàng

Công thức	Nồng độ IBA (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
Sau 2 tuần				
ĐC	0	1,00 ± 0,00	0,52 ± 0,05	+++
CT1	0,1	2,15 ± 0,16	0,48 ± 0,11	+++
CT2	0,3	2,35 ± 0,10	0,63 ± 0,11	+++
CT3	0,5	2,25 ± 0,23	0,49 ± 0,13	+++
Sau 4 tuần				
ĐC	0	1,00 ± 0,00	1,04 ± 0,07	+++
CT1	0,1	2,20 ± 0,23	1,06 ± 0,03	+++
CT2	0,3	2,38 ± 0,19	1,22 ± 0,15	+++
CT3	0,5	2,29 ± 0,11	1,10 ± 0,22	+++
Sau 6 tuần				
ĐC	0	1,00 ± 0,00	1,36 ± 0,08	+++
CT1	0,1	2,22 ± 0,14	1,67 ± 0,19	+++
CT2	0,3	2,41 ± 0,07	1,75 ± 0,17	+++
CT3	0,5	2,32 ± 0,21	1,52 ± 0,12	+++
Sau 8 tuần				
ĐC	0	1,00 ± 0,00	1,65 ± 0,10	+++
CT1	0,1	2,22 ± 0,24	1,96 ± 0,17	+++
CT2	0,3	2,43 ± 0,17	2,09 ± 0,22	+++
CT3	0,5	2,34 ± 0,12	1,86 ± 0,17	+++

Ghi chú:(++): Chồi yếu; (+++): Chồi khỏe, mập, lá xanh đậm và phát triển cân đối

Như vậy, sử dụng môi trường bổ sung đồng thời các chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin và cytokinin kích thích phát sinh chồi tốt hơn môi trường bổ sung riêng rẽ chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin. Môi trường tối ưu cho sự phát sinh chồi cây Đông hầu vàng từ đoạn thân là môi trường MS cơ bản bổ sung sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l + BAP 1,0 mg/l và IBA 0,3 mg/l.

KẾT LUẬN

Công thức môi trường thích hợp nhất cho sự phát sinh chồi cây Đông hầu vàng là môi trường MS cơ bản + sucrose 30 g/l + agar 8,5 g/l + BAP 1,0 mg/l + IBA 0,3 mg/l với 2,43 chồi/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy.

Các chất phụ gia gồm nước dừa, dịch chiết khoai tây, dịch chiết chuối, dịch chiết cà chua và than hoạt tính không thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây Đông hầu vàng *in vitro*.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Viện Y học bản địa, tỉnh Thái Nguyên đã cung cấp vật liệu cho thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chu Văn Mẫn (2000), *Ứng dụng tin học trong sinh học*, Nxb Đại học quốc gia Hà Nội.
2. “Họ Đông hầu- cây Đông hầu (*Turnera diffusa* loài biến thể *Aphrodisiaca* (*Turneraceae*)”, <http://www.bachkhoatrithuc.vn>, trích dẫn 22/3/2015.
3. Adhikarimayum H., Kshetrimayum G., Huidrom S. Maibam D. (2011), “In vitro propagation of *Citrus megaloxycarpa*”,

Environmental and Experimental Biology, (9), pp. 129-132.

4. Brito N. J., López J. A., Do Nascimento M. A., Macêdo J. B., Silva G. A., Oliveira C. N., De Rezende A. A., Brandão-Neto J., Schwarz A., Almeida M. D. (2012), “Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia* Linn. var. *elegans* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats”, *Food Chem. Toxicol.*, 50(12), pp. 4340-4347.

5. Daud N., Taha R. M., Noor N. N., Alimon H. (2011), “Effects of different organic additives on in vitro shoot regeneration of *Celosia* sp”, *Pak J. Biol. Sci.*, 14(9), pp. 546-551.

6. Gracioso J. de S., Vilegas W., Hiruma-Lima C. A., Souza Brito A. R. (2002), “Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the *Turneraceae* as a new source of antiulcerogenic drugs”, *Biol. Pharm. Bull.*, 25(4), pp. 487-491.

7. Kalimuthu K., Prabakaran R. and Preeetha V. (2014), “Direct and indirect micropropagation of *Turnera ulmifolia* L. A medicinal plant”, *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3 (8), pp. 785- 793.

8. Mohammad H. R. (2013), “In vitro regeneration of sour orange (*Citrus aurantium* L.) via direct organogenesis”, *Plant Knowledge Journal, Southern Cross Publishing Group*, 2(4), pp. 150-156.

9. Nascimento M. A., Silva A. K., França L. C., Quignard E. L., López J. A., Almeida M. G. (2006), “*Turnera ulmifolia* L. (*Turneraceae*): preliminary study of its antioxidant activity”, *Bioresour Technol.*, 97(12), pp. 1387-1391.

10. Phan Thi Thuy, Pham Thi Thanh Nhan (2018), “Study on sterilizing plant materials and effects of Cytokinin and 2,4- D on shoot formation of “Yellow alder” (*Turnera ulmifolia* L.)”, *The 5th academic conference on natural science for young scientists, master and PhD. Students from Asian countries*, pp.177-183.

SUMMARY

STUDY ON THE EFFECTS OF ADDITIVES AND COMBINATION OF GROWTH STIMULANT ON THE GROWTH OF “YELLOW ALDER” (*Turnera ulmifolia* L.) IN VITRO**Phan Thi Thuy, Pham Thi Thanh Nhan****University of Education - TNU*

“Yellow alder” (*Turnera ulmifolia* L.) is well-known for a popular medical plant in the Americas with the uses to enhance reproductive health, treat premature ejaculation and impotence in men. Arbutin in it has an effect on whitening our skin naturally due to the ability to inhibit enzymes, which produce melanin without harm side-effects, prevent anti-aging and free radicals, tighten and smoothen skin. The extracted solution from leaves stimulates the activity of antioxidant enzymes. This paper presents the results of studying on effects of additives and combination of growth-stimulating substances on shoot formation of “Yellow alder” from Americas in order to find a multiplication protocol to develop this plant in Vietnam.

The best formula for rapid shoot organogenesis is the basal MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.8% agar, 1.0 mg/l BAP and 0.3 mg/l IBA (after 8 weeks, this formula for rapid shoot is 2.43 shoots/sample). Additives such as coconut water, potato, banana, tomato extract and activated carbon are not suitable for the growth and development of *in vitro* “Yellow alder”.

Key words: BAP, IBA, *Turnera ulmifolia* L., whitening, additives, shoot formation

Ngày nhận bài: 24/5/2018; Ngày phản biện: 02/6/2018; Ngày duyệt đăng: 31/7/2018

* Tel: 0989 516346; Email: ptnhansptn@gmail.com