BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

KỶ YẾU
HỘI NGHỊ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT NĂM 2020

Tiểu ban 4: Sinh học

Lâm Đồng, tháng 08 năm 2020

DANH SÁCH TRÌNH BÀY BÁO CÁO TẠI HỘI NGHỊ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT NĂM 2020

Số TT	Tên đề tài	Họ và tên sinh viên	Lớp/ Khoa	Họ tên Giáo viên hướng dẫn	Trang
Tiểu ban Sinh học (04 đề tài Sinh học)					
1.	Bước đầu nghiên cứu thành phần hoá học, khảo sát hoạt tính sinh học của loài kinh giới núi (*Elsholtzia blanda* Benth) tại khu vực Lâm Đồng và ứng dụng tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên	Nguyễn Hữu Quân ***(Chủ nhiệm)*** Võ Thanh Tú Quyên Mai Nhật Bảo Hân	CSK40, CSK41/ Khoa Sinh học	TS. Hoàng Thị Bình	3
2.	Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa Menochilus sexmaculatus tại Đà Lạt	Nguyễn Thị Thu Huế ***(Chủ nhiệm)*** Lê Thị Thanh Thuỷ Nguyễn Đức Tuấn Hà Đăng Phương Phạm Khánh Linh	CSK40, CSK43/ Khoa Sinh học	ThS. Nguyễn Thanh Thuỷ Tiên	43
3.	Nghiên cứu cải thiện khả năng ra rễ và thích nghi ở giai đoạn vườn ươm của cây Artichoke (*Cynara* spp.) nuôi cấy in vitro	Nguyễn Thị Như Mai ***(Chủ nhiệm)*** Hoàng Lê Lan Anh Nguyễn Như Minh Nguyệt Hoàng Đắc Khải	CSK40, CSK41/ Khoa Sinh học	GS.TS. Dương Tấn Nhựt	133
4.	Bước đầu khảo sát khả năng sinh trưởng và phát triển của bèo tấm dưới ảnh hưởng của một số kim loại nặng	Nguyễn Đức Thắng ***(Chủ nhiệm)*** Nguyễn Minh Tuấn, Nguyễn Thanh Hằng, Nguyễn Hữu Phước, Huỳnh Thuỵ Vân Anh	CSK40, CSK41/ Khoa Sinh học	TS. Hoàng Thị Như Phương	226

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

KHOA SINH HỌC

TÊN ĐỀ TÀI

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA BÈO TẤM DƯỚI ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ KIM LOẠI NẶNG

Giảng viên hướng dẫn: TS. Hoàng Thị Như Phương

Th.S. Trần Thị Nhung

Đà Lạt, 2020

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

KHOA SINH HỌC

TÊN ĐỀ TÀI

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA BÈO TẤM DƯỚI ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ KIM LOẠI NẶNG

Giảng viên hướng dẫn: TS. Hoàng Thị Như Phương

Th.S. Trần Thị Nhung

Đà Lạt, 2020

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học, chúng tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ của thầy cô, anh chị, bạn bè và gia đình. Đặc biệt chúng tôi xin chân thành cảm ơn đến TS. Hoàng Thị Như Phương và Th.S. Trần Thị Nhung, cảm ơn hai Cô đã tận tình góp ý và hỗ trợ chúng tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài này.

Cảm ơn các thầy cô trường Đại học Đà Lạt, tất cả thầy cô khoa Sinh học trường Đại học Đà Lạt đã tận tình dạy dỗ và truyền đạt những kiến thức quý báu trong suốt thời gian vừa qua.

Cuối cùng chúng tôi xin chân thành cảm ơn gia đình và bạn bè đã động viên giúp đỡ tận tình.

Xin chân thành cảm ơn!

MỤC LỤC

MỤC LỤC i
DANH MỤC BẢNG iii
DANH MỤC BIỂU ĐỒ iv
DANH MỤC HÌNH ẢNH v
LỜI MỞ ĐẦU 1
PHẦN 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU 2
1.1 Tổng quan bèo tấm 2
1.1.1 Vị trí phân loại 2
1.1.2 Đặc điểm hình thái của bèo tấm 3
1.2 Kim loại nặng 4
1.2.1 Một số kim loại nặng thường gặp 4
1.2.3 Một số đối tượng thực vật được sử dụng để xử lý kim loại nặng trong nước thải. 5
1.3 Một số nghiên cứu sử dụng bèo tấm để xử lý kim loại nặng 8
1.3.1 Trên thế giới 8
1.3.2 Ở Việt Nam 10
PHẦN 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP 11
2.1 Địa điểm, thời gian và mục đích thực hiện đề tài 11
2.1.1 Địa điểm thu mẫu 11
2.1.2 Địa điểm và thời gian thực hiện 11
2.1.3 Mục đích nghiên cứu 11
2.1.4 Đối tượng nghiên cứu 11
2.1.5 Dụng cụ trong nghiên cứu 11
2.2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu 12
2.2.1 Nội dung nghiên cứu 12
2.2.2 Khử trùng mẫu 12

2.2.3 Môi trường nuôi bèo 12
2.2.4 Điều kiện nuôi cấy 13
2.2.5 Bố trí thí nghiệm 13
PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 15
Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BGG. 15
Thí nghiệm 2: Khả năng ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTR. 19
Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTN. 21
Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Spirodela* BTN. 24
Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Wolffia* LĐG. 27
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 29
TÀI LIỆU THAM KHẢO 30

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Phân loại bèo tấm (Klaus và cs., 2013; Bog và cs., 2020) 2

Bảng 1.2. Giá trị giới hạn về các thông số và nồng độ của 3 kim loại As, Cd, Pb trong nước thải công nghiệp.....5

Bảng 1.3. Một số bài báo nghiên cứu về đối tượng bèo tấm trên kim loại nặng 9

Bảng 2.1. Thành phần các nguyên tố dinh dưỡng trong môi trường nhân tạo nuôi cấy bèo tấm (Appenroth và cs., 1996) 11

Bảng 2.2. Khối lượng muối kim loại được dùng để pha dung dịch mẹ.....12

Bảng 3.1. Sự gia tăng diện tích bề mặt (cm^2) của dòng *Lemna* BGG khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.....14

Bảng 3.2. Sự gia tăng diện tích bề mặt (cm^2) của dòng *Lemna* BTR khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.....18

Bảng 3.3. Sự gia tăng diện tích bề mặt (cm^2) của dòng *Lemna* BTN khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.....21

Bảng 3.4. Sự gia tăng diện tích bề mặt (cm^2) của các dòng *Spirodela* BTN khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.....24

Bảng 3.5. Sự gia tăng số lượng frond của dòng *Wolffia* LĐG khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.....26

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Số lần gia tăng diện tích bề mặt của dòng *Lemna* BGG khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày 15

Biểu đồ 3.2. Số lần gia tăng diện tích bề mặt của dòng *Lemna* BTR khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày 18

Biểu đồ 3.3. Số lần gia tăng diện tích bề mặt của dòng *Lemna* BTN khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày 21

Biểu đồ 3.4. Số lần gia tăng diện tích bề mặt của dòng *Spirodela* BTN khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày 24

Biểu đồ 3.5. Sự gia tăng số frond của dòng *Wolffia* LĐG khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.....26

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Sơ đồ xử lý nước thải sinh hoạt kết hợp nuôi trồng bèo tấm.....8

Hình 2.1. Các dòng bèo tấm sử dụng trong nghiên cứu 13

Hình 3.1. Sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BGG khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} ở ngày 1 (D1) và ngày 14 (D14).....17

Hình 3.2. Sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTR khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} ở ngày 1 (D1) và ngày 14 (D14).....20

Hình 3.3. Sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTN khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các ion $As^{3+,}$ Cd^{2+} và Pb^{2+} ở ngày 1 (D1) và ngày 14 (D14).....23

Hình 3.4. Sự sinh trưởng của dòng *Spirodela* BTN khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} ở ngày 1 (D1) và ngày 14 (D14).....25

LỜI MỞ ĐẦU

Cùng với quá trình công nghiệp hóa và hiện đại hóa, ô nhiễm kim loại nặng đang là vấn đề đáng quan ngại không chỉ ở Việt Nam mà còn trên thế giới. Những hậu quả của nó mang tới nhiều hệ lụy và tác động xấu tới đời sống và sinh hoạt của con người. Vì vậy, ô nhiễm kim loại nặng đang là vấn đề cấp thiết và cần phải có nhiều phương pháp giải quyết hiệu quả. Trong khi đó, việc sử dụng các loài thực vật thủy sinh để thu hồi lượng kim loại nặng trong nước là một trong những giải pháp bổ trợ để xử lí nguồn nước bị ô nhiễm kim loại nặng. Phương pháp này kết hợp với các phương pháp hóa, lý mang lại hiệu quả xử lý tối ưu.

Trong những thực vật thủy sinh dùng để xử lý kim loại nặng, bèo tấm là một trong những đối tượng đã và đang được ứng dụng ở một số nước châu Âu, Mỹ, Isarel, …. Chúng mang nhiều ưu điểm mà ít loài thực vật thủy sinh cũng như thực vật trên cạn có được như phân bố rộng khắp, tốc độ sinh trưởng nhanh, dễ dàng thích nghi với hầu hết các điều kiện sinh thái khác nhau, có khả năng hấp thu nhiều loại kim loại nặng, ... và đặc biệt sinh khối sau xử lý có thể được sử dụng làm nhiên liệu sinh học.

Ở Việt Nam, bèo tấm khá đa dạng về loài và phân bố hầu hết ở các vùng địa lý trong nước. Nhưng trên thực tế, những công trình nghiên cứu về bèo tấm cũng như các ứng dụng của chúng trong xử lý nguồn nước bị ô nhiễm kim loại nặng chưa nhiều.

Trên cơ sở đó, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài "**Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của bèo tấm tại Việt Nam dưới ảnh hưởng của một số kim loại nặng**" nhằm mục đích tìm ra ngưỡng chịu đựng của một số dòng bèo tấm được thu ở Việt Nam trên môi trường chứa kim loại nặng. Kết quả nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về việc ứng dụng bèo tấm để xử lý nguồn nước bị ô nhiễm kim loại nặng.

PHẦN 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Tổng quan bèo tấm

1.1.1 Vị trí phân loại

Hiện nay, phân họ Bèo tấm (Lemnoideae) hoặc họ Bèo tấm (Lemnaceae) có 36 loài thuộc 5 chi: *Spirodela, Landoltia, Lemna, Wolffella* và *Wolffia* (Bog và cs., 2020).

Bảng 1.1. Phân loại bèo tấm (Klaus và cs., 2013; Bog và cs., 2020).

Phân họ	Chi	Loài
Lemnoideae Engl.	*Landoltia* Les & Crawford	*L. punctata* (G. Mey.) Les & D.J. Crawford.
	Lemna L.	*L. aequinoctialis* Welw.
		L. perpusilla Torr.
		L. tenera Kurz.
		L. disperma Hegelm.
		L. gibba L.
		L. japonica Landolt.
		L. minor L.
		L. obscura (Austin) Daubs.
		L. trisulca L.
		L. turionifera Landolt.
		L. minuta Kunth.
		L. yungensis Landolt.
	Spirodela Schleid.	*S. intermedia* W.Koch.
		S. polyrhiza (L.) Schleid.
Wolffioideae Engl.	*Wolffia* Horkel ex Schleid.	*W. australiana* (Benth.) Hartog & Plas.
		W. borealis (Engelm. ex Hegelm.) Landolt.
		W. brasiliensis Wedd.
		W. microscopica (Griff.) Kurz.
		W. angusta Landolt.

		W. arrhiza (L.) Horkel ex Wimm.
		W. columbiana H.Karst.
		W. cylindracea Hegelm.
		W. elongata Landolt
		W. globosa (Roxb.) Hartog & Plas.
		W. neglecta Landolt.
	Wolffiella Hegelm.	*W. rotunda* Landolt.
		W. hyalina (Delile) Monod.
		W. repanda (Hegelm.) Monod.
		W. caudata Landolt.
		W. denticulata (Hegelm.) Hegelm.
		W. gladiata (Hegelm.) Hegelm.
		W. lingulata (Hegelm.) Hegelm.
		W. neotropica Landolt.
		W. oblonga (Phil.) Hegelm.
		W. welwitschii (Hegelm.) Monod.

Bèo tấm là một loài thực vật thủy sinh trôi nổi trên mặt nước, phân bố rộng rãi trên thế giới từ vùng nhiệt đới tới vùng ôn đới, từ nước ngọt đến nước lợ (Hillman và cs., 1978); thích nghi và sinh trưởng nhanh dưới điều kiện nắng ấm; chúng có thể tồn tại trong môi trường có nhiệt độ khắc nghiệt. Tuy nhiên, ở sa mạc và cả hai cực của trái đất thì hiếm hoặc không có sự có mặt của bèo tấm. Bèo tấm có xu hướng sống ở vùng nước giàu dinh dưỡng tĩnh hoặc di chuyển chậm (ao, hồ, ...) và được phát tán nhờ dòng nước, lũ lụt hay một số loài chim (vịt trời) (Skillicorn và cs., 1993).

1.1.2 Đặc điểm hình thái của bèo tấm

Bèo tấm là loài thực vật có hoa có kích thước cơ thể nhỏ nhất (0,5 mm - 2 cm). Cấu trúc cơ thể bèo tấm thường gồm có hai phần: lá có dạng hình trứng (thường được gọi là frond) và rễ (Wang, 1990). Tùy thuộc vào loài mà không hoặc có sự hình thành rễ (số lượng rễ cũng thay đổi theo loài) (Correll và cs., 1972). Khi nhiệt độ giảm thấp, bèo tấm có xu hướng hình thành các "turion" (chồi ngủ) để đối phó với điều kiện thời

tiết khắc nghiệt và chìm xuống đáy đến mùa xuân. Khi thời tiết dần trở nên ấm áp, chúng sẽ được kích hoạt và sinh trưởng lại bình thường (Skillicorn và cs., 1993).

Bèo tấm có tốc độ sinh trưởng nhanh nhất (Hillman và cs., 1978; Landolt, 1987; Skillicorn và cs., 1993). Chúng có thể phát triển số lượng lên gấp đôi chỉ trong khoảng thời gian 24 giờ, tùy thuộc vào môi trường (Ziegler và cs., 2015; Sree và cs., 2016). Cấu trúc cơ thể được đơn giản hóa qua quá trình chọn lọc tự nhiên, đặc biệt là kích thước của bèo tấm tỷ lệ nghịch với mức độ tiến hóa và kích thước của hệ gen (*Spirodela polyrhiza* với kích thước cơ thể là 1,5 cm và kích thước hệ gen là 150 Mbp, trong khi *Wolffia arrhiza* có hệ gen lên tới 1881 Mbp trong khi kích thước cơ thể chỉ 0,2 cm) (Wang và cs., 2011).

1.2 Kim loại nặng

1.2.1 Một số kim loại nặng thường gặp

Kim loại nặng là những kim loại có khối lượng riêng lớn hơn 5 g/cm^3, có số hiệu nguyên tử cao và thường thể hiện tính kim loại ở nhiệt độ phòng. Kim loại nặng được chia làm 3 loại: các kim loại độc (Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn, …), những kim loại quý (Pd, Pt, Au, Ag, Ru, …), các kim loại phóng xạ (U, Th, Ra, Am, …). Khi ở dạng nguyên tố thì kim loại nặng không có hại, nhưng khi tồn tại ở dạng ion thì kim loại nặng lại rất độc hại cho sức khỏe chúng ta.

Trong đó, asen, cadimi và chì là những kim loại nặng có độ độc cao đối với sức khỏe con người.

Asen (As): là một á kim gây ngộ độc và có nhiều dạng thù hình: màu vàng (phân tử phi kim) và một vài dạng màu đen và xám (á kim). Asen và các hợp chất của nó được sử dụng như là thuốc trừ dịch hại, thuốc trừ cỏ, thuốc trừ sâu và trong một loạt các hợp kim. Hàm lượng asen cho phép có mặt trong nguồn nước sinh hoạt là dưới 0,01 mg/l.

Cadimi (Cd): Là một kim loại chuyển tiếp tương đối hiếm, mềm, màu trắng ánh xanh và có độc tính. Cadimi tồn tại trong các quặng kẽm và được sử dụng chủ yếu trong các loại pin. Nguyên tố này và các hợp chất của nó là những chất cực độc (thậm chí chỉ với nồng độ thấp). Chúng sẽ tích lũy sinh học trong cơ thể cũng như trong các hệ sinh thái. Nuốt phải một lượng nhỏ cadimi có thể phát sinh ngộ độc tức thì gây tổn thương gan và thận. Hàm lượng cadimi cho phép có mặt trong nguồn nước sinh hoạt là dưới 0,005 mg/l.

Chì (Pb): là một kim loại mềm, nặng, độc hại và có thể tạo hình. Chì có màu trắng xanh khi mới cắt nhưng bắt đầu xỉn màu thành xám khi tiếp xúc với không khí. Chì dùng trong xây dựng, ắc quy chì, đạn và là một phần của nhiều hợp kim. Khi tiếp xúc ở một mức độ nhất định, chì là chất độc đối với động vật cũng như con người. Nó gây tổn thương cho hệ thần kinh và gây ra rối loạn não. Tiếp xúc ở mức cao cũng gây ra rối loạn máu ở động vật, chì là chất độc thần kinh tích tụ trong mô mềm và trong xương.

Theo Tiêu Chuẩn TCVN 5945:1995 có quy định chỉ số về kim loại nặng trong nước thải công nghiệp được mô tả tại bảng 1.2.

Bảng 1.2. Giá trị giới hạn về các thông số và nồng độ của 3 kim loại As, Cd, Pb trong nước thải công nghiệp.

STT	Thông số	Giá trị giới hạn (mg/l)		
		A	B	C
1	Asen	0,05	0,1	0,5
2	Cadimi	0,01	0,02	0,5
3	Chì	0,1	0,5	1

A: Nước thải công nghiệp nhỏ hơn hoặc bằng có thể đổ và các vực nước dùng làm nguồn cấp nước sinh hoạt.

B: Nước thải công nghiệp nhỏ hơn hoặc bằng chỉ được đổ vào các vực nước dùng cho các mục đích giao thông thuỷ, tưới tiêu, bơi lội, nuôi thuỷ sản, trồng trọt, ...

C: Nước thải công nghiệp lớn hơn thì không được phép thải ra môi trường.

1.2.3 Một số đối tượng thực vật được sử dụng để xử lý kim loại nặng trong nước thải.

Hiện nay, phần lớn nước thải sinh hoạt ở các khu đô thị đều chưa được xử lý đúng mức, đây có thể là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường. Đã có nhiều giải pháp được sử dụng để loại bỏ kim loại nặng trong nước thải trước khi đưa ra ngoài môi trường. Bên cạnh một số phương pháp vật lý – hóa học, người ta đã bắt đầu nghiên cứu sử dụng kết hợp với các biện pháp sinh học vì nhiều loài thực vật có khả năng hấp thu kim loại nặng tốt. Một số loài thực vật đã được chứng minh có khả năng hấp thu kim loại nặng như: tảo, lục bình, rong đuôi chó, bèo tấm.

Sử dụng thực vật thủy sinh để loại bỏ kim loại nặng trong môi trường nước (phytoremediation) là giải pháp tiềm năng và có nhiều ưu điểm hơn so với những phương pháp khác. Thực vật thủy sinh có thể hấp thụ và tích lũy kim loại nặng trong tế bào ở các cơ quan như rễ, thân, lá nên chúng có tiềm năng sử dụng để loại bỏ các chất ô nhiễm đó ra khỏi môi trường nước. Nhiều loài thực vật thủy sinh khác nhau đã được nghiên cứu và chứng minh rằng ngoài khả năng hấp thụ nhiều kim loại khác nhau, chúng còn có tiềm năng ứng dụng trong xử lý sinh học. Việc sử dụng thực vật thủy sinh trong xử lý nước thải mang lại nhiều lợi ích về kinh tế và sinh thái như chi phí thấp, hiệu quả, tiết kiệm năng lượng, ngăn ngừa ô nhiễm thứ cấp.

- Cây lục bình (*Eichhornia crassipes*)

Lục bình là một trong những loài thực vật thủy sinh được sử dụng phổ biến để xử lý nước thải. Nó có khả năng hấp thụ các chất ô nhiễm như kim loại nặng, chất rắn lơ lửng, chất hữu cơ và mầm bệnh. Lục bình có thể sinh trưởng, hấp thụ và chuyển hóa các chất ô nhiễm trong nước thải. Kết quả nghiên cứu cho thấy, lục bình có khả năng hấp thụ crom và đồng. Do đó, chúng có thể sử dụng như một phương tiện hiệu quả để loại bỏ kim loại nặng từ nước thải (Madhu, 2011).

- Tảo

Tảo là một nhóm thực vật lớn và đa dạng với hơn 100 triệu loài, hầu hết các loài tảo sống trong nước (tảo lục, tảo đỏ, tảo xoắn, rong mơ, …) và mỗi loài đều có những đặc tính riêng. Khả năng hấp thụ kim loại nặng của tảo đã được công bố qua các nghiên cứu: tảo *Chlorella* có khả năng hấp thụ cadimi (Tuấn, 2008), tảo lục *Scenedesmus* có khả năng hấp thụ đồng và crom (Sơn và cs., 1898), tảo *Chlorella vulgaris* hấp thụ niken (Tam và cs., 2001). Cả tảo sống và tảo không sống đều có khả năng hấp thụ các ion kim loại nặng. Tảo sống hấp thụ ion kim loại qua con đường nội bào, tảo không sống hấp thụ ion kim loại nặng thông qua bề mặt thành tế bào. Tuy nhiên, tảo không sống có khả năng hấp thụ kim loại tốt hơn. Sinh khối tảo không sống có thể được coi là tập hợp của các polyme (như đường, cellulose, pectin, glycoprotein), có khả năng liên kết với các cation kim loại nặng, làm chất hấp phụ tiềm năng trong xử lý nước thải và ít tốn kém chi phí (Zeraatkar và cs., 2016). Ngoài ra, độ pH của dung dịch có ảnh hưởng đáng kể đến sự phân ly của các nhóm chức năng bề mặt của sinh khối tảo không sống và của các ion kim loại, vì vậy hiệu quả hấp thụ kim loại nặng thay đổi ở những vùng nước có pH khác nhau.

- Bèo tấm (Lemnaceae)

Bèo tấm có nhiều ưu điểm và tiềm năng hơn so với các nhóm thực vật thủy sinh khác do có tốc độ sinh trưởng rất nhanh, kích thước cơ thể nhỏ, cấu trúc đơn giản và có thể dễ dàng đánh dấu phóng xạ trên toàn bộ cơ thể (Lê và cs., 2017). Do có khả năng sinh trưởng trong môi trường nước thiếu oxy và hấp thụ các chất dinh dưỡng cần thiết như PO_4^{3-} và NO_3^- nên bèo tấm được sử dụng có hiệu quả cho việc xử lý nước thải. Vì thế, đây là loài thực vật được sử dụng trong các phương pháp phân tích sinh học để đánh giá chất lượng nước, xử lý các loại nước thải bị nhiễm kim loại nặng, …. Hầu như các loài bèo tấm đều có khả năng hấp thụ và tích lũy trong cơ thể các kim loại nặng như Cd, Cr, Pb, …. Vì thế, chúng có tiềm năng to lớn trong việc sử dụng để xử lý các nguồn nước thải hoặc các khu vực bị ô nhiễm bởi kim loại nặng như công nghệ thuộc da, hầm mỏ, … để hạn chế tối đa sự có mặt của các kim loại này trong chuỗi thức ăn. Theo nhiều công bố, bèo tấm có khả năng hấp thụ được Cd, N, Cr, Zn, Sr, Co, Fe, Mn, Cu, Pb, Al và thậm chí là Au (Hoàng, 2015).

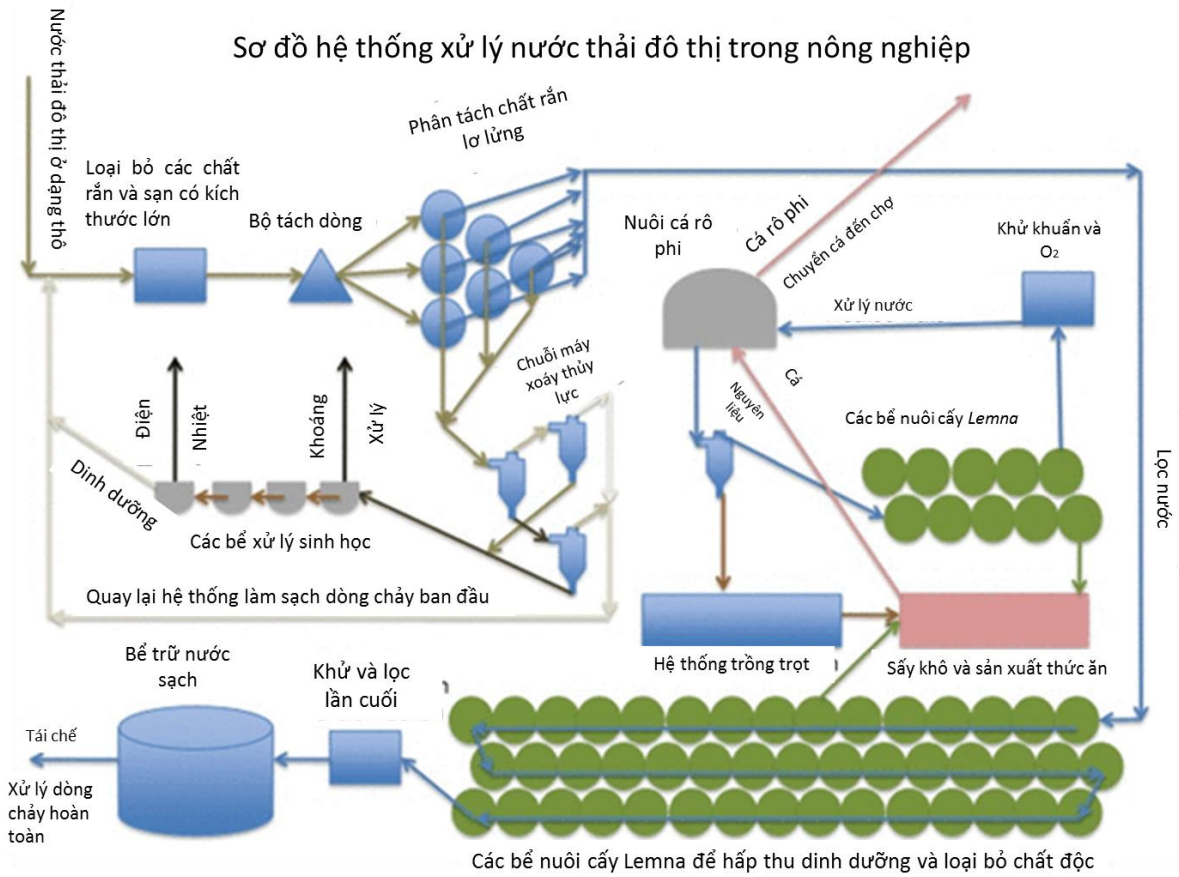
Đã có rất nhiều nghiên cứu sử dụng các loài bèo tấm để xử lý nước thải. Trong 5 chi bèo tấm, chi *Lemna* có mức độ phân bố rộng, tính đa dạng sinh học cao và được ứng dụng nhiều trong xử lý nước thải ô nhiễm kim loại nặng. Trong đó, *Lemna minor* được chứng minh là loài bèo tấm có khả năng hấp thu nhiều kim loại nặng tuy nhiên ngưỡng chịu đựng của nó đối với nồng độ của từng kim loại là khác nhau (Zn > Ni > Cd > Cu) (Khellaf và cs., 2009).

1.3 Một số nghiên cứu sử dụng bèo tấm để xử lý kim loại nặng

1.3.1 Trên thế giới

Sự có mặt của kim loại nặng trong môi trường nước ngày càng gia tăng cùng với sự phát triển kinh tế - xã hội. Để khắc phục cũng như giảm thiểu được tình trạng ô nhiễm môi trường nước ngày nghiêm trọng, các nhà khoa học đã tiến hành nhiều phương án khác nhau nhằm cải thiện chất lượng nguồn nước. Bên cạnh các ứng dụng trong chăn nuôi, làm nhiên liệu sinh học hay thức ăn cho con người thì bèo tấm đang được sử dụng như một nguồn nguyên liệu phục vụ trong công nghiệp xử lý nước thải có nhiều hứa hẹn. Do có khả năng sinh trưởng trong môi trường nước thiếu oxy và các chất dinh dưỡng cần thiết như PO_4^{3-} và NO_3^- nên bèo tấm được sử dụng có hiệu quả trong việc cải thiện môi trường nước thông qua việc dung nạp amoni hay hấp thụ kim loại nặng. Bèo tấm đã được nuôi trồng trong các bể nuôi cấy để xử lý nước thải sinh

hoạt (kết hợp với các phương pháp xử lý vật lý - hóa học - sinh học) và sinh khối bèo tấm được dùng để sản xuất thức ăn cho cá rô phi (Skillicorn và cs., 1993) (Hình 1.1). Các nghiên cứu gần đây đã công bố nhiều kết quả khả quan về khảo sát khả năng hấp thụ các kim loại nặng (Fe, Cu, Cd, Zn, ...) trong môi trường nước của bèo tấm (Demim và cs., 2013; Mechora và cs., 2015; Lê và cs., 2017; Bokhari và cs., 2019a).



Hình 1.1. Sơ đồ xử lý nước thải sinh hoạt kết hợp nuôi trồng bèo tấm.

(chỉnh sửa từ nguồn (Skillicorn và cs., 1993))

Có rất nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để đánh giá khả năng sinh trưởng cũng như hấp thụ các loại kim loại nặng khác nhau của các loài bèo tấm (Bảng 1.3).

Bảng 1.3. Một số bài báo nghiên cứu về đối tượng bèo tấm trên kim loại nặng.

STT	Loài	Nguyên tố	Dải nồng độ nghiên cứu (mg/l)	Nồng độ tối ưu (mg/l)	Tên bài báo
1	*Lemna minor*	As	0,5; 1; 2	0,5	(Goswami và cs., 2014a)
2	*Lemna gibba*	Ni	1,95; 2,15; 2,34.	2,15	(Bokhari và cs., 2019a)
		Pb	1,45; 1,51; 1,57.	1,51	
		Cd	0,65; 0,74; 0,84.	0,74	
3	*Lemna minor*	Hg	0,02; 0,2; 2; 20.	2	(Varga và cs., 2013)
		Cd		0,2	
		Cr		0,2	
	Lemna gibba	Hg		0,02	
		Cd		0,02	
		Cr		0,02	
4	*Spirodela polyrhiza*	Cd	0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3.	3	(Chaudhuri và cs., 2014)
	Lemna minor			2	

1.3.2 Ở Việt Nam

Ở Việt Nam hiện nay, tình trạng ô nhiễm môi trường nước ngày càng gia tăng và các nghiên cứu về xử lý nước thải cũng ngày càng được chú trọng. Bên cạnh các biện pháp lý – hóa học, biện pháp hấp thụ sinh học bằng các thực vật sống chưa được chú trọng nghiên cứu nhiều.

Số lượng công trình nghiên cứu về bèo tấm trong xử lý nước thải ở Việt Nam còn khá khiêm tốn. Một vài nghiên cứu ứng dụng bèo tấm trong xử lý nước thải chăn nuôi như nghiên cứu đánh giá khả năng hấp thu muối dinh dưỡng và cải thiện chất lượng nước thải ao nuôi cá tra bằng *Lemna aequinoctiali* (Lê, 2014). Gần đây, ở Việt Nam đã có một vài nghiên cứu tiêu biểu của Lê Văn Bắc về ảnh hưởng của vật liệu nano đồng đến sinh trưởng của bèo tấm (Lê và cs., 2017), ảnh hưởng của các vật liệu nano bạc lên sự phát triển của bèo tấm (Hương và cs., 2016).

PHẦN 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Địa điểm, thời gian và mục đích thực hiện đề tài

2.1.1 Địa điểm thu mẫu

Các dòng bèo tấm được thu ở các khu vực địa lý khác nhau vào tháng 5 và tháng 6 năm 2019 tại Việt Nam:

- Dòng thuộc chi *Spirodela* thu tại Bình Thuận.
- Các dòng thuộc chi *Lemna* thu tại Bắc Giang, Bình Thuận, Bến Tre.
- Dòng thuộc chi *Wolffia* thu tại Lâm Đồng.

2.1.2 Địa điểm và thời gian thực hiện

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng Nuôi cấy mô – khoa Sinh học – Trường Đại học Đà Lạt.

Thời gian thực hiện từ tháng 1/2020 đến tháng 6/2020.

2.1.3 Mục đích nghiên cứu

Bước đầu khảo sát sự sinh trưởng và phát triển của bèo tấm dưới ảnh hưởng của một số kim loại nặng để tìm ra ngưỡng chịu đựng phù hợp mà chúng có thể sinh trưởng và phát triển.

2.1.4 Đối tượng nghiên cứu

Để tiến hành các thí nghiệm chúng tôi sử dụng các cá thể bèo tấm thuộc chi *Lemna, Spirodela, Wolffia* được thu từ 4 vùng khác nhau bao gồm:

- Dòng thuộc chi *Spirodela* thu tại Bình Thuận: *Spirodela* BTN.
- Dòng thuộc chi *Lemna* thu tại Bắc Giang: *Lemna* BGG.
- Dòng thuộc chi *Lemna* thu tại Bình Thuận: *Lemna* BTN.
- Dòng thuộc chi *Lemna* thu tại Bến Tre: *Lemna* BTR.
- Dòng thuộc chi *Wolffia* thu tại Lâm Đồng: *Wolffia* LĐG.

Các mẫu bèo tấm sau khi thu về, được khử trùng bề mặt và nuôi trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo trong điều kiện *in vitro* cho đến khi đạt trạng thái sinh lý tốt nhất về tốc độ phân chia nhanh, màu sắc và kích thước frond (2 lá/frond) sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm.

2.1.5 Dụng cụ trong nghiên cứu

Nồi hấp Autoclave (Tommy SS - 325), cân kĩ thuật, cân phân tích, tủ lạnh, pipet (1, 5, 10 ml), ống đong (50, 100, 250, 500, 1000 ml), cốc thủy tinh (100, 250, 500, 1000 ml), bình định mức (50 ml, 100 ml), máy khuấy từ, pank, que cấy, ...

Bình nuôi thủy tinh (350 ml), nắp đậy nilon.

Dàn nuôi có hệ thống đèn LED.

2.2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Nội dung nghiên cứu

Khảo sát sinh trưởng của năm dòng bèo tấm: *Spirodela* BTN, *Lemna* (BGG, BTN và BTR) và *Wolffia* LĐG trên môi trường N - medium (bảng 2.1) có bổ sung các ion kim loại nặng với nồng độ như sau: As^{3+} (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/l) hoặc Pb^{2+} (0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 mg/l) hoặc Cd^{2+} (0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 mg/l).

2.2.2 Khử trùng mẫu

Sau khi thu mẫu, chúng tôi tiến hành khử trùng để loại bỏ hầu hết các thành phần vi sinh vật. Mẫu được rửa dưới vòi nước chảy, sau đó đưa vào tủ cấy vô trùng để rửa bằng dung dịch ethanol 70% trong vòng 30 giây và rửa lại bằng nước hấp vô trùng ít nhất 3 lần. Tiếp tục cho mẫu vào dung dịch javel 0,9%, lắc nhẹ trong vòng 1,5 phút và rửa lại 3 lần bằng nước hấp vô trùng.

Lựa chọn những mẫu bèo tấm ít bị tổn thương và cấy vào môi trường dinh dưỡng để sử dụng làm nguồn mẫu cho các thí nghiệm.

2.2.3 Môi trường nuôi bèo

Tất cả các mẫu cấy của thí nghiệm được nuôi cấy trong môi trường N – medium (bảng 2.1). Tùy theo từng thí nghiệm mà sử dụng các ion kim loại nặng (As^{3+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}) dưới dạng muối As_2SO_3, $CdCl_2$, $Pb(NO_3)_2$ với nồng độ khác nhau.

Bảng 2.1. Thành phần các nguyên tố dinh dưỡng trong môi trường nhân tạo nuôi cấy bèo tấm (Appenroth và cs., 1996).

Hóa chất	Khối lượng mol	Khối lượng mg/l
KH_2PO_4	136,1	4 083
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	236,15	47 230
KNO_3	101,1	161 800
$MgSO_4.7H_2O$	246,48	49 300
H_3BO_3	61,83	61,83
$MnCl_2.4H_2O$	197,9	514,5
$Na_2MoO_4.2H_2O$	241,95	19,4
Fe(III)EDTA hoặc	345,07	1 725
FeNaEDTA.3H2O	421,1	2 105

Các ion kim loại nặng:

Các muối chứa ion kim loại nặng được pha thành dung dịch mẹ với nồng độ ion là mg/l (bảng 2.2), sau đó dung dịch mẹ được bổ sung vào môi trường dinh dưỡng với các nồng độ khảo sát.

Bảng 2.2. Khối lượng muối kim loại được dùng để pha dung dịch mẹ.

Ion	Muối	Khối lượng muối (mg) cần dùng để pha 50 ml dung dịch có nồng độ ion là 1 mg/ml
As^{3+}	As_2SO_3	132
Cd^{2+}	$CdCl_2$	81,67
Pb^{2+}	$Pb(NO_3)_2$	80

Môi trường nuôi bèo có bổ sung ion asen (As^{3+}) với các nồng độ 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/l.

Môi trường nuôi bèo có bổ sung ion cadimi (Cd^{2+}) với các nồng độ: 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 mg/l.

Môi trường nuôi bèo có bổ sung ion chì (Pb^{2+}) với các nồng độ: 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 mg/l.

Sau khi pha môi trường xong, tiến hành phân phối khoảng 150 ml vào bình thủy tinh có dung tích 350 ml, đậy kín bằng màng nilon và hấp khử trùng ở 121^oC, 1 atm trong vòng 20 phút. Môi trường hấp xong được lấy ra khỏi nồi hấp, để nguội và có thể sử dụng để tiến hành thí nghiệm.

2.2.4 Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được tiến hành trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ trung bình 25±2^oC.

Tất cả các bình mẫu đều được chiếu sáng bằng đèn LED trắng có cường độ 40µmol.$m^{-2}s^{-1}$ với chu kì chiếu sáng là 16 giờ/ngày.

2.2.5 Bố trí thí nghiệm

Nghiên cứu bao gồm 5 thí nghiệm sau:

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BGG.

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTR.

Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTN.

Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Spidorela* BTN.

Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Wolffia* LĐG.

Số frond bố trí thí nghiệm của từng dòng có sự khác nhau: 4 frond của 3 dòng *Lemna*; 3 frond của dòng *Spidorela* BTN; 25 frond của dòng *Wolffia* LĐG do sự khác nhau về diện tích bề mặt (Hình 2.1).

Các nghiệm thức được ký hiệu như sau:

Tên dòng bèo tấm_As/Cd/Pb_nồng độ.

Ví dụ: *Spirodela* BTN_As_0,9: nghĩa là nghiệm thức nuôi cấy *Spirodela* BTN trên môi trường có bổ sung As^{3+} với nồng độ là 0,9 mg/l.

Mỗi một nghiệm thức được lặp lại 2 lần.

Thời gian theo dõi: 14 ngày, chụp hình mỗi ngày ở cùng một thời điểm.

***Chỉ tiêu theo dõi*:** Sự gia tăng diện tích bề mặt (phần mềm ImageJ).



Hình 2.1. Các dòng bèo tấm sử dụng trong nghiên cứu.

2.2.5 Xử lý hình ảnh và số liệu

Hình ảnh được chụp hằng ngày và sử dụng phần mềm ImageJ để đo diện tích bề mặt.

Các số liệu về sự gia tăng diện tích bề mặt, số lượng frond và vẽ biểu đồ được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013.

PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các frond khỏe mạnh của dòng bèo tấm *Lemna* BGG, BTN và BTR; dòng *Wolffia* LĐG; dòng *Spirodela* BTN được khử trùng và nuôi trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo cho đến khi đạt trạng thái sinh lý tốt nhất (các frond phát triển tốt, xanh và không có dấu hiệu tổn thương). Tiếp theo, 4 frond khỏe mạnh và có kích thước tương đối đồng đều nhau của các dòng *Lemna*, 3 frond của dòng *Spirodela* BTN và 25 frond của dòng *Wolffia* LĐG được bố trí vào các nghiệm thức có bổ sung kim loại nặng với các nồng độ khác nhau. Sự khác nhau về số lượng frond bố trí trong các nghiệm thức là do sự khác nhau về diện tích bề mặt mẫu của các dòng khảo sát (hình 2.1). Mẫu được theo dõi và thu số liệu về sự gia tăng diện tích bề mặt mỗi ngày trong vòng 14 ngày (D1 – D14). Do diện tích bề mặt của mỗi loài là khác nhau, vì thế chúng tôi sử dụng tỷ lệ số lần gia tăng sinh khối để so sánh tốc độ phát triển giữa các loài. Tỷ lệ này được tính dựa trên diện tích bề mặt của mẫu nuôi cấy trong ngày đầu tiên.

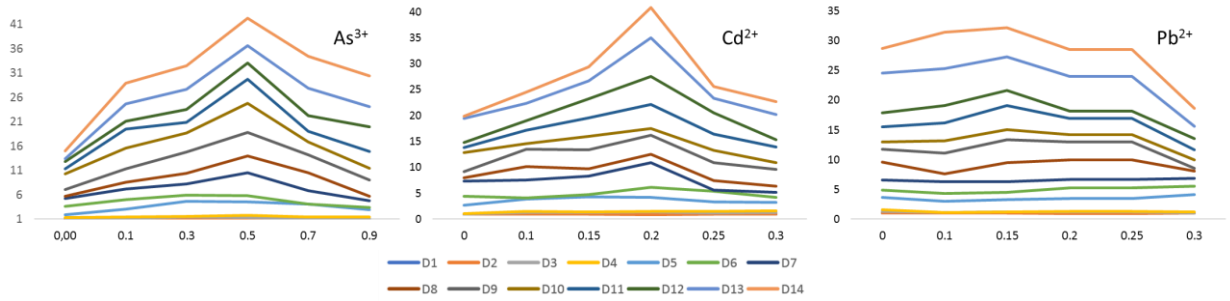
Cảm ứng của các dòng bèo trên môi trường bổ sung riêng lẻ từng loại kim loại nặng với các nồng độ khác nhau được ghi nhận thông qua các thí nghiệm sau:

Thí nghiệm 1: **Khảo sát ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BGG.**

Trong thí nghiệm này, 4 frond của mẫu bèo tấm dòng *Lemna* BGG với kích thước và số lá tương tự nhau được nuôi cấy trong các nghiệm thức bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} với các nồng độ khác nhau. Sự gia tăng diện tích bề mặt của mẫu sau mỗi ngày được thu nhận trong vòng 14 ngày (bảng 3.1).

Bảng 3.1. Sự gia tăng diện tích bề mặt (cm^2) của dòng *Lemna* BGG khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

	Ion As3+ (mg/l)						Ion Cd2+ (mg/l)						Ion Pb2+ (mg/l)					
Ngày	0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
D1	0,519	0,452	0,470	0,430	0,470	0,530	0,375	0,410	0,450	0,408	0,455	0,486	0,400	0,455	0,545	0,517	0,460	0,477
D2	0,520	0,455	0,474	0,431	0,471	0,530	0,376	0,411	0,452	0,408	0,457	0,488	0,408	0,457	0,547	0,519	0,461	0,479
D3	0,635	0,511	0,694	0,589	0,501	0,601	0,381	0,512	0,589	0,561	0,549	0,610	0,532	0,594	0,501	0,612	0,564	0,508
D4	0,713	0,678	0,717	0,786	0,702	0,763	0,385	0,620	0,652	0,629	0,701	0,783	0,624	0,712	0,607	0,641	0,601	0,588
D5	0,963	1,391	2,218	1,955	1,937	1,542	1,002	1,609	1,965	1,703	1,527	1,581	1,044	1,670	1,651	1,685	1,591	1,964
D6	1,859	2,262	2,792	2,510	1,943	1,831	1,676	1,676	2,117	2,501	2,474	2,237	1,864	2,205	2,333	2,342	2,417	2,638
D7	2,738	3,260	3,872	4,524	3,240	2,555	2,752	3,116	3,728	4,466	2,562	2,529	2,632	2,993	2,719	3,262	3,072	3,284
D8	2,932	3,869	4,895	6,015	4,956	3,023	2,978	4,150	4,395	5,108	3,392	3,085	3,015	4,359	4,150	4,132	4,567	4,165
D9	3,650	5,106	7,725	8,060	6,690	4,814	3,422	5,536	6,039	6,886	5,910	4,671	3,422	5,360	6,039	6,886	5,991	4,710
D10	5,335	8,033	8,801	10,674	7,903	6,065	4,829	5,963	7,202	7,147	6,054	5,305	5,163	5,930	7,202	7,147	6,554	5,305
D11	5,864	8,832	9,802	12,770	8,920	7,868	5,163	7,471	8,816	8,390	8,783	6,954	5,557	7,071	8,816	8,390	8,783	6,954
D12	6,626	9,532	11,074	14,213	10,480	10,573	5,557	7,786	10,439	9,349	9,336	7,452	7,263	7,786	10,439	9,349	10,336	7,452
D13	6,965	15,516	14,989	15,719	13,092	12,739	7,304	11,179	13,798	16,298	12,408	10,422	7,795	11,179	13,798	16,298	12,408	10,422
D14	7,795	18,049	21,153	18,158	18,979	16,107	7,445	13,047	15,199	17,640	13,664	13,134	8,304	18,049	21,153	17,640	18,979	14,483



Biểu đồ 3.1. Số lần gia tăng diện tích bề mặt của dòng *Lemna* BGG khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

Kết quả ở biểu đồ 3.1 cho thấy:

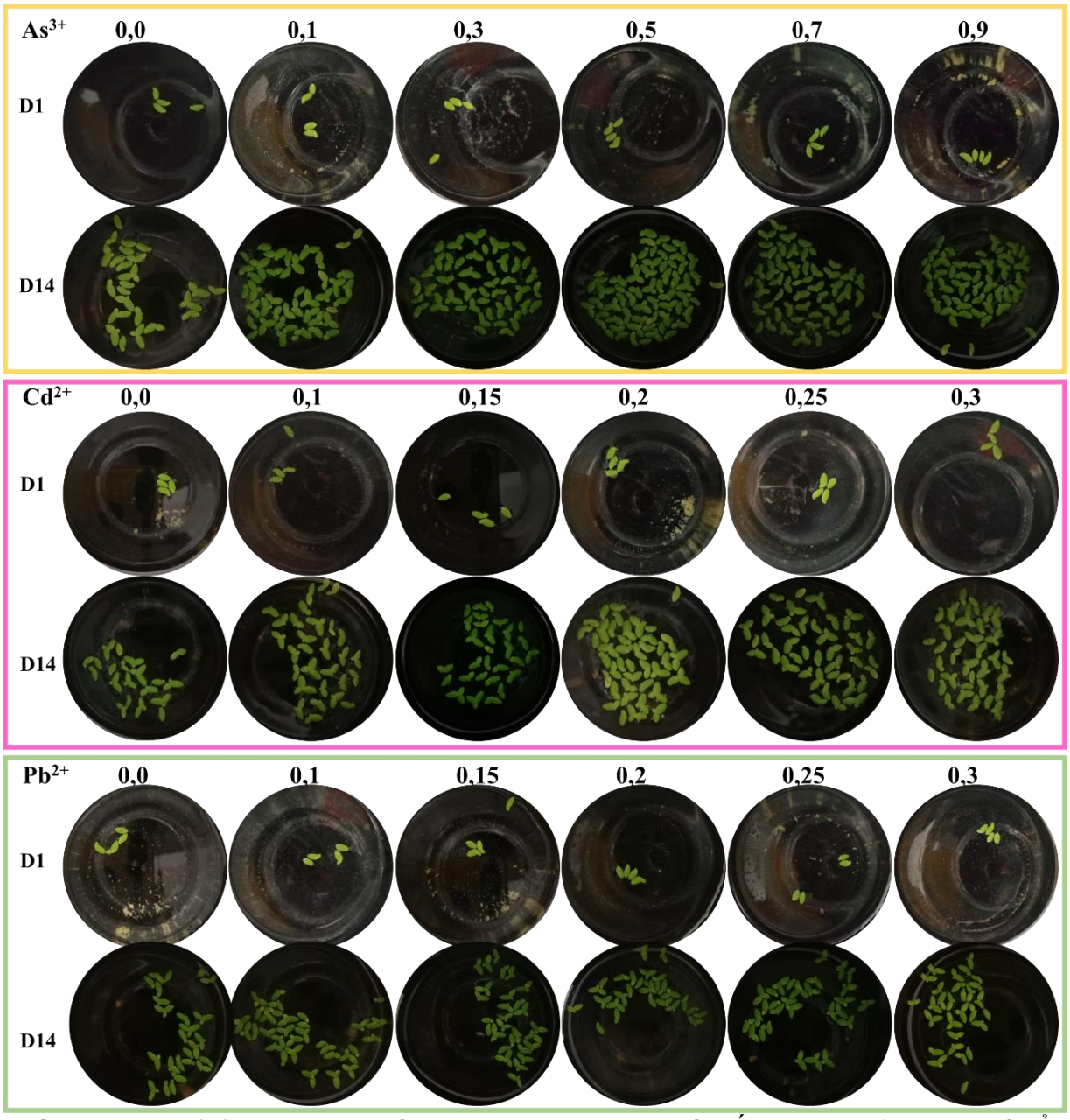
- Ngưỡng nồng độ tối ưu của các kim loại nặng khảo sát đối với dòng *Lemna* BGG là As^{3+} (0,5 mg/l), Cd^{2+}(0,2 mg/l), Pb^{2+} (0,15 mg/l), ở các nồng độ này thì tốc độ phân chia của các dòng này cao gấp nhiều lần so với đối chứng. Cụ thể là ở 0,5 mg/l As^{3+} diện tích bề mặt tăng gấp 42,23 lần (từ 0,43 lên đến 18,158 cm^2), ở 0,2 mg/l Cd^{2+} là 40,81 lần (từ 0,408 lên đến 16,652 cm^2) và ở 0,15 mg/l Pb^{2+} là 32,19 lần (từ 0,545 lên đến 17,153 cm^2) sau 14 ngày.
- Sự gia tăng sinh khối của dòng *Lemna* BGG khi có mặt ion As^{3+}, Cd^{2+} trong môi trường dinh dưỡng có sự thay đổi rõ rệt so với đối chứng.
  - Đối với Cd^{2+}, nồng độ để bèo sinh trưởng sau 14 ngày tốt nhất là 0,2 mg/l, tăng 40,81 lần so với đối chứng chỉ tăng 19,85 lần (từ 0,375 lên 7,445 cm^2). Khi nồng độ Cd^{2+} cao hơn 0,2 mg/l thì tốc độ sinh trưởng giảm dần và đến nồng độ 0,3 mg/l thì gần như ngang bằng với đối chứng. Điều này chứng tỏ, ở nồng độ Cd^{2+} 0,2 mg/l kích thích sự sinh trưởng và phát triển của bèo tấm. Có thể là với dòng này, bèo tấm hấp thụ cadimi tốt nhất khi nuôi ở nồng độ 0,2 mg/l.
  - Đặc biệt, tốc độ gia tăng sinh khối của dòng này sau 14 ngày ở nồng độ 0,5 mg/l As^{3+} tăng 42,23 lần so với đối chứng chỉ là 15,02 lần (từ 0,519 đến 7,795 cm^2). Điều này chứng tỏ có sự tác động tích cực của asen đến sự sinh trưởng và phát triển đối với dòng *Lenna* BGG. Khả năng hấp thu kim loại nặng của các dòng bèo tấm khác nhau đã được nghiên cứu bởi nhiều nhà khoa học (Goswami và cs., 2014b; Teixeira và cs., 2014; Mechora và cs., 2015; Nguyễn, 2016; Bokhari và cs., 2019b). Trong nghiên cứu này, kết quả của chúng tôi trên dòng *Lemna* BGG tương tự

như nghiên cứu trên *L. minor* với nồng độ 0,5 mg/l As^{3+} cho khả năng hấp thu và loại bỏ asen tốt nhất trong dải nồng độ khảo sát từ 0,5 đến 2,0 mg/l (Goswami và cs., 2014b).

- Sự có mặt của ion Pb^{2+} ở nồng độ nhỏ hơn 0,2 mg/l hầu như không có ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ sinh trưởng của loài và gần như tương đương với đối chứng. Ở nồng độ cao hơn 0,2 mg/l Pb^{2+}, sự phân chia của dòng *Lemna* BGG bị ức chế rõ rệt. Khả năng hấp thụ Pb^{2+} của các loài bèo tấm khác nhau đã được nghiên cứu và cho thấy mỗi loài có ngưỡng hấp thu riêng như *L. gibba* là 1,51 mg/l (Bokhari và cs., 2019b) hay ở *L. minor* là 0,2 mg/l (Ucuncu và cs., 2013). Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi trên dòng *Lemna* BGG tương tự với *L. minor* (Ucuncu và cs., 2013).

Theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 5945:1995 (bảng 1.2) về tiêu chuẩn nước thải công nghiệp thì hàm lượng được phép đưa vào nguồn cấp nước sinh hoạt của asen là 0,05 mg/l, cadimi là 0,01 mg/l và chì là 0,1 mg/l. Dòng *Lemna* BGG có thể phát triển tốt ở nồng độ As^{3+} trên ngưỡng C (0,5 mg/l - ngưỡng nước thải công nghiệp không cho phép thải ra ngoài môi trường), sống tốt ở trong môi trường có nồng độ Cd^{2+} cao gấp 15 lần trên ngưỡng B (0,03 mg/l - ngưỡng nước dùng cho các mục đích giao thông thuỷ, tưới tiêu, bơi lội, nuôi thuỷ sản, trồng trọt). Như vậy, qua thí nghiệm này cho thấy dòng *Lemna* BGG có tiềm năng sinh trưởng và phát triển tốt ở môi trường nước bị ô nhiễm asen và cadimi.

Sự gia tăng sinh khối của dòng *Lemna* BGG trong 14 ngày trên môi trường có bổ sung các ion kim loại nặng với nồng độ khác nhau được thể hiện ở hình 3.1.

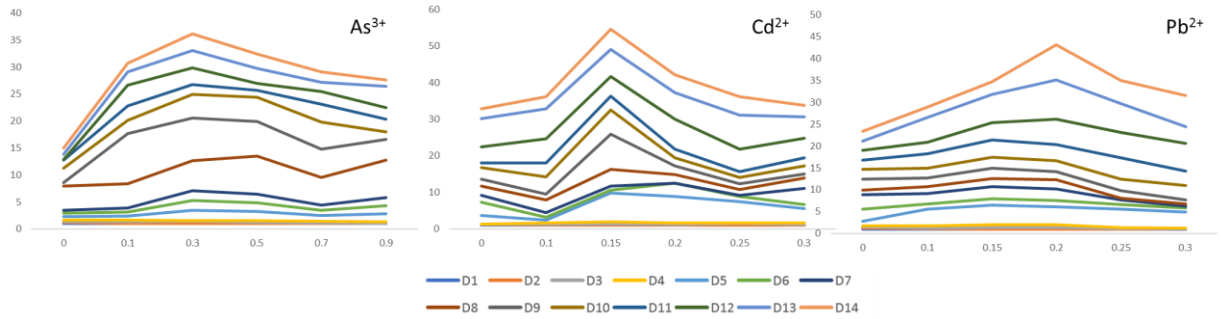


Hình 3.1. Sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BGG khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} ở ngày 1 (D1) và ngày 14 (D14).

***Thí nghiệm 2*: Khảo sát ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTR.**

Bảng 3.2. Sự gia tăng diện tích bề mặt (cm^2) của dòng *Lemna* BTR khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

	Ion As3+ (mg/l)						Ion Cd2+ (mg/l)						Ion Pb2+ (mg/l)					
Ngày	0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
D1	0,235	0,275	0,2	0,215	0,27	0,222	0,23	0,27	0,18	0,18	0,25	0,22	0,224	0,280	0,238	0,251	0,261	0,285
D2	0,286	0,277	0,201	0,217	0,273	0,224	0,261	0,274	0,182	0,18	0,264	0,22	0,285	0,287	0,238	0,252	0,262	0,288
D3	0,301	0,355	0,289	0,256	0,286	0,231	0,281	0,301	0,223	0,217	0,356	0,246	0,316	0,332	0,332	0,332	0,283	0,301
D4	0,387	0,435	0,313	0,33	0,394	0,292	0,312	0,423	0,338	0,298	0,41	0,359	0,394	0,490	0,490	0,490	0,363	0,338
D5	0,532	0,648	0,683	0,684	0,658	0,625	0,859	0,658	1,757	1,602	1,877	1,228	0,612	1,544	1,544	1,544	1,451	1,368
D6	0,677	0,861	1,053	1,038	0,922	0,958	1,659	0,862	1,899	2,243	2,221	1,451	1,235	1,893	1,893	1,893	1,458	1,786
D7	0,822	1,074	1,423	1,392	1,186	1,291	2,124	1,211	2,101	2,253	2,298	2,447	1,987	2,551	2,551	2,551	1,643	1,643
D8	1,862	2,301	2,532	2,894	2,562	2,826	2,683	2,121	2,921	2,672	2,699	3,057	2,214	2,981	2,981	2,981	1,918	1,918
D9	2,012	4,846	4,112	4,285	3,998	3,682	3,112	2,562	4,665	3,091	3,099	3,288	2,791	3,561	3,561	3,561	2,193	2,193
D10	2,65	5,526	4,991	5,236	5,356	3,982	3,845	3,854	5,843	3,51	3,5	3,788	3,281	4,164	4,164	4,164	2,468	2,468
D11	2,985	6,257	5,341	5,515	6,232	4,524	4,126	4,856	6,542	3,929	3,901	4,288	3,770	5,105	5,105	5,105	2,744	2,744
D12	3,024	7,315	5,972	5,799	6,888	4,998	5,147	6,652	7,498	5,398	5,442	5,465	4,260	5,856	7,041	9,042	6,839	6,923
D13	3,234	7,998	6,604	6,383	7,325	5,872	6,925	8,851	8,821	6,689	7,756	6,742	4,749	7,444	8,917	12,013	10,240	10,601
D14	3,526	8,429	7,236	6,968	7,847	6,124	7,547	9,741	9,837	7,576	9,021	7,442	5,239	12,595	10,616	13,837	12,677	14,789



Biểu đồ 3.2. Số lần gia tăng diện tích bề mặt của dòng *Lemna* BTR khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

Kết quả thể hiện ở biểu đồ 3.2 cho thấy:

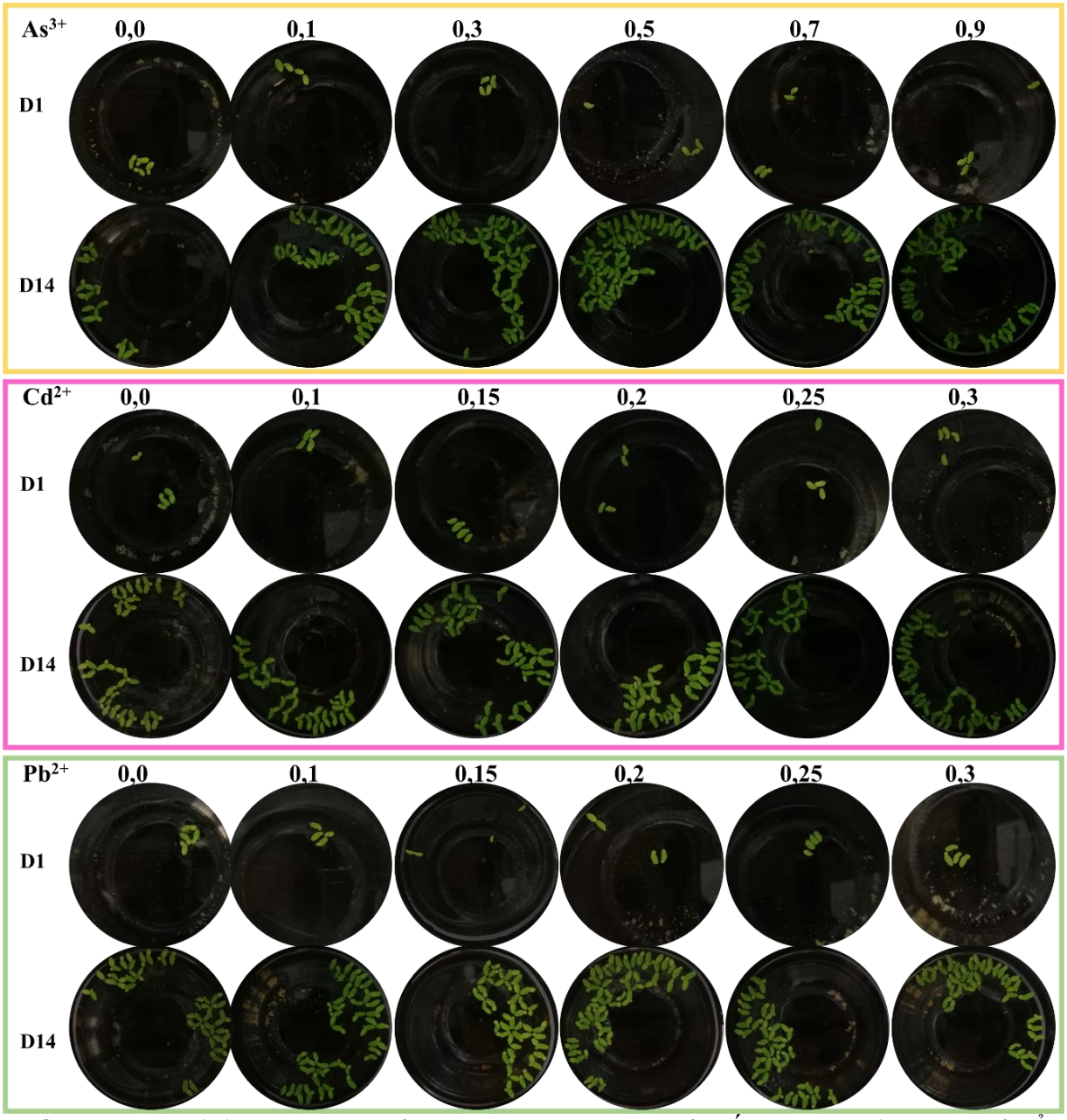
- Ở thí nghiệm về asen, tương tự như dòng *Lemna* BGG, tất cả các nghiệm thức đều có tốc độ sinh trưởng và phát triển cao hơn nghiệm thức đối chứng, với nồng độ asen 0,3 mg/l tốc độ bèo phát triển cao nhất. Ở nồng độ này, sau 14 ngày, tốc độ sinh trưởng tăng 36,18 lần (từ 0,2 đến 7,236 cm^2) trong khi ở đối chứng chỉ tăng 15 lần (từ 0,235 đến 3,526 cm^2). Các mẫu có tốc độ phát triển tương đương nhau trong 7 ngày đầu, từ ngày thứ 8 trở đi có thể nhận ra sự khác biệt.
- Ở thí nghiệm về cadimi, sự khác biệt có thể nhận thấy rõ nồng độ cadimi 0,15 mg/l kích thích sự sinh trưởng của dòng bèo này. Sau 14 ngày, diện tích bề mặt tăng 54,65 lần (từ 0,18 lên đến 9,837 cm^2). Còn ở các nồng độ còn lại không có sự khác biệt

nhiều so với nghiệm thức đối chứng. Khả năng hấp thụ cadimi của *L. minor* (0,2 mg/l) và *L. gibba* (0,02 mg/l) đã được công bố (Varga và cs., 2013). Như vậy, khả năng hấp thụ cadimi của dòng *Lemna* BTR gần như tương đương với *L. minor*.

- Đối với những nghiệm thức về chì, nghiệm thức đối chứng là nghiệm thức có tốc độ phát triển chậm nhất. Tốc độ phân chia mạnh nhất diễn ra ở nồng độ 0,2 mg/l, khi nồng độ ion chì tăng lên thì tốc độ nhân nhanh của dòng *Lemna* BTR có giảm đi nhưng vẫn cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Cụ thể là sau 14 ngày nuôi ở nồng độ 0,2 mg/l thì sinh khối tăng lên 43,18 lần (từ 0,251 lên đến 10,837 cm^2) trong khi ở đối chứng chỉ tăng 23,35 lần (từ 0,224 đến 5,239 cm^2). Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi trên dòng *Lemna* BTR cũng tương tự như kết quả đã được công bố trên loài *L. minor* (Ucuncu và cs., 2013).

Theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 5945:1995 (bảng 1.2) dòng *Lemna* BTR có thể phát triển tốt ở nồng độ As^{3+} (0,09 mg/l) trên ngưỡng C, sống tốt ở trong môi trường có nồng độ Cd^{2+} (0,3 mg/l) cao gấp 15 lần trên ngưỡng B. Như vậy, qua thí nghiệm này cho thấy dòng *Lemna* BTR có tiềm năng sinh trưởng tốt ở môi trường nước bị ô nhiễm asen và cadimi.

Sự gia tăng sinh khối của dòng *Lemna* BTR trong 14 ngày trên môi trường có bổ sung các ion kim loại nặng với nồng độ khác nhau được thể hiện ở hình 3.2.



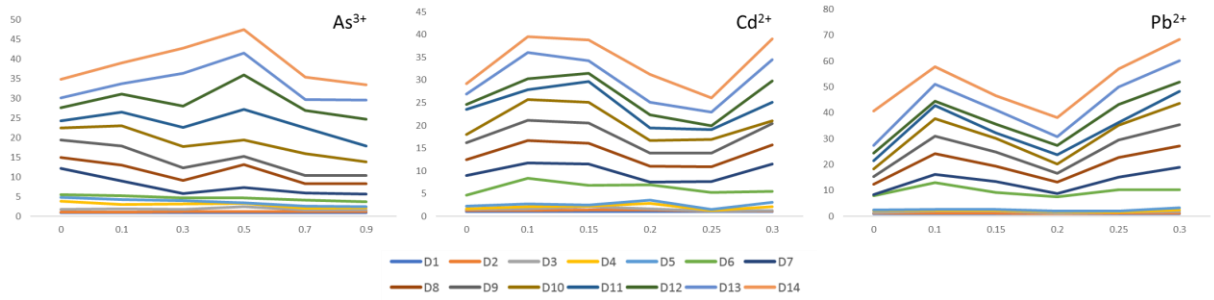
Hình 3.2. Sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTR khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} ở ngày 1 (D1) và ngày 14 (D14).

Thí nghiệm 3: **Khảo sát ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTN.**

Tương tự như thí nghiệm 1 và 2, dòng *Lemna* BTN cũng có những đáp ứng khác nhau đối với từng nồng độ của ion kim loại được bổ sung vào môi trường. Sự gia tăng diện tích bề mặt ở các nghiệm thức được thể hiện ở bảng 3.3, biểu đồ 3.3 và hình 3.3.

Bảng 3.3. Sự gia tăng diện tích bề mặt (cm^2) của dòng *Lemna* BTN khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

	Ion As3+ (mg/l)						Ion Cd2+ (mg/l)						Ion Pb2+ (mg/l)					
Ngày	0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
D1	0,201	0,211	0,216	0,213	0,223	0,225	0,253	0,256	0,254	0,248	0,239	0,255	0,265	0,257	0,254	0,265	0,249	0,268
D2	0,221	0,226	0,252	0,245	0,265	0,265	0,318	0,321	0,345	0,358	0,284	0,301	0,322	0,325	0,314	0,295	0,301	0,311
D3	0,354	0,412	0,389	0,528	0,356	0,358	0,387	0,434	0,532	0,414	0,294	0,329	0,359	0,521	0,544	0,322	0,382	0,496
D4	0,776	0,652	0,685	0,701	0,472	0,498	0,428	0,547	0,587	0,71	0,301	0,557	0,578	0,607	0,599	0,485	0,432	0,648
D5	0,965	0,896	0,852	0,742	0,589	0,561	0,559	0,698	0,625	0,877	0,374	0,787	0,649	0,703	0,677	0,549	0,512	0,880
D6	1,123	1,121	1,011	0,986	0,923	0,828	1,193	2,154	1,732	1,719	1,269	1,410	2,140	3,367	2,328	2,017	2,586	2,782
D7	2,456	1,895	1,252	1,564	1,325	1,265	2,285	3,013	2,936	1,870	1,822	2,940	2,250	4,170	3,440	2,360	3,770	5,080
D8	3,012	2,735	1,985	2,811	1,842	1,859	3,159	4,270	4,075	2,748	2,603	4,019	3,281	6,214	4,911	3,496	5,648	7,269
D9	3,892	3,782	2,654	3,252	2,315	2,352	4,088	5,428	5,231	3,445	3,327	5,210	4,081	7,947	6,293	4,433	7,353	9,485
D10	4,514	4,856	3,825	4,125	3,556	3,113	4,567	6,585	6,386	4,141	4,051	5,353	4,882	9,681	7,674	5,371	8,790	11,701
D11	4,872	5,586	4,896	5,788	5,011	4,011	5,945	7,150	7,542	4,838	4,572	6,402	5,682	10,986	8,192	6,308	9,057	12,960
D12	5,556	6,565	6,052	7,652	6,004	5,562	6,245	7,743	8,012	5,534	4,775	7,593	6,483	11,414	9,056	7,246	10,762	13,917
D13	6,045	7,125	7,853	8,856	6,615	6,652	6,810	9,246	8,697	6,231	5,499	8,785	7,283	13,148	10,437	8,183	12,466	16,133
D14	7,011	8,245	9,251	10,11	7,898	7,526	7,393	10,121	9,853	7,748	6,223	9,976	10,806	14,881	11,819	10,132	14,171	18,349



Biểu đồ 3.3. Số lần gia tăng diện tích bề mặt của dòng *Lemna* BTN khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

Kết quả thể hiện ở biểu đồ 3.3 cho thấy cảm ứng của dòng *Lemna* BTN ở các dãy nồng độ kim loại nặng khác nhau có khác biệt với hai dòng *Lemna* BGG và BTR.

- Tốc độ gia tăng sinh khối trên môi trường có bổ sung asen hầu như không có sự thay đổi lớn so với nghiệm thức đối chứng. Số lần gia tăng sinh khối cao nhất đạt được ở nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/l với mức tăng 47,48 lần (từ 0,213 đến 10,113 cm^2) so với đối chứng tăng 34,88 lần (từ 0,201 lên 7,011 cm^2) sau 14 ngày nuôi. Như vậy, sự có mặt của asen (nhỏ hơn 0,9 mg/l) trong môi trường dinh dưỡng ít có ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và phát triển dòng *Lemna* BTN.

- Đối với thí nghiệm bổ sung cadimi, ở dải nồng độ thấp (từ 0,1 đến 0,25 mg/l Cd^{2+}) thì tốc độ sinh trưởng của dòng *Lemna* BTN bị giảm sút đáng kể và thấp hơn so với đối chứng. Tuy nhiên, ở nồng độ cao hơn (0,3 mg/l) thì sự sinh trưởng lại gia tăng đột biến bắt đầu từ ngày thứ 7 và sau 14 ngày thì sinh khối tăng 39,12 lần (từ 0,255 lên đến 9,976 cm^2). Hàm lượng hấp thụ cadimi là 0,74 mg/l đối với loài *L. gibba* đã được công bố, như vậy khả năng hấp thụ các ion kim loại của các loài *Lemna* khác nhau là

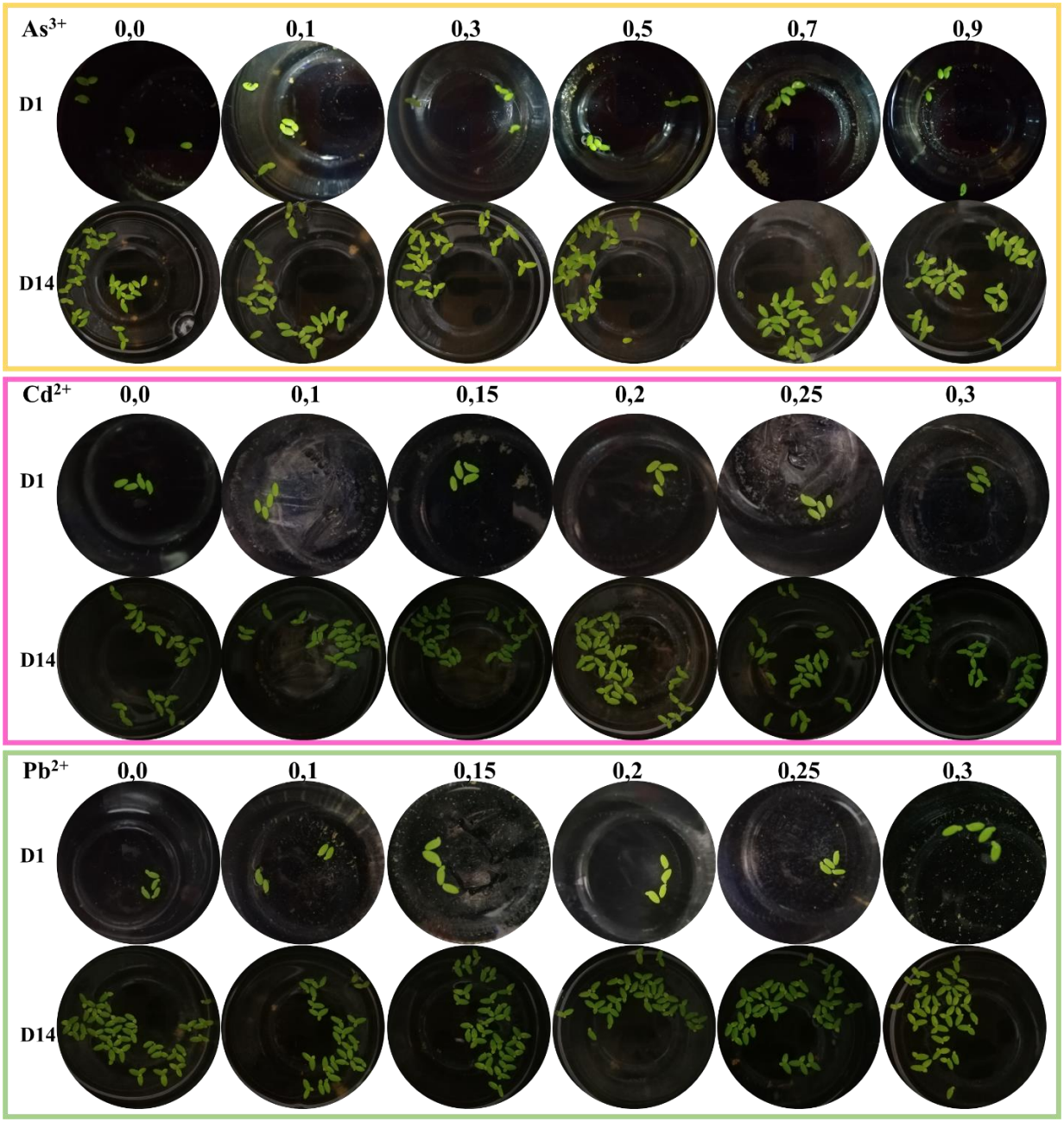
khác nhau (Bokhari và cs., 2019b). Sự thay đổi về diện tích bề mặt của dòng *Lemna* BTN khác nhau giữa các nồng độ là phản ứng đặc biệt cần nghiên cứu sâu hơn để có thể đưa ra ngưỡng chịu đựng Cd^{2+} của dòng *Lemna* BTN.

- Dòng *Lemna* BTN khá nhạy cảm với chì và sự gia tăng sinh khối không theo quy luật với sự gia tăng của nồng độ (giống với môi trường có Cd^{2+}). Ở nồng độ 0,1 mg/l Pb^{2+}, bèo có sự tăng trưởng mạnh so với đối chứng, nhưng lại giảm xuống ở nồng độ 0,15 – 0,2 mg/l. Khi nồng độ chì cao từ 0,25 mg/l sự tăng trưởng rõ rệt, cao hơn hẳn so với đối chứng và chưa có dấu hiệu bị ức chế bởi chì. Sau 14 ngày, ở nồng độ 0,3 mg/l Pb^{2+} thì diện tích bề mặt dòng *Lemna* BTN tăng 68,47 lần (từ 0,268 đến 18,349 cm^2), trong khi ở nồng độ 0,2 mg/l thì chỉ tăng 38,23 lần (từ 0,265 lên 10,132 cm^2). Như vậy, đây là loài có tiềm năng sống trên môi trường có chì ở nồng độ cao, cần được nghiên cứu thêm để tìm ra ngưỡng chịu đựng. Khả năng hấp thụ Pb^{2+} của *L. gibba* đạt 1,51 mg/l đã được công bố (Bokhari và cs., 2019b). Như vậy, cần khảo sát nồng độ Pb^{2+} cao hơn đối với dòng *Lemna* BTN để đánh giá chính xác hơn.

Như vậy, khả năng bị tác động trong môi trường có asen và cadimi của dòng *Lemna* BTN thấp hơn so với 2 dòng *Lemna* còn lại. Vì sự phát triển của dòng *Lemna* BTN không tuân theo quy luật thay đổi với nồng độ kim loại, nên cần có những nghiên cứu sâu hơn để tìm ra quy luật phát triển của loài này trên môi trường có Pb^{2+} và Cd^{2+}.

Đối chiếu với tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 5945:1995 (bảng 1.2), loài *Lemna* BTN có thể sống tốt trên môi trường có nồng độ Pb^{2+}, Cd^{2+} ở trên chuẩn B và nồng độ As^{3+} trên chuẩn C.

Như vậy, qua thí nghiệm này cho thấy dòng *Lemna* BTN có tiềm năng sinh trưởng và hấp thụ kim loại Pb^{2+} ở nồng độ cao.



Hình 3.3. Sự sinh trưởng của dòng *Lemna* BTN khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các ion $As^{3+,}$ Cd^{2+} và Pb^{2+} ở ngày 1 (D1) và ngày 14 (D14).

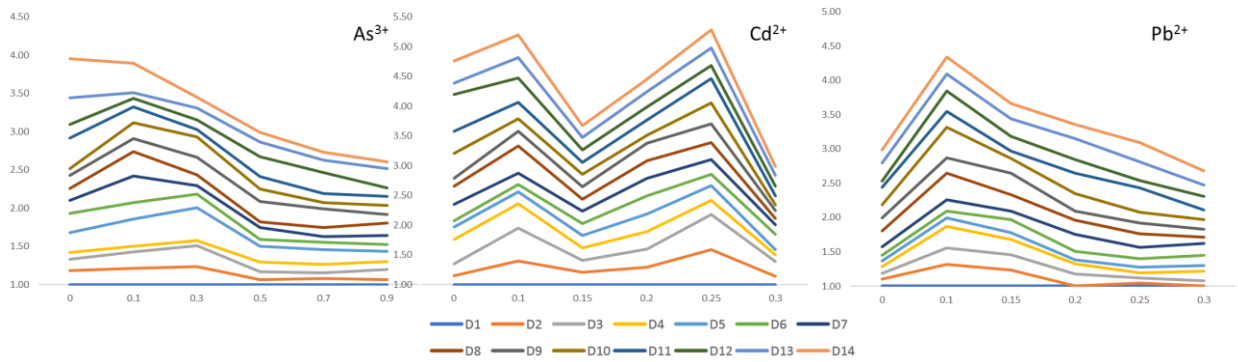
Thí nghiệm 4: **Khảo sát ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Spirodela* BTN.**

Spirodela là chi nguyên thủy nhất trong 5 chi bèo tấm, có kích thước cơ thể lớn nhất và đa dạng sinh học thấp (chỉ gồm 2 loài). Chúng tôi thu nhận được 1 dòng thuộc chi *Spirodela* tại Bình Thuận, vì vậy chúng tôi thiết kế thí nghiệm để khảo sát khả năng

sinh trưởng của dòng này trên môi trường có chứa ion kim loại nặng để so sánh với các dòng khác thuộc chi *Lemna*. Sự sinh trưởng của dòng *Spirodela* BTN trong 14 ngày trên các nghiệm thức được thể hiện ở bảng 3.4, biểu đồ 3.4 và hình 3.4.

Bảng 3.4. Sự gia tăng diện tích bề mặt (cm^2) của các dòng *Spirodela* BTN khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

	Ion As3+ (mg/l)						Ion Cd2+ (mg/l)						Ion Pb2+ (mg/l)					
Ngày	0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
D1	1,324	1,452	1,580	1,708	1,836	1,964	1,076	1,087	1,248	1,174	1,051	1,332	1,633	1,003	1,004	1,129	1,504	1,164
D2	1,568	1,763	1,958	1,823	1,985	2,101	1,235	1,523	1,505	1,524	1,671	1,523	1,807	1,321	1,241	1,137	1,566	1,17
D3	1,763	2,074	2,385	1,997	2,120	2,356	1,456	2,117	1,762	1,874	2,291	1,852	1,932	1,562	1,465	1,325	1,687	1,252
D4	1,881	2,185	2,489	2,213	2,320	2,561	1,892	2,562	2,019	2,224	2,542	1,998	2,101	1,879	1,687	1,498	1,792	1,423
D5	2,223	2,696	3,169	2,563	2,672	2,821	2,121	2,789	2,276	2,574	2,798	2,123	2,231	1,998	1,789	1,562	1,923	1,516
D6	2,563	3,007	3,451	2,723	2,862	3,001	2,231	2,915	2,533	2,924	2,998	2,462	2,365	2,102	1,982	1,698	2,102	1,687
D7	2,789	3,518	3,625	2,984	2,987	3,230	2,532	3,123	2,79	3,274	3,263	2,682	2,568	2,265	2,102	1,982	2,354	1,892
D8	2,995	3,984	3,853	3,112	3,210	3,552	2,854	3,625	3,047	3,624	3,562	2,811	2,945	2,657	2,345	2,211	2,654	1,997
D9	3,212	4,223	4,211	3,565	3,652	3,763	2,997	3,892	3,304	3,974	3,896	2,998	3,257	2,878	2,658	2,365	2,892	2,135
D10	3,335	4,523	4,632	3,851	3,813	3,999	3,452	4,123	3,561	4,123	4,262	3,120	3,568	3,324	2,871	2,654	3,125	2,289
D11	3,862	4,832	4,789	4,123	4,023	4,233	3,856	4,423	3,818	4,423	4,698	3,324	3,985	3,562	2,982	2,987	3,654	2,456
D12	4,102	4,991	4,982	4,562	4,532	4,456	4,523	4,862	4,075	4,687	4,923	3,542	4,132	3,859	3,201	3,211	3,825	2,685
D13	4,562	5,102	5,231	4,893	4,833	4,952	4,726	5,233	4,332	4,982	5,234	3,785	4,562	4,105	3,456	3,562	4,235	2,879
D14	5,236	5,652	5,456	5,105	5,012	5,113	5,123	5,652	4,589	5,231	5,552	3,982	4,876	4,356	3,682	3,789	4,652	3,125

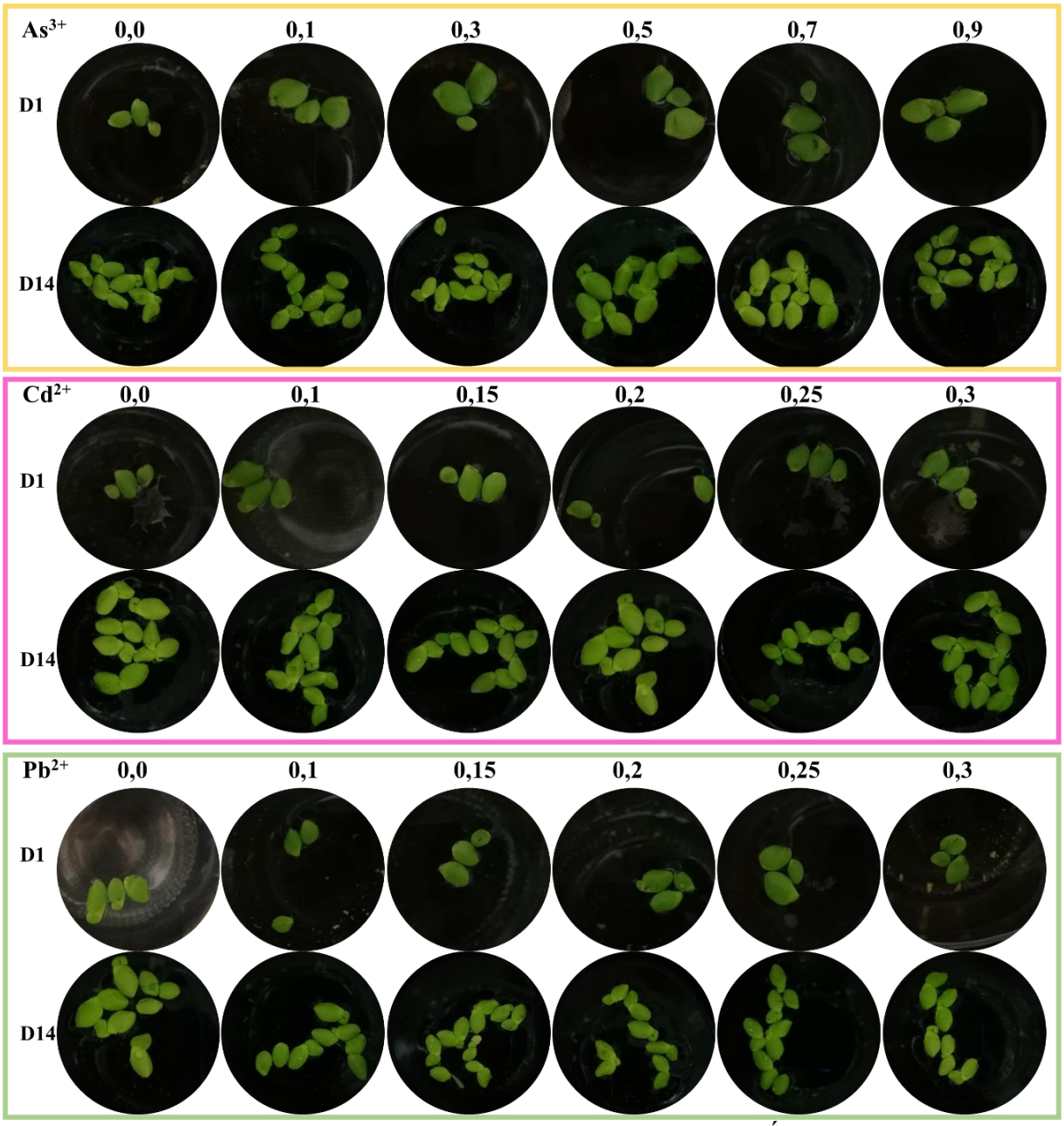


Biểu đồ 3.4. Số lần gia tăng diện tích bề mặt của dòng *Spirodela* BTN khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

Kết quả ở biểu đồ 3.4 cho thấy:

- Tốc độ phân chia và gia tăng sinh khối của dòng *Spirodela* BTN chậm hơn rất nhiều (chỉ từ 4,5 đến 5,5 lần) so với các dòng *Lemna* đã khảo sát (đã trình bày ở trên).
- Dòng *Spirodela* BTN ít nhạy cảm với 3 kim loại khảo sát trong vòng 14 ngày. Điều này có thể là do thời gian khảo sát chưa đủ dài để có thể đưa ra kết luận chính xác về sự ảnh hưởng của các ion kim loại này đến *Spirodela* BTN.

Vì vậy, cần phải tăng thời gian thí nghiệm để đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của loài này trên môi trường có kim loại nặng.



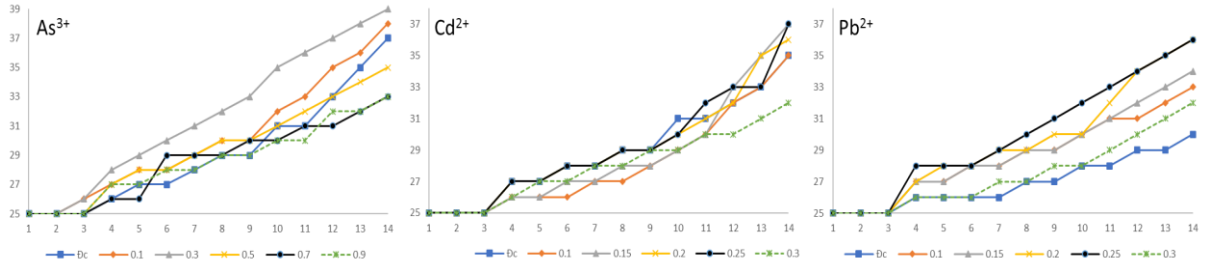
Hình 3.4. Sự sinh trưởng của dòng *Spirodela* BTN khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} ở ngày 1 (D1) và ngày 14 (D14).

Thí nghiệm 5: **Khảo sát ảnh hưởng của ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} lên sự sinh trưởng của dòng *Wolffia* LĐG.**

Vì kích thước của mẫu bèo dòng *Wolffia* LĐG nhỏ nên chúng tôi không thể đo được sự gia tăng diện tích bề mặt trong 14 ngày đầu nuôi cấy, chính vì vậy ở thí nghiệm này chúng tôi tiến hành đếm sự gia tăng số frond. Sự phát triển của dòng *Wolffia* LĐG ở các nghiệm thức trong vòng 14 ngày được thể hiện ở bảng 3.5 và biểu đồ 3.5.

Bảng 3.5. Sự gia tăng số lượng frond của dòng *Wolffia* LĐG khi nuôi trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

	Ion As3+ (mg/l)						Ion Cd2+ (mg/l)						Ion Pb2+ (mg/l)					
Ngày	0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
D1	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
D2	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
D3	25	26	26	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
D4	26	27	28	27	26	27	27	26	26	27	27	26	26	27	27	27	28	26
D5	27	28	29	28	26	27	27	26	26	27	27	27	26	27	27	28	28	26
D6	27	28	30	28	29	28	28	26	27	28	28	27	26	28	28	28	28	26
D7	28	29	31	29	29	28	28	27	27	28	28	28	26	28	28	29	29	27
D8	29	30	32	30	29	29	29	27	28	29	29	28	27	29	29	29	30	27
D9	29	30	33	30	30	29	29	28	28	29	29	29	27	29	29	30	31	28
D10	31	32	35	31	30	30	31	29	29	30	30	29	28	30	30	30	32	28
D11	31	33	36	32	31	30	31	30	30	31	32	30	28	31	31	32	33	29
D12	33	35	37	33	31	32	32	32	33	32	33	30	29	31	32	34	34	30
D13	35	36	38	34	32	32	33	33	35	35	33	31	29	32	33	35	35	31
D14	37	38	39	35	33	33	35	35	37	36	37	32	30	33	34	36	36	32



Biểu đồ 3.5. Sự gia tăng số frond của dòng *Wolffia* LĐG khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ion As^{3+}, Cd^{2+} và Pb^{2+} trong 14 ngày.

Vì dòng *Wolffia* LĐG có kích thước nhỏ và tốc độ phân chia không quá nhanh, chính vì vậy trong 14 ngày nuôi cấy, chúng tôi chưa nhận thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức.

Biểu đồ 3.5 cho thấy:

- Ở các nồng độ khác nhau của As^{3+} thì tốc độ nhân nhanh của dòng *Wolffia* LĐG nhanh hơn so với các nồng độ còn lại, điều này chứng tỏ sự có mặt của As^{3+} cũng đã có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của dòng này.
- Ở các nồng độ khảo sát của Cd^{2+}, Pb^{2+} không có sự khác biệt đáng kể về sự sinh trưởng của dòng *Wolffia* LĐG.

Như vậy, do tốc độ phân chia chậm cũng như kích thước frond quá nhỏ nên thời gian khảo sát chưa đủ dài để đánh giá được khả năng sinh trưởng của dòng *Wolffia* LĐG dưới ảnh hưởng của các ion kim loại nặng khác nhau.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận:

Từ kết quả thu được ở cả 5 thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy rằng:

- Dòng *Lemna* BGG có tiềm năng sinh trưởng - phát triển và hấp thu kim loại ở môi trường nước có As^{3+} (0,5 mg/l) và Cd^{2+} (0,3 mg/l).

- Dòng *Lemna* BTR có tiềm năng sinh trưởng, phát triển và hấp thu kim loại ở môi trường nước có As^{3+} (0,3 mg/l), Cd^{2+} (0,15 mg/l) và Pb^{2+} (0,2 mg/l).

- Dòng *Lemna* BTN có tiềm năng sinh trưởng và hấp thụ kim loại Pb^{2+} (lớn hơn 0,3 mg/l).

- Hai dòng *Spirodela* BTN và *Wolffia* LĐG, thời gian khảo sát chưa đủ dài để đánh giá được khả năng sinh trưởng trong môi trường có kim loại nặng.

Kiến nghị:

- Khảo sát dòng *Lemna* BTN trong môi trường có chứa Pb^{2+} lớn hơn 0,3 mg/l và Cd^{2+} lớn hơn 0,3 mg/l để tìm được ngưỡng sinh trưởng tốt nhất đối với 2 kim loại này.

- Tăng thời gian khảo sát đối với 2 loài *Spirodela* BTN và *Wolffia* LĐG để đánh giá được khả năng sinh trưởng trong môi trường có 3 loại kim loại nặng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

a. Tài liệu trong nước

Hoàng , T. N. P. (2015). Bèo tấm, lời giải tiềm năng cho bài toán bùng nổ dân số toàn cầu.

Hương, T. T. T., et al. (2016). Ảnh hưởng của các vật liệu nano bạc lên sinh trưởng của bèo *Lemna sp.*

Lê, T. G. (2014). *Đánh giá khả năng hấp thu muối dinh dưỡng và cải thiện chất lượng nước thải ao nuôi cá tra thâm canh bằng bèo tấm (Lemna aequinoctialis Landolt, 1986).* Trường đại học Tây Đô,

Lê, V. B., Trần, T. T. H., & Dương, T. T. (2017). Ảnh hưởng của vật liệu nano đồng đến sinh trưởng của bèo tấm (*Lemna sp.).*

Sơn, Đ. T., Tân, V. M., & Chi, V. T. M. (1898). Ảnh hưởng của đồng và crôm lên sự phát triển của vi tảo lục *Scenedesmus acuminatus* var. biseratus Reinsch. *Kỷ yếu hội nghị Khoa học Toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật lần thứ, 7* (2017), 7.

Nguyễn, H. N. (2016). *Đánh giá ảnh hưởng và mức độ tích lũy của Đồng, kẽm, Cacdimi trên cây bèo tấm (Lemna gibba L.) trong thử nghiệm độc cấp tính.* (Khóa luận tốt nghiệp Đại học). Học Viện Nông Nghiệp Việt Nam.

Tuấn, L. N. (2008). *Nghiên cứu sử dụng một số chủng chlorella để hấp thu cadmium trong nước thải.* Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.

b. Tài liệu nước ngoài

Appenroth, K. J., Teller, S., & Horn, M. (1996). Photophysiology of turion formation and germination in *Spirodela polyrhiza*. *Biologia Plantarum, 38*(1), 95.

Bog, M., et al. (2020). A taxonomic revision of *Lemna* sect. Uninerves (Lemnaceae). *TAXON, 69* (1), 56 - 66. doi:10.1002/tax.12188

Bokhari, S. H., Mahmood – Ul - Hassan, M., & Ahmad, M. (2019a). Phytoextraction of Ni, Pb and, Cd by duckweeds. *International journal of phytoremediation, 21* (8), 799 - 806.

Bokhari, S. H., Mahmood-Ul-Hassan, M., & Ahmad, M. (2019b). Phytoextraction of Ni, Pb and, Cd by duckweeds. *Int J Phytoremediation*, 1 - 8. doi:10.1080/15226514.2019.1566882

Chaudhuri, D., Majumder, A., Misra, A. K., & Bandyopadhyay, K. (2014). Cadmium removal by *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza*. *International journal of phytoremediation, 16* (11), 1119 - 1132.

Correll, D. S., & Correll, H. B. (1972). *Aquatic and wetland plants of southwestern United States*: Environmental Protection Agency.

Demim, S., Drouiche, N., Aouabed, A., Benayad, T., Dendene-Badache, O., & Semsari, S. (2013). Cadmium and nickel: Assessment of the physiological effects and heavy metal removal using a response surface approach by *L. gibba*. *Ecological engineering, 61*, 426 - 435.

Goswami, C., Majumder, A., Misra, A. K., & Bandyopadhyay, K. (2014a). Arsenic uptake by *Lemna minor* in hydroponic system. *International journal of phytoremediation, 16*(12), 1221 - 1227.

Goswami, C., Majumder, A., Misra, A. K., & Bandyopadhyay, K. (2014b). Arsenic uptake by *Lemna minor* in hydroponic system. *Int J Phytoremediation, 16*(7-12), 1221 - 1227. doi:10.1080/15226514.2013.821452

Hillman, W., & DD., C. J. (1978). The uses of duckweed. *Am Scient, 66*, 442 - 451.

Khellaf, N., & Zerdaoui, M. (2009). Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution. *Journal of Environmental Health Science & Engineering, 6*(3), 161 - 166.

Klaus, J., Nikolai, B., & Eric, L. (2013). Telling duckweed apart: genotyping technologies for the Lemnaceae. *19*(1), 1 - 10.

Landolt, E. (1987). The family of Lemnaceae - a monographic study. *Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae), 2*.

Madhu, G. (2011). Removal of heavy metals from waste water using water hyacinth. *International journal on transportation and urban development, 1*(1), 48.

Mechora, Š., Stibilj, V., & Germ, M. (2015). Response of duckweed to various concentrations of selenite. *Environmental Science and Pollution Research, 22*(4), 2416 - 2422.

Skillicorn, P., Spira, W., & Journey, W. (1993). *Duckweed aquaculture: a new aquatic farming system for developing countries*: World Bank.

Sree, K. S., Bog, M., & Appenroth, K. J. (2016). Taxonomy of duckweeds (Lemnaceae), potential new crop plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 291 - 302.

Tam, N., Wong, J., & Wong, Y. (2001). Repeated use of two *Chlorella* species, C. vulgaris and WW1 for cyclic nickel biosorption. *Environmental pollution, 114* (1), 85 - 92.

Teixeira, S., Vieira, M. N., Espinha Marques, J., & Pereira, R. (2014). Bioremediation of an iron-rich mine effluent by *Lemna minor*. *Int J Phytoremediation, 16* (7 - 12), 1228 - 1240. doi:10.1080/15226514.2013.821454

Ucuncu, E., Tunca, E., Fikirdesici, S., Ozkan, A. D., & Altindag, A. (2013). Phytoremediation of Cu, Cr and Pb mixtures by *Lemna minor*. *Bull Environ Contam Toxicol, 91*(5), 600 - 604. doi:10.1007/s00128-013-1107-3

Varga, M., Horvatić, J., & Čelić, A. (2013). Short term exposure of *Lemna minor* and *Lemna gibba* to mercury, cadmium and chromium. *Central European Journal of Biology, 8*(11), 1083 - 1093.

Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental research, 52*(1), 7 - 22.

Wang, W., Kerstetter, R. A., & Michael, T. P. (2011). Evolution of genome size in duckweeds (Lemnaceae). *Journal of Botany, 2011*.

Zeraatkar, A. K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A. F., Moheimani, N. R., & McHenry, M. P. (2016). Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of environmental management, 181*, 817 - 831.

Ziegler, P., Adelmann, K., Zimmer, S., Schmidt, C., & Appenroth, K. J. (2015). Relative *in vitro* growth rates of duckweeds (Lemnaceae) – the most rapidly growing higher plants. *Plant Biology, 17*, 33 - 41.

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT
KHOA SINH HỌC

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI KINH GIỚI NÚI (*ELSHOLTZIA BLANDA* BENTH.) Ở KHU VỰC LÂM ĐỒNG VÀ ỨNG DỤNG TẠO SẢN PHẨM XÀ PHÒNG THIÊN NHIÊN

Giáo viên hướng dẫn: TS. Hoàng Thị Bình

Nhóm sinh viên thực hiện

Đà Lạt, 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI KINH GIỚI NÚI (*ELSHOLTZIA BLANDA* BENTH.) Ở KHU VỰC LÂM ĐỒNG VÀ ỨNG DỤNG TẠO SẢN PHẨM XÀ PHÒNG THIÊN NHIÊN

Thuộc nhóm ngành khoa học: Tự nhiên

Lâm Đồng, tháng 06/2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI KINH GIỚI NÚI (*ELSHOLTZIA BLANDA* BENTH.) Ở KHU VỰC LÂM ĐỒNG VÀ ỨNG DỤNG TẠO SẢN PHẨM XÀ PHÒNG THIÊN NHIÊN

Thuộc nhóm ngành khoa học: Tự nhiên

Sinh viên thực hiện: Nguyễn Hữu Quân Nam, Nữ: Nam

Dân tộc: Kinh

Lớp, khoa: CSK40 – Khoa Sinh học

Năm thứ: 4 /Số năm đào tạo: 04 Ngành học: Công nghệ sinh học

Người hướng dẫn: TS. Hoàng Thị Bình

Lâm Đồng, tháng 06/2020

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Lâm Đồng, ngày tháng 06 năm 2020

BÁO CÁO KẾT QUẢ TỰ ĐÁNH GIÁ
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ SINH VIÊN 2020

I. Thông tin chung về đề tài:

1. Tên đề tài: **Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học, khảo sát hoạt tính sinh học của loài kinh giới núi (*Elsholtzia blanda* Benth.) tại khu vực Lâm Đồng và ứng dụng tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên.**

2. Mục tiêu đề tài: Đánh giá sơ bộ thành phần hóa học và hoạt tính sinh học loài *E. blanda* ở Lâm Đồng và ứng dụng tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên từ loài *E. blanda* ở Lâm Đồng.

3. Chủ nhiệm đề tài: Nguyễn Hữu Quân

4. Giáo viên hướng dẫn: TS. Hoàng Thị Bình

5. Tổng kinh phí thực hiện: 5.000.000 VNĐ (Bằng chữ: năm triệu đồng)

6. Thời gian thực hiện:

Bắt đầu: tháng 11 năm 2019

Kết thúc: tháng 05 năm 2020

7. Danh sách thành viên chính thực hiện đề tài nêu trên gồm:

STT	***Họ và tên***	***Mã số SV***	**Lớp/ Khoa**
1	Nguyễn Hữu Quân	1610697	CSK40 – Khoa Sinh học
2	Võ Thanh Tú Quyên	1610700	CSK40 – Khoa Sinh học
3	Mai Nhật Bảo Hân	1710751	CSK41 – Khoa Sinh học

II. Nội dung tự đánh giá về kết quả thực hiện đề tài:

1. Về sản phẩm khoa học:

1.1. Danh mục sản phẩm đã hoàn thành:

STT	Tên sản phẩm	Số lượng			Khối lượng			Chất lượng		
		Xuất sắc	Đạt	Không đạt	Xuất sắc	Đạt	Không đạt	Xuất sắc	Đạt	Không đạt
1	Mẫu loài *Elsholtzia blanda* Benth. tại khu vực Lâm Đồng.	X			X			X		
2	Bảng Thành phần hóa học của cây *Elsholtzia blanda* Benth. tại khu vực Lâm Đồng	X			X			X		
3	Sản phẩm tinh dầu và xà phòng thiên nhiên từ loài *Elsholtzia blanda* Benth. tại khu vực Lâm Đồng.	X			X			X		

Minh chứng:

- Bảng thành phần hóa học của loài *Elsholtzia blanda* Benth. tại khu vực Lâm Đồng đã được phân tích.

- Sản phẩm tinh dầu và xà phòng thiên nhiên từ loài *Elsholtzia blanda* Benth. tại khu vực Lâm Đồng.

1.2. Danh mục sản phẩm khoa học dự kiến ứng dụng, chuyển giao (nếu có):

STT	Tên sản phẩm	Thời gian dự kiến ứng dụng	Cơ quan dự kiến ứng dụng	Ghi chú
1	Bảng phân tích thành phần hóa học của loài *Elsholtzia blanda* Benth. tại khu vực Lâm Đồng.	Từ tháng 7 – tháng 12 năm 2020	Khoa Sinh học – Trường Đại học Đà Lạt	

1.3. Danh mục sản phẩm khoa học đã được ứng dụng (nếu có):

STT	Tên sản phẩm	Thời gian ứng dụng	Tên cơ quan ứng dụng	Ghi chú
1	Sản phẩm tinh dầu *Elsholtzia blanda* Benth.	Năm 2020	Khoa Sinh học – Trường Đại học Đà Lạt.	
2	Sản phẩm xà phòng thiên nhiên từ loài *Elsholtzia blanda* Benth. tại khu vực Lâm Đồng.	Năm 2020	Khoa Sinh học – Trường Đại học Đà Lạt.	

2. Về những đóng góp mới của đề tài:

- Đề tài lần đầu tiên khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài *Elsholtzia blanda* Benth. tại khu vực Lâm Đồng.

- Đề tài đã phân tích được thành phần hóa học có trong loài *Elsholtzia blanda* Benth. và khảo sát hoạt tính sinh học của loài *Elsholtzia blanda* Benth. từ đó đã ứng dụng để tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên.

3. Về hiệu quả của đề tài:

3.1. Hiệu quả kinh tế

- Việc khảo sát thu thập loài *Elsholtzia blanda* Benth. ở ngoài tự nhiên tại khu vực Lâm Đồng thực là nền tảng ban đầu để giúp Đà Lạt đa dạng hoá thêm các loài thực vật sử dụng làm dược liệu và ứng dụng làm sản phẩm xà phòng thiên nhiên.

3.2. Hiệu quả xã hội

Góp phần đa dạng hoá sản phẩm tinh dầu, xà phòng thiên nhiên, giúp người nông dân thương mại hóa được các sản phẩm từ loài *Elsholtzia blanda* Benth. tại Lâm Đồng. Bên cạnh đó góp phần bảo tồn nguồn tài nguyên thực vật cũng như nguồn gen của địa phương.

III. Tự đánh giá, xếp loại kết quả thực hiện đề tài

1. Về tiến độ thực hiện: *(đánh dấu √vào ô tương ứng*):

- *Nộp hồ sơ đúng hạn* ☐
- *Nộp chậm từ trên 30 ngày đến 06 tháng* ☐
- *Nộp hồ sơ chậm trên 06 tháng* ☐

2. Về kết quả thực hiện đề tài:

- *Xuất sắc* ☐
- *Đạt* ☐
- *Không đạt* ☐

Giải thích lý do:

- Đề tài đã thực hiện đúng 07 nội dung đã đăng ký trong thuyết minh đề tài và đáp ứng được mục tiêu của đề tài.

Cam đoan nội dung của Báo cáo là trung thực; Chủ nhiệm và các thành viên tham gia thực hiện đề tài không sử dụng kết quả nghiên cứu của người khác trái với quy định của pháp luật.

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI **GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN**

LỜI CẢM ƠN

Để có thể hoàn thành đề tài này không chỉ bằng sự cố gắng và nỗ lực của bản thân chúng tôi mà còn bằng sự dạy dỗ tận tình của thầy cô, sự giúp đỡ của bạn bè và công ơn nuôi dưỡng của bố mẹ.

Với lòng trân trọng và biết ơn sâu sắc:

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến TS. Hoàng Thị Bình, người đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ chúng tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài.

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến TS. Nguyễn Văn Ngọc, người đã giúp đỡ, chỉ dẫn chúng tôi hoàn thực hiện đề tài.

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến ThS. Nguyễn Khoa Trưởng, người đã tạo điều kiện để chúng tôi thực hiện đề tài tại phòng thí nghiệm vi sinh.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn đến tất cả thầy cô khoa Sinh học nói riêng và trường Đại học Đà Lạt nói chung, đã tạo mọi điều kiện tốt nhất để chúng tôi có thể hoàn thành nghiên cứu đề tài này,

Chúng tôi xin cảm ơn anh, chị, các bạn thuộc phòng thí nghiệm Tài nguyên thực vật, phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh cùng toàn thể bạn bè đã động viên và giúp đỡ cho chúng tôi để có thể hoàn thành đề tài.

Trân trọng cảm ơn!

Đà Lạt, tháng 6 năm 2020.

LỜI CAM ĐOAN

Chúng tôi xin cam đoan kết quả của đề tài nghiên cứu này là công trình nghiên cứu của riêng chúng tôi không sao chép của ai và chưa từng được công bố dưới hình thức nào.

Nội dung đề tài có tham khảo và sử dụng một số thông tin, tài liệu được đăng tải trên sách, báo, tạp chí và các trang web theo danh mục tài liệu tham khảo của đề tài.

Đà Lạt, tháng 6 năm 2020

Nhóm sinh viên

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. Hiệu suất tách chiết cao và tinh dầu cây Kinh giới núi.....27
Bảng 2. Kết quả định tính các nhóm hợp chất chính có trong cây Kinh giới núi 28
Bảng 3. Thành phần hóa học của tinh dầu Kinh Giới núi phân bố tại khu vực Lâm Đồng (Phụ lục 3).....29
Bảng 3 (tiếp): 30
Bảng 4. So sánh các tiêu chuẩn ngoại quan của xà phòng thiên nhiên 40
Bảng 5. Kết quả xác định các chỉ tiêu hóa lý của xà phòng theo TCVN 2224:1991....40
Bảng 6. Kết quả khảo sát thị hiếu của người dùng đối xà phòng thiên nhiên có bổ sung tinh dầu Kinh giới núi (điểm) 41

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 1. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thu từ lá cây Kinh giới núi.....31
Biểu đồ 2. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thu từ hoa cây Kinh giới núi.....33
Biểu đồ 3. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thu từ bộ phận trên mặt đất cây Kinh giới núi 34
Biểu đồ 4. Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của tinh dầu cây Kinh giới núi 36
Biểu đồ 5. A. Đường kính vòng kháng khuẩn của phôi xà phòng, B. Đường kính vòng kháng khuẩn của xà phòng có bổ sung tinh dầu Kinh giới núi. 38

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 1: Quy trình tạo xà phòng thiên nhiên trong phòng thí nghiệm theo phương pháp gia nhiệt nhẹ (Quân và cộng sự, 2019).....22

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. Kinh Giới núi (*Elsholtzia blanda* Benth.) A. Cây; B. Mặt dưới và mặt trên lá; C. Cành mang hoa. 17

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN ..... **i**
LỜI CAM ĐOAN ..... **ii**
DANH MỤC BẢNG ..... **iii**
DANH MỤC BIỂU ĐỒ ..... **iv**
DANH MỤC SƠ ĐỒ ..... **v**
DANH MỤC HÌNH ..... **vi**
MỞ ĐẦU **1**
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN **3**
1.1. Khái quát về chi *Elsholtzia* và loài *Elsholtzia blanda* Benth. 3
1.2. Tình hình nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi *Elsholtzia* 4
1.2.1. Thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Elsholtzia* 4
1.2.2. Thành phần hóa học của loài *Elsholtzia blanda* Benth. 8
1.2.3. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi *Elsholtzia* và loài *Elsholtzia blanda* Benth. 9
1.3. Ứng dụng của chi *Elsholtzia* và loài *Elsholtzia blanda* Benth. 11
1.4. Tổng quan về xà phòng 12
1.5. Tổng quan về các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu này 14
1.5.1. *Candida albicans* 14
1.5.2. *Escherichia coli* 14
1.5.3. *Staphylococcus aureus* 15
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP **17**
2.1. Vật liệu 17
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu 17
2.1.2. Đối tượng hỗ trợ sử dụng trong nghiên cứu này 17
2.1.3. Hóa chất 18
2.1.4. Thiết bị 18
2.2. Phương pháp 18
2.2.1. Phương pháp thu mẫu thực vật 18
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học loài *Elsholtzia blanda* Benth. . 19
2.2.3. Phương pháp khảo sát hoạt tính sinh học 21

2.2.4. Phương pháp tạo xà phòng thiên nhiên 22
2.2.5. Phương pháp đánh giá các chỉ tiêu hoá lý của xà phòng 23
2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu 26
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 27
3.1. Kết quả thành phần hóa học của cây *Elsholtzia blanda* Benth. 27
3.1.1. Hiệu suất tách chiết 27
3.1.2. Kết quả định tính thành phần hóa học có trong cây Kinh giới núi ở khu vực Lâm Đồng 27
3.2. Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của thành phần hóa học có trong cây Kinh giới núi 31
3.2.1. Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của cao chiết 31
3.2.2. Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của tinh dầu 35
3.3. Kết quả tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên 37
CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 43
4.1. Kết luận 43
4.2. Kiến nghị 43
TÀI LIỆU THAM KHẢO
PHỤ LỤC

MỞ ĐẦU

Kinh giới núi có tên khoa học *Elsholtzia blanda* Benth. hay còn gọi là chùa dù, đây là loài cây ưa ẩm, ưa sáng và có thể hơi chịu bóng, thường mọc thành đám trên đất ẩm, nhiều mùn ở các vùng nương rẫy, trong thung lũng hoặc nơi đất trồng ven rừng. Loài này phân bố ở nhiều nước trên thế giới như Ấn Độ, Trung Quốc, Việt Nam, Lào v.v… và thường tìm thấy ở độ cao từ 1000 m đến 1500 m. Trên thế giới, loài này được sử dụng để trị một số bệnh như bệnh lỵ, viêm thận, viêm gan, viêm họng và viêm ruột cấp tính (Lu và cộng sự, 2001).

Hiện nay, các nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của loài *E. blanda* trên thế giới cho thấy ở loài này có các hợp chất chính là linalool và geranyl aceteat, ngoài ra còn phát hiện một số hợp chất khác như luteolin, luteolin-7-O-glucoside (Wang và cộng sự, 2005; Zhang và cộng sự, 1999). Bên cạnh đó, thành phần chính của tinh dầu loài *E. blanda* được thu thập từ Jorliat (Assam) đã được xác định là geranyl chiếm 71% (Bestmann và cộng sự, 1992). Các nghiên cứu đánh giá về hoạt tính sinh học của flavonoid phân lập từ *E. blanda* có tác dụng đáng chú ý đối với bệnh thiếu máu cơ tim và chỉ ra *E. blanda* là một loại thuốc y học cổ truyền hiệu quả và đầy hứa hẹn với cả hai đặc tính dự phòng và điều trị trong điều trị bệnh thiếu máu cơ tim (Haiyun và cộng sự, 2004).

Ở Việt Nam, cây Kinh giới núi (*E. blanda*) phân bố ở nhiều địa phương như Lào Cai, Bắc Giang, Sơn La, Kon Tum, Hoà Bình, Khánh Hoà, Lâm Đồng… và cũng được người dân sử dụng nhiều trong y học dân gian để điều trị một số loại bệnh như cảm, tả, bệnh ngoài da và các chứng viêm. Mặc dù, loài này đã được sử dụng nhiều trong các bài thuốc cổ truyền, nhưng phần lớn chỉ sử dụng theo kinh nghiệm có được hoặc do kinh nghiệm của người đi trước để lại mà chưa có nhiều hiểu biết về cơ sở khoa học về loài cây này. Mặt khác, hiện tại chỉ có một vài nghiên cứu về thành phần hoá học của tinh dầu loài Kinh giới núi phân bố ở khu vực Sa Pa (Lào Cai) và Sơn La, mà chưa có các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của hợp chất thu từ loài này ở nước ta nói chung và ở Lâm Đồng nói riêng.

Như vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu "Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học, khảo sát hoạt tính sinh học của loài Kinh giới núi (*Elsholtzia blanda* Benth.) tại khu vực Lâm Đồng và ứng dụng tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên" là có ý nghĩa

khoa học và thực tiễn nhằm bước đầu làm sáng tỏ các cơ sở khoa học của loài cây này, phát huy giá trị kinh tế và bảo tồn nguồn gen thực vật.

Mục đích của đề tài:

- Tách chiết các hợp chất có trong loài *Elsholtzia blanda* Benth. ở Lâm Đồng.
- Đánh giá hoạt tính sinh học của loài *Elsholtzia blanda* Benth. ở Lâm Đồng.
- Bước đầu tạo chế phẩm xà phòng thiên nhiên từ loài *Elsholtzia blanda* Benth. ở Lâm Đồng.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN

1.1. Khái quát về chi *Elsholtzia* và loài *Elsholtzia blanda* Benth.

Chi *Elsholtzia*, một trong những chi thuộc họ Hoa môi (Lamiacea), là chi thực vật thân thảo với khoảng 40 loài đã được công nhận trên thế giới (Bestmann và cộng sự 1992; Haiyun và cộng sự, 2004), hầu hết các loài thực vật trong chi đều là loài mọc hoang dã ngoài tự nhiên (Hen, 1979; Raven và cộng sự, 1994). Chi *Elsholtzia* được ghi nhận phân bố rộng rãi ở các nước Châu Á như Trung Quốc, Ấn Độ, Lào, Campuchia, Thái Lan… và chỉ một số loài được phân bố ở Châu Phi, Châu Âu (Bestmann và cộng sự, 1992; Haiyun và cộng sự, 2004). Ngoài tự nhiên chi *Elsholtzia* được ghi nhận thường mọc ở vùng ôn đới, khu vực đồi núi, đất bỏ hoang, khu vực chất thải, bụi cây hoặc thung lũng có khí hậu ấm áp với địa hình nhiều nắng, bờ sông suối hay trong rừng, ở độ cao từ 0–3400 m (Hộ, 2003; Hen, 1979; Raven và cộng sự, 1994).

Việt Nam nằm trong vùng nhiệt đới với điều kiện khí hậu nóng ẩm và có điều kiện thổ nhưỡng thích hợp cho nhiều loại thực vật sinh sống và phát triển nên chi *Elsholtzia* ở nước ta rất phổ biến và phân bố ở những vùng núi cao từ 700–2000 m, phân bố rải rác từ Bắc vào Nam (Chi, 2003; Hộ, 2003). Thực vật thuộc chi này thường có các đặc điểm như sau: cây cỏ hay cây bụi nhỏ; thân vuông, mọc đứng, nhẵn hay có lông; lá nguyên hay xẻ răng cưa, nhẵn hay có lông; cụm hoa chùm hay bông ở đỉnh cành, gồm các xim co tạo thành vòng giả, hay hoa tạt về một phía; lá bắc tồn tại hình nét hoặc hình trứng; đài hình chuông hay hình ống, 5 thùy gần bằng nhau; tràng có ống thẳng hoặc cong hơi thò khỏi đài, 2 môi, môi trên 2 thùy môi dưới 3 thùy; nhị 4, hướng về 2 phía hay hướng thẳng: chỉ nhị dài hay ngắn, 2 nhị dưới dài hơn hai nhị trên, bao phấn 2 ô, lúc đầu dãn ra sau chụm lại; bầu nhẵn hay có lông, vòi nhụy xẻ 2 thùy ở đỉnh; quả hình bầu dục hay hình thuôn, nhẵn hay có lông, có nốt sần. Mùa hoa quả thường vào khoảng tháng 8 đến tháng 10 (Chi, 2003). Các loài trong chi *Elsholtzia* đều là cây hàng năm tái sinh bằng hạt, một số loài được trồng bằng cách giâm cành (Hộ, 2003; Bích và cộng sự, 2003). Ở Việt Nam, bảy loài thuộc chi này đã được ghi nhận bao gồm *Elsholtzia blanda* Benth.; *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland, *Elsholtzia communis* (Coll. et Hemsl.) Diels, *Elsholtzia penduliflora* W.W.Sm.; *Elsholtzia pilosa* (Benth.) Benth.; *Elsholtzia rugulosa* Hemsl., *Elsholtzia winitiana* Craib. (Chi, 2003; Hộ, 2003).

Elsholtzia blanda Benth. còn có tên gọi là Kinh giới núi, chùa dù. Loài này có dạng thân thảo sống hàng năm, cao 0,5–1,5 m. Thân vuông, có lông mền, phân nhánh nhiều; lá mọc đối; phiến lá hình mác, hai đầu thuôn nhọn, dài 3–5 cm, rộng 0,8–4 cm, mặt trên nhẵn, chỉ có lông ở gân, mặt dưới có lông mịn, mép có khía răng không đều, đôi khi có viền hơi tím; cuống ngắn 0,3–1,5 cm; gốc hình nêm; cụm hoa mọc ở kẽ lá hoặc đầu cành thành bông dày, hơi lệch bên, dài 4–8 cm, có thể đến 20 cm, mọc ở nách lá và ở ngọn; lá bắc ngắn hơn hoa, có lông dày; hoa màu trắng xếp dày đặc thành vòng sít nhau; đài hình chuông ngắn, có lông ở mặt ngoài; tràng hoa hơi có lông ở mặt ngoài, nhẵn ở mặt trong, có 4 thùy gần bằng nhau; nhị 4, hai cái dưới hơi thò dài; quả hình bầu dục, dẹt, dài 0,5-1 mm, màu nâu đen. Toàn cây có chứa tinh dầu thơm (Chi, 2003; Hộ, 2003; Bích và cộng sự, 2003). Mùa hoa và quả: tháng 10–2 (Bích và cộng sự, 2003). Loài này thuộc nhóm cây ưa ẩm, ưa sáng và có thể hơi chịu bóng thường được mọc thành đám trên đất ẩm, nhiều mùn ở các nương rẫy, trong thung lũng hoặc nơi đất trồng ven rừng (Bích và cộng sự, 2003). Độ cao phân bố từ 1000-1500 m, hàng năm cây con mọc từ hạt xuất hiện vào khoảng cuối mùa xuân, cây sinh trưởng mạnh trong mùa hè đến giữa mùa thu (khoảng tháng 8), khi quả đã già, cây bắt đầu tàn lụi, vòng đời kéo dài khoảng 6 tháng đến 7 tháng đối với những cây mọc ở nơi đất ẩm và bị che bóng nhiều (Bích và cộng sự, 2003). Trên thế giới, loài *E. blanda* đa số phân bố ở Ấn Độ, Nepan, Trung Quốc, Buhtan, Myanmar, Việt Nam, Lào, Thái Lan. Ở nước ta, loài *Elsholtzia blanda* Benth. phân bố tại một số nơi như Lai Châu, Lào Cai, Sơn La, Hà Giang, Cao Bằng, Lạng Sơn, Bắc Giang, Hòa Bình, Kon Tum, Lâm Đồng và Khánh Hòa (Chi, 2003; Hộ, 2003).

1.2. Tình hình nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi *Elsholtzia*

1.2.1. Thành phần hóa học của các loài thuộc chi Elsholtzia

Các loài thuộc chi *Elsholtzia* chủ yếu là các loại thảo mộc có mùi thơm, vì trong cây có chứa tinh dầu dồi dào. Các loại tinh dầu được nghiên cứu, phát triển và đã được sử dụng làm thuốc, ứng dụng trong thực phẩm cũng như nguồn nguyên liệu cho nuôi ong mật (Hen, 1979). Nhiều nhà hóa học, dược học quan tâm đến tinh dầu của các loài *Elsholtzia* vì nó có các hoạt tính sinh học như có khả năng gây ức chế mạnh đối với hệ thần kinh trung ương và có tác dụng giảm đau đáng kể (Liu và cộng sự, 2007). Bên

cạnh đó, tinh dầu của các loài trong chi này còn được ghi nhận là có khả năng kháng khuẩn rất tốt (Kim và cộng sự, 2008; Hu và cộng sự, 2007; Hu và Zheng, 2006).

Nghiên cứu về các hợp chất có trong thực vật trước đây cho thấy flavonoid, phenylpropanoids, terpenoids, phytosterol và glycoside cyanogen là thành phần chính có ở các loài thuộc chi *Elsholtzia* (Hen, 1979). Thêm vào đó, nghiên cứu của College (1985) cũng cho thấy thành phần hoá học trong chi *Elsholtzia* có thể được chia thành các nhóm chính là flavonoids, steroid, lignans, coumarin, triterpenoid, và một số hợp chất khác.

Trong đó, loài *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. được biết đến như một loại trà, thảo dược, cỏ ngọt ở Trung Quốc, đã được xác định thành phần hóa học và phát hiện ra hai nhóm flavone glycoside là apigenin 4'-O-α-D-glucopyranoside (1) và 5,7,3',4-tetrahydroxy-5'-C-prenylflavone-7-O-β-D-glucopyranoside cùng với 9 loại flavonoid đã được biết đến (Liu và cộng sự 2008; Jiang và cộng sự 2009). Ngoài chứa n-prenyl-flavonoids, loài *E. rugulosa* và *E. sauntonii* còn chứa các hợp chất 5,7,3’,4’-tetrahydroxy-5’-C-prenylf lavone; 7-O-β-D-glucoside và muxiangrine III - được ghi nhận là hợp chất mới có trong hai loài này (Fang và cộng sự, 1993). Tinh dầu của loài *Elsholtzia ciliata* được thu thập tại khu vực miền núi tỉnh Gangwon, Hàn Quốc cho kết quả phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có 3 hợp chất chính thuộc nhóm acacetin triglycoside: 7-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosid (hợp chất 1), 7-O-(6-O-acetyl)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranoside (hợp chất 3), cho thấy khả năng ức chế Acetylcholinesterase (AchE) – gây bệnh Alzheimer (Nugroho và cộng sự, 2019).

Tổng cộng có 572 thành phần hóa học có trong tinh dầu được xác định từ 21 loài *Elsholtzia* bằng phương pháp cất kéo hơi nước và phương pháp GC/MS. Trong đó, α-pinene, β-pinene, acetophenone, caryophyllene oxide, carvacrol, benzaldehyde, β-caryophyllene, 1,8-cineole, α-phellandrene và α-terpineol là thành phần chính. Đặc biệt, α-pinene và β-pinene là hai hợp chất quan trọng và phát hiện ở 15 loài trong chi *Elsholtzia* (Fu và cộng sự, 2010; Fang và cộng sự, 1993).

Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu của *Elsholtzia densa* Benth. từ phía Tây dãy núi Himalaya bằng phương pháp sắc ký ghép khối phổ (GC/MS) cho kết quả bao gồm 40 hợp chất, đặc trưng là citral (52,2%), geranyl acetate (3,3%) và geraniol

(3,1%) trong khi tinh dầu từ cụm hoa của loài *E. densa* thì thành phần đặc trưng là pinocarvone (51,9%), cis-pinocamphone (5,2%) và citronellyl acetate (3,4%) và so sánh với các báo cáo trước đó về *Elsholtzia* spp. từ các khu vực địa lý khác nhau thì thành phần hóa học cũng biến đổi theo (Chauhan và cộng sự, 2019). Tinh dầu thu từ loài *E. rugulos*a có các hợp chất chính là thymol, carvacrol, methyl thymiether, 1,8-cineole, linalool, isopinocamphone, β-dehydroelsholtzia, elsholtzia ketone, camphor (Zhu và cộng sự, 1989; Huang và cộng sự, 2004). Trong khi đó, tinh dầu của loài *E. splendens* phân bố tại Trung Quốc có hai hợp chất chính là thymol và carvacrol (Zhang và cộng sự, 1999). Loài *E. ciliata* (Thunb.) Hyland thu được tại tỉnh Cam Túc Trung Quốc sau khi phân tích thành phần hóa học có hợp chất chính bao gồm β-dehydroelsholtzione, elsholtzia kentone, 2-methyl-1, 3,5-trimethyl-benzene, aromadendrene, d-carvone, limonene (Shi và cộng sự, 1994). Loài *E. patrini* có các hợp chất chính β-dehydroelsholtzione, elsholtzia ketone, 2-methyl-1, 3,5-trimethyl-benzene, aromadendrene, d-carvone, limonene (He và cộng sự, 1995). Loài *E. stauntonii* gồm 1,8-cineole, β-pinene, camphorquinore, trans-caryophellene (Du và cộng sự, 1989). Chín hợp chất được xác định bằng phương pháp quang phổ và hóa học từ loài *E. blanda* bao gồm: 5, 6-dihydro-6-styry-2-pyrone (1); friedelin (2); 4-hydroxy-3-methoxystyrene (3); 5, 2'-Dimethoxy-6,7-methylene dioxyflavanone (4); 5-hydroxy-7-methoxy-6-O-[α-L-rhamnopyranosyl (1→2)-β-D-fucopyranosyl] flavone glycoside (5); 5,5'-dihydroxy-7-acetoxyl-6,8,3",3"-tetramethylpyran (3',4') flavone (6); 5, 5'-dihydroxy-7-(α-methyl) butyroxyl-6,8,3",3-tetramethylpyran (3',4') flavone (7); 5,5'-dihydroxy-6,7-methylenedioxy-8,3",3"-trimethylpyran(3',4') flavone(8); glucosyringic acid (9); trong đó hợp chất (6), (7), (8) là các hợp chất mới lần lượt được đặt tên là sifanghaoine I, II, III (Zheng và cộng sự, 2001; Lu và cộng sự, 2001).

Một nghiên cứu khác đã xác định được hai flavone mới bằng phương pháp quang phổ từ loài *Elsholtzia stauntonii* là 5-hydroxy-7,5'-dimethoxy-6,8-dimethyl-3',4-methyl (flavone số 1), 5-hydroxy-7-methoxy-8-methyl-3',4'-methylenedioxy-5'-(3-methyl-but-2-enyl) -3', 4'-methylenedioxy (flavone số 2) cùng với hai flavone đã được xác định trước đó là 5-hydroxy-7, 4'-dimethoxy-6-methyl (flavone số 3) và 5-hydroxy-6,7-dimethoxy (flavone số 4) (Kang và cộng sự, 2004). Phát hiện ba chất thuộc nhóm lignanolide trong chi *Elsholtzia* bằng phương pháp quang phổ là 3-hydroxyarctiin, arctigenin từ loài *E. eriostachya* Benth. cùng với saussurenoside từ loài *E. ianthina*

(Shang-zhen và cộng sự, 1992; Ding và cộng sự, 2004). Cho đến nay có 3 hợp chất có chứa nguyên tử nitơ được báo cáo từ loài *E. rugulosa* Hemsl. là prunasin, amygdalin, một glycoside cyanogen trong cây thuộc họ Lamiaceae, đây là báo cáo thứ hai về glycoside cyanogen trong thực vật thuộc họ Lamiaceae, trường hợp đầu tiên là từ một cây *Clerodendrum grayi* của Úc (Lai và cộng sự, 2008; Li và cộng sự, 2008; Yang và cộng sự, 1997), các hợp chất này được sử dụng để điều trị cảm lạnh và ho ở Trung Quốc (Liu và cộng sự, 2009). Hai glycoside maltol mới, maltol 6'-O-β-d-apiofuranosyl β-d-glucopyranoside và maltol 6'-O-(5-Op-coumaroyl)-β-d-apiofuranosyl-β-d-glucopyranoside được phát hiện qua phân tích bằng phương pháp hóa học và quang phổ từ *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. (Li và cộng sự, 2008).

Nhóm triterpenoid cũng đã được ghi nhận là thành phần chính trong chi *Elsholtzia*, trong đó loài *E. bodinieri* được phân tích thành phần hóa học từ bộ phận trên mặt đất ghi nhận được 3 loại triterpenoid bao gồm acid ursolic, acid corosolis và 2α, 3β, 19α-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid, đồng thời 3 chất này cũng được thu nhận từ loài *E. rugulosa*, *E. ciliata* (Li và cộng sự, 2005; Lai và cộng sự, 2008; Isobe và cộng sự, 1992; Zhao và cộng sự, 2005). Cho đến nay, chỉ có duy nhất một monoterpenoid là 2,6-dimethyl-8-hydroxyl-2,6-octadienic acid-8-O-β-D-glucoside được tìm thấy trong loài *E. bodinieri* như một hợp chất mới (Chen và cộng sự, 2004).

Ở Việt Nam, thành phần hóa học của một số loài thuộc chi *Elsholtzia* đã được nghiên cứu và công bố bởi một số nhóm tác giả. Trong đó, Dung (2006) đã nghiên cứu thành phần hoá học của tinh dầu thu từ loài *E. penduliflora* phân bố ở Sa Pa cho thấy thành phần chính trong tinh dầu của loài này là eucalyptol (64%), β-pinene và γ-terpinene. Theo nghiên cứu của Hòa và cộng sự (2017) thì tinh dầu của loài *E. winitiana* Craib. ở khu vực Hà Giang đã được xác định gồm có 41 cấu tử trong đó có 19 cấu tử hidrocarbon (nhóm monoterpene: 32,24%, nhóm sesquiterpen: 8,84%) và 22 cấu tử là dẫn xuất của hidrocarbon (nhóm aldehyde: 19,10%, nhóm ancol: 16,13%, nhóm este: 13,91% và nhóm oxy: 4,61%). Gần đây, Đạt và cộng sự (2017) đã nghiên cứu thành phần loài *Elsholtzia ciliata* (*E. ciliata*) ở Hà Nội cho thấy thành phần chính gồm terpenoid và steroid như phytol (35,42%), β-sitosterol (15,18%) và nerolidol (9,07%). Nghiên cứu này cũng cho thấy được loài *E. ciliata* là nguồn cung cấp các chất chống oxy hóa rất tiềm năng, có thể sử dụng để sản xuất các loại trà thảo mộc có tác dụng an thần, cải thiện sự lão hóa của cơ thể và hỗ trợ điều trị các bệnh do sự oxy

hóa trong cơ thể gây nên. Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu loài *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland tại Thừa Thiên Huế bằng phương pháp GC/MS cho thấy tinh dầu này có chứa 34 cấu tử, với 26 cấu tử đã được định danh, chiếm 97,5% thành phần hóa học của tinh dầu, các cấu tử chính gồm geranial (28,4%), β-cis-ocimen (23,0%),neral (21,7%) (Nhàn và cộng sự, 2017).

1.2.2. Thành phần hóa học của loài Elsholtzia blanda Benth.

Nghiên cứu về thành phần hoá học của tinh dầu thu từ loài *Elsholtzia blanda* Benth. trên thế giới và ở Việt Nam đã chỉ ra hợp chất chính của tinh dầu là linalool và gerany acetate, ngoài ra còn có các hợp chất khác như: luteolin, luteolin-7-O-glucoside, luteolin-7-O-glactoside, 1,8 – cineol. Bestman và cộng sự (1992) đã sử dụng các phương pháp phân tích thành phần hóa học GC, GC/MS, GC/FTIR, IR ghi nhận được thành phần chính trong tinh dầu loài *E. blanda* thu thập từ Jorliat (Assam) là geranyl acetate (71%), phần còn còn lại là linalool (5,27%), geraniol (3,77%), (E)-β-ocimene (2,96%), β-caryophyllene (1,75%), α-bergainotene (1,7%), (Z)-β-ocimene (1,38%), acetophenone (1,13%) và linaly acetate (1,11%). Rana và cộng sự (2012), đã công bố thành phần hóa học chính trong tinh dầu loài *E. blanda* Benth. ở Ấn Độ bao gồm geranial (43,5%–48,8%), neral (31,7%–34,7%), E-isocitral (1,2%–0,1%). Theo Kotoky và cộng sự (2017), kết quả phân tích GC và GC/MS thành phần hóa học trong tinh dầu loài *E. blanda* được thu thập ở vùng Đông Bắc Ấn Độ cho thấy thành phần chính là linalool (44,9%). Hợp chất α-pinen được phân tích của *E. blanda* ở tỉnh Vân Nam Trung Quốc lên đến 4,84% và giảm xuống còn 1,43% khi loài này phát triển ở tỉnh Tứ Xuyên, Trung Quốc. Điều này chứng tỏ rằng điều kiện sinh thái ở hai vùng này đã làm ảnh hưởng rất nhiều đến thành phần hóa học của loài *E. blanda* (Fang và cộng sự, 1993; Ren và cộng sự, 2002).

Bên cạnh đó, các hợp chất thuộc nhóm flavonoids cũng được phân tích từ loài *E. blanda*. Bốn hợp chất bao gồm isoastragalin (I), luteolin-7 (II), luteolin-3'-glucoside (III) và lutelin-7-galactoside (IV) thuộc nhóm flavonoids glucoside thu nhận được từ loài *Elsholtzia blanda* Benth. thuộc tỉnh Vân Nam Trung Quốc bằng phương pháp hóa học và phân tích quang phổ với dung môi chiết là nước, đồng thời cũng ghi nhận linalool và geranyl acetate là thành phần chính từ loài *E. blanda* Benth. (Zhang, 1999; Wang và cộng sự, 2005). Ba flavone C-methylated mới, được đặt tên là 5,5'-dihydroxy-7-acetoxy 6,8.3'', 3''-tetramethylpyran (3',4') (flavone số 1); 5,5'-dihydroxy-

7-(α-methyl) butyroxyl-6,8,3'', 3''-tetramethlpyran (3',4') (flavone số 2) và 5,5'-dihydroxy-6,7-methylenedioxy-8,3'', 3''-trimeth ylpyran (3',4') (flavone số 3) cùng với ba flavone đã được biết đến được xác định từ loài *Elsholtzia blanda* Benth. thu được từ phía Nam tỉnh Cam Túc (Trung Quốc) (Zheng và cộng sự, 2001).

Tại Việt Nam, Dũng và cộng sự (1996) đã xác định được năm dạng hóa học của loài *E. blanda* thu được ở khu vực Lào Cai, Sa Pa và Sơn La. Các dạng hóa học (chemotype) đặc trưng đã được phát hiện là:

- Chemotype I: 1,8-cineol (62%) ở trong Kinh giới núi thuộc khu vực Sơn La.
- Chemotype II: 1,8-cineol (52,7%) và linalool (15,5%) trong Kinh giới núi phân bố ở Sa Pa và Lào Cai.
- Chemotype III: gerany acetat (31,3%), linalool (18,7%) và 1,8-cineol (13,4%) trong Kinh giới núi ở Sa Pa, Lào Cai.
- Chemotype IV: 1,8-cineol (64%), geranyl acetat (11%) tại mẫu thu được ở khu vực Lào Cai.
- Chemotype V: Sesquiterpen (99%) tại mẫu thu nhận được ở Sa Pa và Lào Cai

1.2.3. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi Elsholtzia và loài Elsholtzia blanda Benth.

Nghiên cứu dược lý về các hợp chất thứ cấp trong chi *Elsholtzia* cho tác dụng chống virus, kháng khuẩn, chống viêm, chống oxi hóa (Liu và cộng sự, 2008). Theo y học dân gian, bộ phận trên mặt đất của các loài trong chi *Elsholtzia* thường được sử dụng để chữa bệnh cảm, tả, lỵ, bệnh ngoài da và các chứng viêm (Lalramnghinglova, 2003). Apigenin, apiin, luteolin, galuteolin, luteolin 3'-glucuronyl, methyl ester, và các chiết xuất ethyl acetate của *E. rugulosa* đã ghi nhận khả năng ức chế một số chủng virus cúm (H1N1, H3N2) và khả năng kháng virus cao gấp 12 lần kháng sinh ribavirin (Liu và cộng sự, 2008).

Luteolin, quercetin và ludongnin 5 được tách chiết từ rễ *cây E. bodinieri* cho kết quả kháng khuẩn trên ba chủng vi sinh vật *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* và *Escherichia coli* ở nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) khác nhau, của ludongnin 5 tương ứng là 5 µg/ml, 10 µg/ml và 80 µg/ml; luteolin kháng lại *E. coli* và *S. aureus* với giá trị MIC tương ứng là 50 µg/ml và 40 µg/ml; quercetin kháng lại *S. aureus* và *Bacillus subtilis* với giá trị MIC tương ứng là 60 µg/ml và 90 µg/ml (Hu và cộng sự, 2007; Hu và cộng sự, 2006; Zhao và cộng sự 2005). Các chiết xuất ethanol 75% của

các bộ phận phía trên mặt đất của loài *E. splendens* tại khu vực Đông Bắc châu Á có thể ức chế đáng kể tình trạng viêm cấp tính và viêm dưới da, ở nồng độ 5–100 µg/ml đã ức chế đáng kể việc sản xuất PGE2 bởi cyclooxygenase-2 của các tế bào RAW 264,7 cho thấy việc ức chế cyclooxygenase-2 có thể là một trong những cơ chế chống viêm của tế bào, ngoài ra *E. splendens* còn có tác dụng giảm đau ở chuột do acetic acid (ức chế 50% ở nồng độ 400 mg/kg) (Kim và cộng sự, 2003). *Elsholtzia rugulosa*, *Elsholtzia blanda* tại Trung Quốc được cho là nguồn kháng sinh tự nhiên có khả năng kháng lại chủng *Staphylococcus aureus* kháng methicilin (Zuo và cộng sự, 2008).

Luteolin là một flavones có nhiều trong chi *Elsholtzia*, được ghi nhận là một chất chống viêm hiệu quả, do nó có thể ức chế việc tạo ra NO sinh học và quá trình chuyển hóa các cytokine gây viêm khác như TNF -α, IL-1β, IL-6, NF-B,... (Liu và cộng sự, 2007); do đó giải thích được hoạt động chống viêm của loài *Elsholtzia* nhờ vào hàm lượng flavones hoặc các dẫn xuất của flavones (Guo và cộng sự, 2012). Các chiết xuất của các bộ phận trên mặt đất của *E. rugulosa* và *E. bodinieri* cho thấy khả năng kháng oxy hóa đáng kể, điều đó có thể chứng minh được lý do *E. rugulosa* và *E. bodinieri* có thể chống lão hóa (Zhang và cộng sự, 2007; Guo và cộng sự, 2010). Hoa của *E. rugulosa* rất giàu flavonoid với hàm lượng lên tới 0,2352 mg/ml và flavonoid có khả năng loại bỏ các ion OH^- và O_2^- với hiệu quả lên tới 30,98%–40,5% (Hu & Zheng, 2006). Dẫn xuất và các hạt nano được tạo ra từ chiết xuất của hoa *E. splendens* thể hiện sự phụ thuộc vào nồng độ để loại bỏ các gốc DPPH, còn cho thấy khả năng kháng oxy hóa dựa trên việc phản ứng với DMBA (7,12-dimethyl-benz(a)anthracene) (Lee và cộng sự, 2010; Choi và cộng sự, 2008). Tỷ lệ ức chế LPO cực đại gây ra bởi các gốc tự do OH của chiết xuất flavonoid từ loài *E. blanda* là 70,8% với IC50 0,23 mg/l (Gao và cộng sự, 2009).

Tại Ấn Độ, tinh dầu các bộ phận trên mặt đất của 4 loài *Elsholtzia stachyodes*, *Elsholtzia communis*, *Elsholtzia griffithii* và *Elsholtzia beddomei* thu được bằng phương pháp cất kéo hơi nước cho thấy kết quả chống lại sự phát triển của vi sinh vật gây mụn là *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus cholermidis*, trong đó tinh dầu từ *Elsholtzia stachyodes* có hiệu quả ức chế đối với 2 chủng vi sinh vật được khảo sát với giá trị MIC tương ứng là 0,78 và 1,56 µg/ml và có hiệu quả gấp 5 lần so với kháng sinh erythromycin (Phetsang và cộng sự, 2019). Tinh dầu từ loài *E. splendens* có khả năng ức chế *Staphylococcus aureus* và *Propionibacterium acnes* (hai chủng vi sinh vật

gây ra mụn trứng cá) với nồng độ 0,31 µl/ml (Kim và cộng sự, 2008). Tinh dầu từ một số loài khác cùng chi *Elsholtzia* cho thấy ức chế hoạt động của một số loại vi khuẩn thường dẫn đến nhiễm trùng đường hô hấp ở con người như *Staphylococcus aureus*, *Bacillustyphi*l, *Aeruginosus bacillus*, *Diplococcus intracellulari*s (Gong, 1997; Zhang và cộng sự, 2002).

Theo Nhàn và cộng sự (2017), tinh dầu Kinh giới (*Elsholtzia ciliata* (Thumb.) Hyland) tại Thừa Thiên Huế cho thấy khả năng kháng khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và nấm *Candida albicans* nhưng không có hoạt tính kháng các vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruuginosa*. Bên cạnh đó, tinh dầu hoặc dịch chiết từ các loài *Elsholtzia* còn cho thấy được khả năng kháng khuẩn ở một số chủng vi sinh vật khác như: *Escheriachia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococus* nhóm B, *Bacterium paraptyphosum* B, *Bacillus typhi murium*, *Bacillus dysenteriae*, *Bacillus diphthriae*, *Bacillus meningitidis purulentae*, *Bacillus proteus*, *Allthrax bacillus*, *Neisseria intracellularis* (Liu và cộng sự, 2007).

1.3. Ứng dụng của chi *Elsholtzia* và loài *Elsholtzia blanda* Benth.

Trung Quốc, Ấn Độ đã sử dụng các loài thực vật trong chi *Elsholtzia* làm thuốc và gia vị từ xa xưa. Trong y học dân gian Trung Quốc và Ấn Độ, thường sử dụng các loài *Elsholtzia* để trị cảm, cúm, bệnh tiêu chảy, kiết lỵ, rối loạn tiêu hóa, say nắng, giải độc, chống viêm, giảm đau,... và được sử dụng dưới dạng thuốc sắc; một số loài được sử dụng làm thuốc chữa cảm lạnh như *E. ciliata*, *E. myosurus*, *E. densa*, *E. densa var.* calycocarpa, *E. splendens*, *E. cyprianii var.* angustifolia, *E. blanda*, *E. communis*, *E. cypriani*, *E. penduliflora*, *E. rugulosa*, *E. feddei* và *E. strobilifera*; hai loài trong số đó là *E. ciliata* và *E. myosurus* được sử dụng làm thuốc chữa ho (Shi và cộng sự, 1994; Du và cộng sự, 1989; College, 2005). Trong dân gian các loài thuộc chi *Elsholtzia* được sử dụng để điều trị cảm lạnh, sốt đau đầu, đau bụng, nôn mửa, tiêu chảy và khó tiểu (College, 1985). Ngoài ra còn một số nghiên cứu cho thấy hoạt động ức chế đáng kể đến virus cúm A ở châu Á, và có thể làm chậm sự xuất hiện của các triệu chứng từ 72–96 tiếng sau khi bị nhiễm virus ở ngoài cơ thể (College, 2005; Du và cộng sự, 1989).

Theo y học dân gian Trung Hoa, loài *Elsholtzia blanda* Benth. được sử dụng như một chất điều trị các rối loạn như viêm gan, kiết lỵ, cảm lạnh, viêm amidan, viêm

dạ dày cấp tính, viêm bể thận cấp tính và mãn tính (College, 1975). Tổng flavone được chiết xuất từ *E. blanda* có thể cải thiện và phục hồi chức năng cơ tim và giữ cho tim không bị tổn thương do thiếu máu cục bộ, hiệu quả đạt được bằng cách ức chế huyết thanh creatine kinase-MB (CK-MB) và malondialdehyd (MDA) (Haiyun và cộng sự, 2004). Luteolin 7-O-β-D-glucopyranoside có thể bảo vệ tế bào cơ tim chuột sơ sinh khỏi bị tổn thương do H_2O_2 và giảm hàm lượng canxi nội bào (Mu và cộng sự, 2009).

Trong y học dân gian của Việt Nam, Kinh giới núi cũng được ghi nhận dùng làm thuốc chữa cảm cúm, sốt, ho, tiểu tiện khó do bị viêm, tiểu tiện ra máu (Chi, 2003). Bên cạnh đó, có thể dùng cây tươi để xông, chữa cảm cúm, hoặc giã nát cây tươi để đắp hay xoa bóp chỗ đau khi trẻ em ho hay sốt. Rễ Kinh giới núi còn được dùng để trị sốt rét (Chi, 2003). Trạm nghiên cứu dược liệu tỉnh Lai Châu đã bào chế một dạng dầu xoa gồm tinh dầu Kinh giới núi và tinh dầu Bạc hà có tên "Dầu xoa Sìn Hồ", công dụng của dầu xoa này là giải nhiệt, giảm đau và sát khuẩn, ngoài ra còn dùng để chống cảm cúm hoặc xoa bóp chữa tê thấp, đau mình mẩy (Bích và cộng sự, 2003).

1.4. Tổng quan về xà phòng

Xà phòng là một chất tẩy rửa các vết bẩn, vết dầu mỡ và có khả năng diệt khuẩn. Xà phòng phổ biến ở hai dạng chính là rắn và lỏng, được tạo ra bằng cách cho chất béo (dầu thực vật, mỡ động vật hay dầu mỏ...) tác dụng với dung dịch kiềm bằng phản ứng xà phòng hóa. Sản phẩm tạo ra là muối Natri hoặc Kali của acid béo (Thomssen, 1992).

Người Celt ở nước Anh thời cổ xưa cũng tạo ra xà phòng bằng cách tương tự như ở Babylon và Ai Cập bằng cách hòa tro thực vật với mỡ động vật và họ gọi sản phẩm này là "saipo" đó cũng là nguồn gốc của từ "soap" hiện nay. Zosimos một nhà hóa học người Ai Cập đã tạo ra xà phòng và viết về quy trình nấu xà phòng (Ditchfield, 2001). Thời La Mã, con người đã biết cách làm xà phòng từ mỡ dê, tro gỗ và thêm muối vào xà phòng giúp xà phòng cứng hơn, dùng nó để giặt rửa (Ditchfield, 2001). Các sản phẩm xà phòng còn xuất hiện ở Babylon, Ai Cập cổ đại, xà phòng được tạo ra bằng cách hòa tro của thực vật (giàu Kali) với mỡ đun sôi, sau khi nước bốc hơi hết và phần chất rắn nguội đi thì hỗn hợp này trở thành một chất rắn giống như sáp: đó chính là xà phòng (Ditchfield, 2001). Như vậy, xà phòng đã xuất hiện cách đây

hàng ngàn năm và đó là một phát minh đầy ý nghĩa có giá trị đến hiện tại và cả tương lai.

Ngày nay các sản phẩm xà phòng đa dạng về mẫu mã, màu sắc hương liệu, cũng như công dụng của chúng. Xà phòng hiện nay được ứng dụng vào hầu hết tất cả các ngành nghề như dịch vụ, công nghiệp tự động hóa, dệt may, bôi trơn cho gia công cơ khí, xử lý vải, giấy,... Nhưng một trong những ứng dụng quan trọng cũng như phổ biến của của xà phòng vào ngành mỹ phẩm và đang là một xu hướng được người tiêu dùng quan tâm.

Tùy thuộc vào các đặc tính của quá trình tạo xà phòng, mục đích sử dụng mà xà phòng được chia ra làm hại loại là xà phòng công nghiệp và xà phòng thiên nhiên. Xà phòng công nghiệp được tạo chủ yếu từ dầu mỏ, các phụ gia hóa học, phụ gia tổng hợp, hương liệu tổng hợp quá trình sử dụng lâu dài có thể ít nhiều ảnh hưởng tới sức khỏe của con người, đặc biệt những ai nhạy cảm với xà phòng công nghiệp. Xà phòng thiên nhiên được sản xuất từ các nguyên liệu có nguồn gốc tự nhiên như các loại dầu thực vật, hương liệu tự nhiên như một số loại bột thực vật (bột trà xanh, bột chùm ngây,...), tinh dầu thiên nhiên,... đa phần là an toàn với sức khỏe và ít gây kích ứng (Simmons và Appleton, 2007; Spitz và Luis, 1990).

Bản chất hóa học của xà phòng là chuỗi các nguyên tử carbon, một đầu ưa dầu và một đầu ưa nước. Quá trình sử dụng xà phòng được hòa loãng với nước nhằm hoạt hóa hai đầu này giúp cho quá trình tẩy rửa được diễn ra dễ dàng và hiệu quả (Thomssen, 1992). Vì vậy, tùy theo mục đích sử dụng mà ta sẽ phối tỷ lệ giữa chất béo và kiềm khác nhau. Lượng kiềm và chất béo vừa đủ tạo ra xà phòng có chất lượng tốt phù hợp cho da người: nếu lượng kiềm nhiều hơn chất béo thì xà phòng có tính tẩy rửa cao hơn nhưng dễ gây kích ứng da cho người sử dụng; nếu lượng chất béo nhiều hơn lượng kiềm từ 5–8 % thì xà phòng có khả năng cân bằng độ ẩm cho da tốt hơn. Do đó, việc lựa chọn loại chất béo sẽ ảnh hưởng đến chất lượng của xà phòng (Roper và cộng sự, 2014).

Xà phòng thiên nhiên có đặc điểm sử dụng các nguyên vật liệu từ thiên nhiên để tạo thành. Do sử dụng các nguyên liệu có nguồn gốc từ thiên nhiên, với khả năng chăm sóc làn da với nhiều dưỡng chất hữu ích và không gây ô nhiễm cho môi trường giống như các sản phẩm xà phòng công nghiệp hiện nay. Xà phòng thiên nhiên còn không chứa chất bảo quản, màu sắc, hương liệu công nghiệp ngoài ra quá trình xà

phòng hóa còn tạo ra glycerin, đây là một chất giữ ẩm tuyệt vời thường được tách ra khỏi xà phòng công nghiệp.

1.5. Tổng quan về các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu này

1.5.1. Candida albicans

Candida albicans là một loài nấm có thể gây bệnh, nhưng lại là một thành phần thường gặp ở hệ vi sinh vật đường ruột của con người, hầu như không sinh sản và phát triển ngoài cơ thể con người. Trong các xét nghiệm thông thường, loài này đã được phát hiện trong đường tiêu hóa và miệng ở khoảng 40–60% người lớn khỏe mạnh (Odds, 1988; Pfaller và Diekema, 2007). *C. albicans* có bào tử hình bầu dục có chồi hoặc không, thành nhẵn, đôi khi thấy sợi giả, kích thước bào tử khoảng 3–6 µm. Nấm candida dễ bị tiêu diệt bởi nhiệt độ, môi trường khô, có thể tồn tại ở môi trường ẩm (Bộ Y tế, 2016).

Candida albicans là một tác nhân gây bệnh cơ hội, có ít nhất khoảng 75% phụ nữ bị nhiễm nấm *Candida* một lần trong cuộc đời. Tuy nấm *Candida* thường vô hại, nhưng nó sẽ trở thành mầm bệnh cơ hội cho bệnh nhân suy giảm miễn dịch (Ruhnke, 2002; Meiller và cộng sự, 2009; Schulze và Sonnenbom, 2009; Sobel, 1997). *Candida* thường gây ra các bệnh về nhiễm trùng (Kabir và cộng sự, 2012) và thường được biết đến nhiều nhất là nhiễm trùng âm đạo ở nữ giới, nhiễm trùng niêm mạc (bệnh tưa miệng), ngoài ra còn được ghi nhận gây ra nhiễm trùng máu và tim mạch phổ biến nhất ở Mỹ (Calderone và Clancy, 2011; Gudlaugsson và cộng sự, 2003). Nhiễm trùng máu do nấm *Candida* gây ra có tỷ lệ tử vong cao với 50% trong số các ca bị nhiễm bệnh. Ở trẻ sơ sinh, các ca bệnh nhiễm trùng máu do nấm *Candida* gây ra được ghi nhận thường xuyên hơn (Wey và cộng sự, 1988; Gudlaugsson và cộng sự, 2003). Đối với các bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch, bao gồm cả bệnh nhân HIV, người được ghép tạng, bệnh nhân hóa trị và trẻ sơ sinh nhẹ cân, triệu chứng nhiễm trùng do *Candida* gây ra có thể biểu hiện ở toàn thân (Pfaller và Diekema, 2007; Schenlenz, 2008).

1.5.2. Escherichia coli

Escherichia coli (E. coli) là trực khuẩn Gram âm (-) hình gậy ngắn, di động do có lông quanh thân, một số chủng *E. coli* có vỏ polysaccharide, không sinh nha bào. Trong cơ thể có hình cầu trực khuẩn, gram âm, đứng riêng lẻ đôi khi xếp thành chuỗi ngắn. *E. coli* dễ phát triển trên các môi trường nuôi cấy thông thường (Dũng, 2007).

E. coli là vi khuẩn hiếu khí và yếm khí tùy nghi, có thể sinh trưởng ở nhiệt độ 5–40^{o}C, nhiệt độ tốt nhất để phát triển là 37^{o}C, pH thích hợp là từ 7,2–7,4. Trên môi trường thạch thường có khuẩn lạc dạng S (nhăn bóng, bờ đều), đôi khi hình thành khuẩn lạc dạng R (nhăn nheo) hoặc dạng M (nhầy), khuẩn lạc có màu xám, đục. Trong môi trường lỏng, sau 1–2 ngày nuôi cấy thường làm đục môi trường, có váng trên bề mặt hoặc dính quanh thành ống, tạo thành cặn lắng xuống đáy (Dũng, 2007).

E. coli thường không độc tuy nhiên vi khuẩn sản sinh độc tố trong ruột gây rối loạn tiêu hóa, biểu hiện lâm sàng biến thể nhẹ đến nặng có thể đe dọa đến tính mạng con người tùy theo dòng gây bệnh, liều lượng và khả năng đáp ứng của từng người (Dũng, 2007). Thời gian ủ bệnh khi bị ngộ độc *E. coli* trung bình 26 giờ, biến thiên từ 4–44 giờ. Loại độc tố tế bào có thời gian gây bệnh trung bình 11 giờ, biến thiên 8–24 giờ. Bệnh phát ra đột ngột đau bụng dữ dội, rất ít nôn mửa, đi phân lỏng từ 1–15 lần/ngày. Nhiệt độ bình thường của cơ thể tăng hoặc tăng nhẹ. Bệnh kéo dài 1–3 ngày rồi khỏi. Trường hợp nặng bệnh nhân có thể sốt cao, mệt mỏi, tay chân co quắp (Tuân, 2002).

1.5.3. Staphylococcus aureus

Staphylococcus là loại cầu khuẩn Gram dương (+) bao gồm cả giống hiếu khí (*Micrococcus*, *Planococcus* và *Deinococcus*), giống kị ký tùy nghi (*Staphylococcus*, *Stomacoccus*, *Streptococcus*, *Leuconostos*, *Pediococcus*, *Aerococcus* và *Gemella*) và giống kị khí (*Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus* và *Sarcina*). Những đặc tính tính khác nhau của cầu khuẩn gram (+) gồm: sự sắp xếp của tế bào, hiếu khí bắt buộc, kị khí tùy nghi hay vi hiếu khí, kị khí bắt buộc, phản ứng catalase, sự hiện diện cytochromes, sản phẩm lên men từ quá trình kị khí, peptidoglycan, acid teichoic trong thành tế bào vi khuẩn (Scott và cộng sự, 2000). Trong *Stapphylococcus*, *Staphylococcus aureus* là loài thường được gặp nhất. *S. aureus* hay còn gọi là tụ cầu vàng, là những vi khuẩn hình cầu, không di động, gram dương, đường kính từ 0,5–1,5 µm, tế bào xếp thành hình chùm nho, không di động. Thành tế bào kháng với lysozyme và nhạy với lysotaphin, một chất có thể phá hủy cầu nối pentaglycin của tụ cầu (Phúc, 2013).

Tụ cầu vàng thuộc loài dễ nuôi cấy, phát triển được ở nhiệt độ 10–45^{o}C và nồng độ muối cao tới 10%, thích hợp được cả ở điều kiện hiếu và kỵ khí (Chính, 2007). Tụ cầu vàng có khả năng đề kháng với nhiệt độ và hóa chất cao hơn các vi khuẩn không

có nha bào khác. Khả năng đề kháng với nhiệt độ thường phụ thuộc vào khả năng thích ứng nhiệt độ tối đa (45^oC) mà vi khuẩn có thể phát triển. Tụ cầu vàng cũng có thể gây bệnh sau một thời gian dài tồn tại ở môi trường (Chính, 2007).

S. aureus thường ký sinh ở mũi họng và có thể cả ở da. Vi khuẩn này gây bệnh cho người bị suy giảm đề kháng hoặc chúng có nhiều yếu tố độc lực (Chính, 2007). Tụ cầu vàng ký sinh ở da và niêm mạc mũi, nên nó có thể xâm nhập qua các lỗ chân lông, chân tóc hoặc các tuyến dưới da. Sau đó gây nên các nhiễm khuẩn sinh mủ: mụn nhọt, đầu đinh, các ổ áp xe, eczema, … Mức độ các nhiễm khuẩn này phụ thuộc vào sự đề kháng của cơ thể và độc lực của vi khuẩn. *S. aureus* thường gây ra nhiễm khuẩn máu nhiều nhất, nhiễm tụ cầu vàng ngoài da thường gặp ở trẻ em và người suy giảm miễn dịch (Chính, 2007).

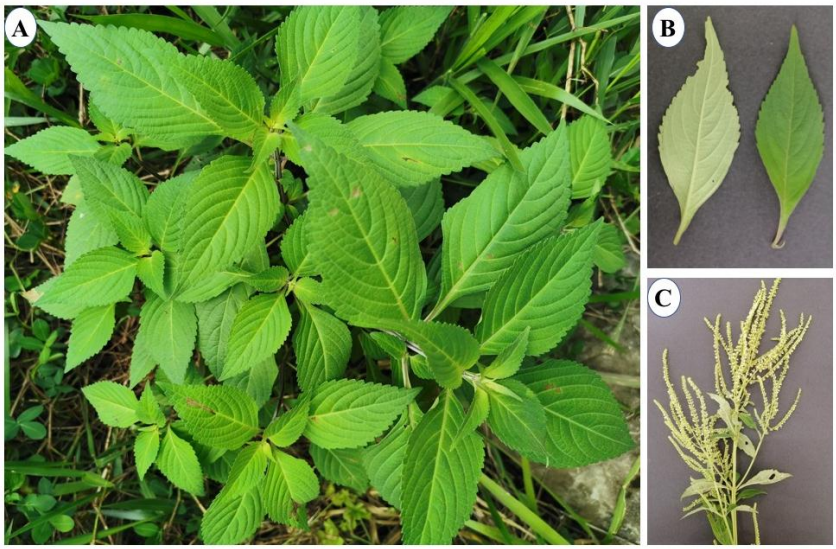
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Cây kinh giới núi (*Elsholtzia blanda* Benth.) phân bố ở khu vực Lâm Đồng (Hình 1).

Mẫu được thu hái tại huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng. Thu hái các bộ phận ở trên mặt đất khi có đủ hoa, lá. Quan sát, mô tả và so sánh hình thái (Klein và cộng sự, 1978) với các mô tả trước xem có sự khác nhau để định danh đúng loài. Sau khi thu hái sẽ loại bỏ bộ phận hư, dập, bẩn, tách riêng lá và hoa sau đó sấy ở 50^{o}C cho đến khi độ ẩm không đổi.



Hình 1. Kinh Giới núi (*Elsholtzia blanda* Benth.) A. Cây; B. Mặt dưới và mặt trên lá; C. Cành mang hoa.

2.1.2. Đối tượng hỗ trợ sử dụng trong nghiên cứu này

- *Candida albicans*
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*

Các chủng vi sinh vật trên được cung cấp bởi khoa xét nghiệm bệnh viện Đa Khoa Tỉnh Lâm Đồng.

2.1.3. Hóa chất

- Ethanol
- Natri sulfate (Na_2SO_4)
- Natri hydroxit (NaOH)
- Acid hydrochloric (HCl)
- Thuốc thử Mayer
- Thuốc thử Bouchardat
- Thuốc thử Bajiet
- Bột Magie
- Amoniac đậm đặc
- Sắt (III) clorua ($FeCl_3$)
- Chì acetate ($Pb(C_2H_3O_2)_4$)
- Gelantin
- Dầu dừa, dầu Olive
- Môi trường thạch dinh dưỡng (NA)

2.1.4. Thiết bị

- Bộ chưng cất tinh dầu
- Bộ chưng cất cách thủy
- Bộ chiết soxhlet
- Máy cô quay chân không IKA
- Tủ sấy model UNB 500 Memmert
- Tủ ấm model UNB 500 Memmert
- Nồi hấp tiệc trùng tự động STUDY SA -300 VL
- Cân phân tích Denver Instrument MXX 212
- Tủ cấy vô trùng ESCO Laminar Flow Cabinet
- Các thiết bị, dụng cụ khác cần thiết cho quá trình thực hiện thí nghiệm

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp thu mẫu thực vật

Mẫu cây được thu tại khu vực Cổng Trời, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng. Thời gian thu mẫu từ tháng 11/2019 đến tháng 3/2019. Thu hái các bộ phận ở trên mặt đất khi có đủ hoa, lá. Quan sát, mô tả và so sánh hình thái (Klein và cộng sự, 1978) với

các mô tả trước đó xem có sự khác nhau để định danh đúng loài. Mẫu sau khi thu hái được loại bỏ tạp chất, bảo quản kín trong bao nilon.

Đối với mẫu dùng để tách chiết tinh dầu thì mẫu sau khi thu hái sẽ loại bỏ tạp chất sau đó mẫu được đưa ngay vào hệ thống tách chiết để nhằm giảm thiểu khả năng thất thoát tinh dầu, lượng mẫu còn lại thì được bọc kín bảo quản trong ngăn mát của tủ lạnh với nhiệt độ bảo quản từ (2–8^{o}C).

Đối với tách chiết các nhóm hợp chất thứ cấp có trong cây Kinh giới núi, mẫu sau khi thu hái, loại bỏ tạp chất sau đó được sấy khô bằng tủ sấy chân không với nhiệt độ 50^{o}C, áp suất 80 atm cho đến khi khối lượng không đổi, mẫu sau khi sấy khô được bảo quản trong túi nilon có chứa silicagel.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học loài Elsholtzia blanda Benth.

Phương pháp chiết Soxhlet và cất kéo hơi nước được sử dụng để thu cao chiết và tinh dầu có trong cây Kinh giới núi

2.2.2.1. Phương pháp chiết Soxhlet (Soxhlet, 1879)

Cao chiết Kinh giới núi được thu được nhờ vào phương pháp chiết Soxhlet và được tiến hành như sau:

- Cân 25 g bộ phận trên mặt đất cây Kinh giới núi đã được sấy khô ở điều kiện chân không ở 50^{o}C, 80 atm trong 48 tiếng. Xay thô, bọc kín trong túi vải và đặt vào bộ chiết Soxhlet, sử dụng 500 ml cồn 70^{o} để tách chiết trong 6 giờ. Sau khi hoàn tất, lấy dịch chiết ra khỏi bộ chiết Soxhlet, tách dung môi bằng cách sử dụng máy cô quay chân không ở điều kiện 180 vòng/phút trong vòng hai giờ. Sau đó, tiến hành thu dịch chiết ở dạng đậm đặc. Dùng dịch chiết dậm đặc này cho lên bếp cách thủy, đun cách thuỷ trong khoảng từ 1–1,5 giờ ở nhiệt độ 70^{o}C để loại bỏ số dung môi còn lại và thu cao chiết.

2.2.2.2. Phương pháp cất kéo hơi nước (Meyer-Warnod, 1984)

Tinh dầu cây Kinh giới núi được tách chiết bằng phương pháp cất kéo hơi nước và tiến hành cụ thể như sau:

- Cân 1,5 kg cây Kinh giới núi cho vào nồi chưng cất tinh dầu chứ 5 lít nước, nguyên liệu và nước ngăn cách nhau bởi lớp vỉ nổi. Khi nước sôi, hơi nước bốc lên mang theo tinh dầu đi qua thiết bị làm lạnh. Hơi nước ngưng tụ chảy xuống bình chiết. Tinh dầu nhẹ hơn nước nên nổi lên trên. Sau 2 giờ tách chiết thì hoàn tất quá trình ly trích, tiến hành

thu tinh dầu. Tinh dầu sau đó được làm khan bằng Na_2SO_4 để loại bỏ hoàn toàn nước và bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ 18–25^oC và được bảo quản trong điều kiện tối.

2.2.2.3. Phương pháp định tính

Chuẩn bị cao chiết định tính: cao chiết được hòa tan bằng cồn 70^o, pha loãng bằng nước cất. Sau đó lọc qua giấy lọc để loại bỏ cặn. Dịch lọc được bảo quản trong tủ lạnh 4^oC để thực hiện các thí nghiệm định tính, thực hiện với 3 mẫu cao tổng, cao hoa và cao lá. Phương pháp định tính các nhóm hợp chất thứ cấp trong cao chiết:

- Định tính Alkaloid theo phương pháp của Cannell (1998): thực hiện phản ứng với thuốc thử Bouchardat và Mayer. Chuẩn bị 3 ống nghiệm, mỗi ống nghiệm cho 1ml dịch lọc. Ống thứ nhất cho thêm vài giọt thuốc thử Mayer, ống thứ hai cho thêm vài giọt thuốc thử Bouchardat, ống thứ ba dùng làm đối chứng quan sát và ghi nhận hiện tượng.

- Định tính Flavonoid, kết hợp đọc kết quả của ba phản ứng Cyanidin, phản ứng với kiềm và phản ứng với Sắt (III) clorua (Mabry, 1970):

+ Phản ứng Cyanidin: Chuẩn bị 2 ống nghiệm, mỗi ống thêm vào 2ml dịch lọc. Ống thứ nhất làm ống đối chứng. Ống thứ 2 cho vào ít bột magie và vài giọt acid hydrochloric, lắc nhẹ và đun sôi cách thủy vài phút.

+ Phản ứng với kiềm: Thí nghiệm 1: cho 2 giọt dịch lọc lên giấy lọc, hơ khô trên ngọn lửa đèn cồn đến khi khô; giọt thứ nhất làm đối chứng, giọt thứ hai hơ trên miệng bình amoniac đậm đặc. Thí nghiệm 2: chuẩn bị hai ống nghiệm, mỗi ống cho vào 1ml dịch lọc, ống thứ nhất làm đối chứng; ống thứ hai cho vài giọt NaOH 10%.

+ Phản ứng với sắt (III) clorua 5%: chuẩn bị hai ống nghiệm, cho vào mỗi ống 1ml dịch chiết; ống thứ nhất làm đối chứng, ống thứ hai cho thêm vài giọt FeCl3 5% và quan sát hiện tượng.

- Định tính nhóm Coumarine (Đàn và cộng sự, 1985): thực hiện nhờ phản ứng mở vòng Lacton. Chuẩn bị 2 ống nghiệm, mỗi ống cho vào 1ml dịch lọc. Ống thứ nhất cho vào 0.5ml NaOH 10%, ống thứ hai để nguyên. Đun sôi 2 ống nghiệm, kế tiếp cho vào ống nghiệm 2ml nước cất, lắc đều. Sau đó, cho vào ống 1 một vài giọt HCl đậm đặc và quan sát hiện tượng.

- Định tính nhóm Tanin (Đàn và cộng sự, 1985), thực hiện thí nghiệm như sau. Chuẩn bị 4 ống nghiệm, mỗi ống cho vào 1ml dịch lọc. Ống thứ nhất làm ống đối

chứng, ống thứ 2 cho vào 5 giọt chì acetate 10%, ống thứ 3 cho vào 5 giọt Gelatin 1%, ống thứ 4 cho vào 5 giọt sắt (III) clorua và quan sát hiện tượng.

- Định tính nhóm Saponin (Thu, 1990; Đàn và cộng sự, 1999): thực hiện hai thí nghiệm kiểm chứng:

+ Thí nghiệm 1: Cho vào ống nghiệm 5ml dịch lọc. Sau đó đun sôi nhẹ, cho tiếp vào 10ml nước cất. Lắc mạnh theo chiều dọc trong 5 phút; sau đó giữ nguyên trong 15 phút; quan sát cột bọt.

+ Thí nghiệm 2: Chuẩn bị hai ống nghiệm, cho vào mỗi ống 1ml dịch lọc. Ống thứ nhất cho thêm 5ml NaOH 0,1N (pH=13); ống thứ hai cho thêm 5ml HCL 0,1N (pH=1); bịt miệng ống và lắc mạnh cả hai ống trong 1 phút và để yên. Quan sát cột bọt.

- Phương pháp định tính tinh dầu:

Để xác định thành phần và hàm lượng của tinh dầu Kinh giới núi, đồng thời nhằm đảm bảo độ tin cậy của kết quả phân tích các thành phần hóa học, tinh dầu thu được sẽ được phân tích các thành phần hóa học bằng phương pháp sắc ký ghép khối phổ Gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) được phân tích tại Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm Tp. Hồ Chí Minh (CASE) thuộc Sở Khoa học và Công nghệ Tp. Hồ Chí Minh thực hiện.

2.2.3. Phương pháp khảo sát hoạt tính sinh học

Phương pháp kháng sinh đồ (Kirby-Bauer) (Bauer, 1966) được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết, tinh dầu và sản phẩm xà phòng thiên nhiên trong nghiên cứu này. Đổ môi trường thạch dinh dưỡng vào đĩa (20 ml (đối với phương pháp kháng sinh đồ dùng khuếch tán đĩa giấy); 30 ml (đối với phương pháp kháng sinh đồ dùng khuếch tán giếng thạch)). Dùng micropipette hút chính xác 0,1 ml dịch tăng sinh vi khuẩn, cấy trải trên môi trường thạch dinh dưỡng, để ổn định trong 15 phút.

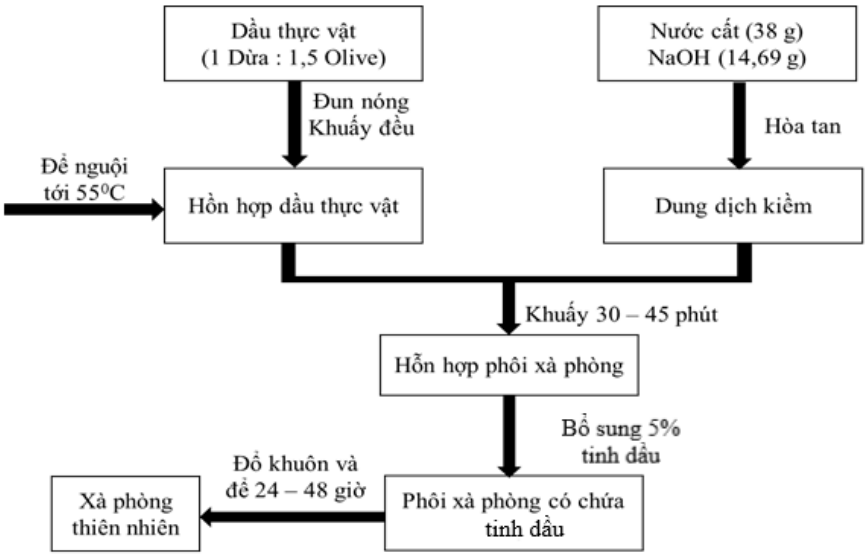
Đối với phương pháp khuếch tán đĩa giấy: đĩa giấy vô trùng đường kính 6 mm (d = đường kính đĩa giấy) được tẩm 5µl mẫu thử theo các nồng độ khác nhau và dung dịch đối chứng. Với phương pháp khuếch tán giếng thạch: trên đĩa thạch dinh dưỡng, dùng dụng cụ đục lỗ thạch tạo giếng trên đĩa thạch sao cho đường kính giếng là 6 mm. Hút 40µl dung dịch mẫu thử nồng độ khác nhau vào các giếng trên đĩa thạch đã trải vi khuẩn.

Sử dụng kháng sinh chloramphenicol làm đối chứng dương, DMSO làm đối chứng âm (đối với xà phòng đối chứng âm là nước cất và đối chứng dương là xà phòng công nghiệp). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Các đĩa thạch được ủ trong môi trường lạnh từ 2–8^{o}C trong vòng 2 giờ sau đó được lấy ra ủ trong tủ ấm với nhiệt độ 32^{o}C trong 24–36 giờ. Hoạt chất sẽ khuếch tán ra môi trường thạch, nếu có hoạt tính sẽ tạo ra vòng vô khuẩn. Kết quả được ghi nhận bằng hình ảnh và đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVK) được tính theo công thức:

ĐKVK = ĐKVK mẫu thử - đường kính của khoanh giấy/giếng thạch.

2.2.4. Phương pháp tạo xà phòng thiên nhiên

Tinh dầu cây Kinh giới núi được phối hợp với phôi xà phòng tỷ lệ 5% khối lượng phôi xà phòng.



Sơ đồ 1: Quy trình tạo xà phòng thiên nhiên trong phòng thí nghiệm theo phương pháp gia nhiệt nhẹ (Quân và cộng sự, 2019).

Các bước tiến hành cho sản xuất 1 kg xà phòng:

Bước 1: Cân 280 g dầu dừa, 420 g dầu Olive, 102,80 g NaOH và 266 g nước cất cần dùng.

Bước 2: Pha dung dịch NaOH: Cho từ từ NaOH vào nồi chứa dung tích 2 lít có sẵn nước cất, khuấy đều bằng đũa thủy tinh đến khi các tinh thể NaOH hòa tan hoàn toàn.

Bước 3: Xà phòng hóa: cho từ từ dung dịch NaOH vào hỗn hợp dầu trong nồi chứa, được gia nhiệt cách thủy đến 55^{o}C. Hỗn hợp được khuấy bằng tay cho đến khi hỗn hợp sánh lại. Sau đó, cho thêm tinh dầu vào và khuấy bằng tay khoảng 2 phút.

Bước 4: Đổ khuôn xà phòng: hỗn hợp xà phòng được cho vào khuôn nhựa hình chữ nhật.

Bước 5: Xà phòng được ủ 24 giờ, sau đó tháo khuôn.

Bước 6: Xà phòng sau khi tháo khuôn được phơi khoảng 4 tuần nơi khô ráo (nhiệt độ phòng). Sau đó, xà phòng được gói bằng giấy.

Sau khi tạo thành sản phẩm xà phòng, chúng tôi đánh giá chất lượng xà phòng theo TCVN 2224:1991

2.2.5. Phương pháp đánh giá các chỉ tiêu hoá lý của xà phòng

- Phương pháp lấy mẫu và phân tích các chỉ tiêu lý hóa theo TCVN 1557:1991 (Phụ lục 1).

- Xác định trạng thái bên trong và mùi: Dùng dao cắt ngang miếng xà phòng hoặc xoa vào lòng bàn tay rồi tiến hành ngửi để đánh giá. Có thể đem làm nóng xà phòng cho đến khi xà phòng tan chảy ra rồi bắt đầu ngửi để đánh giá. Xác định bằng phương pháp cảm quan bằng cách dùng các từ thích hợp như: trắng kem, trắng, hơi vàng ....Đối với mẫu có dùng màu tự nhiên: sử dụng phương pháp đánh giá cảm quan bằng cách so sánh màu của xà phòng với màu tự nhiên trước khi được phối vào màu của xà phòng.

- Xác định hàm lượng acid béo: Dùng acid vô cơ mạnh để phân hủy xà phòng và giải phóng các acid béo và muối. Cân khoảng 5 g xà phòng với độ chính xác đến 0,001 g hòa tan lượng cân vào 60 ml nước cất ở 80 – 90^{o}C, làm nguội dung dịch đến khoảng 40^{o}C thêm 5 giọt chỉ thị metyl da cam, dùng dung dịch acid clohidric 20% trung hòa đến khi toàn bộ dung dịch có màu hồng. Chuyển dung dịch trên vào phễu chiết số 1, thêm vào phễu 50 ml ete etylic. Tráng cốc bốn lần, hai lần dùng nước cất, mỗi lần 25 ml, một lần sử dụng acid clohiđric 20% (5 ml) và cuối cùng dùng 25 ml ete etylic để tráng, và ete sau mỗi lần tráng đều cho vào phễu chiết số 1. Lắc nhẹ lượng chứa trong phễu chiết số 1 bằng cách quay tròn, để yên phễu chiết cho phân làm hai

lớp. Tháo lớp nước ở dưới vào phễu chiết số 2. Thêm 15 ml ete etylic vào phễu chiết số 2, và cũng xử lý như trên. Tháo lớp nước ở dưới vào phễu số 3. Chuyển phần ete ở phễu chiết số 2 sang phễu chiết số 1, dùng ete etylic (khoảng 15 ml) tráng sạch phễu chiết số 2, chuyển sang phễu chiết số 3 và tiếp tục chiết như trên. Phần ete ở phễu chiết số 3 cũng gộp chung vào phễu số 1. Dùng 20 ml ete etylic tráng sạch phễu chiết số 3 và góp vào phễu chiết số 1. Rửa phần ete ở phễu chiết số 1 có chứa acid béo bằng dung dịch natri clorua 10% cho đến phản ứng trung bình (thử với metyl da cam). Sau đó, lọc phần ete đã rửa qua giấy lọc, có khoảng 5 g natri sunfat khan vào bình cầu đã cân. Dùng ete etylic rửa sạch phễu chiết số 1 và giấy lọc. Cất thu hồi ete etylic trên bếp cách thủy. Sau khi cất thu hồi ete, đem sấy bình cầu ở 70^{o}C. Sau đó, lấy ra làm nguội trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng. Đem cân bình cầu có chứa các acid béo với độ chính xác đến 0,001 g. Quá trình sấy kết thúc, nếu hiệu số khối lượng giữa hai lần cân không chênh lệch quá 0,002 g. Hàm lượng các acid béo (X1) tính bằng phần trăm theo công thức: X1=F.m1.100/m (trong đó: F- tỷ số khối lượng trung bình của bánh xà phòng với khối lượng danh nghĩa của bánh xà phòng; m1-khối lượng các acid béo sau khi sấy (g); m- khối lượng mẫu đem phân tích (g)).

- Xác định hàm lượng natri hidroxit (kiềm tự do): dùng dung dịch acid clohidric đã biết nồng độ để chuẩn lượng kiềm tự do trong mẫu với chỉ thị phenolphtalein. Cân khoảng 5 g xà phòng với độ chính xác đến 0,001 g trong bình nón, thêm vào 100 ml ethanol 75% (cồn đã được trung hòa bằng dung dịch natri hiđroxit 0,001N với chỉ thị phenolftalein). Nối bình nón với ống làm lạnh hồi lưu, đun trên bếp cách thủy cho đến khi tan hết xà phòng, sau đó thêm vào bình nón 25 ml dung dịch bari clorua 10% và tiếp tục đun nhẹ. Không lọc kết tủa, vừa lắc, vừa dùng dung dịch acid clohiđric 0,1N chuẩn với chỉ thị phenolphtalein đến chuyển màu. Trong trường hợp xà phòng có màu, phải tiến hành chuẩn độ theo mẫu so sánh. Hàm lượng natri hiđroxit (kiềm tự do), (X2) tính bằng phần trăm theo công thức: X2= F.(V.K.0,004.100)/m (trong đó: V-lượng acid HCl 0,1N tiêu tốn trong quá trình chuẩn độ (ml); K - Hệ số điều chỉnh qua dung dịch acid clohiđric về đúng 0,1N; 0,004-Lượng natri hidroxit (kiềm tự do) tương ứng với 1ml dung dịch acid clohiđric 0,1N (g). Kết quả cuối cùng là trung bình cộng của kết quả hai phép xác định song song. Kết quả xác định được với độ chính xác đến 0,01%.

- Xác định tổng hàm lượng các chất hữu cơ và chất béo chưa xà phòng hóa: Dùng ete petrola tách các chất hữu cơ và các chất béo không bị xà phòng hóa trong xà phòng, sấy và cân. Cân khoảng 10 - 15 g xà phòng với độ chính xác đến 0,001 g. Hòa tan mẫu vào 100 ml ethanol 60%, chuyển toàn bộ dung dịch vào phễu chiết số 1. Dùng ethanol 60% tráng cốc, đổ dung dịch và phễu chiết số 1 và thêm vào phễu 150 ml ete petrola, lắc mạnh trong 1 phút, để yên sau khi tách lớp, tháo lớp nước phía dưới vào phễu số 2 và xử lý tiếp với 50 ml ete petrola nữa. Sau khi tách lớp dưới, chuyển phần ete petrola vào phễu chiết số 1. Dùng nước cất rửa phần ete petrola trong phễu cho đến khi sạch xà phòng (nước rửa đem pha loãng và đun nóng nếu không xuất hiện màu hồng với chỉ thị phenolphtalein là được). Lọc phần ete petrola sau khi rửa qua phễu có 5 g natri sunfat khan vào bình cầu ở nhiệt độ 73 - 75^{o}C cho đến khối lượng không đổi. Quá trình sấy kết thúc nếu hiệu số khối lượng giữa hai lần cân liên tiếp không vượt quá 0,002 g. Tổng hàm lượng các chất hữu cơ có trong xà phòng không bị xà phòng hóa và các chất béo chưa xà phòng hóa so với hàm lượng acid béo trong bánh xà phòng (X3), tính bằng phần trăm theo công thức: X3= (m1.100)/(m.X1). (Trong đó: m1 (g): Lượng cân còn lại trong bình cầu sau khi sấy; m (g): Khối lượng mẫu đem phân tích; X1: Hàm lượng acid béo.)

- Xác định hàm lượng các chất hữu cơ không bị xà phòng hóa: Hòa cặn ở X3 vào 25 ml dung dịch kali hidroxit 0,5 N trong cồn. Nối bình cầu với ống làm lạnh hồi lưu, đem đun cách thủy 1 giờ. Chuyển dung dịch xà phòng thu được vào phễu chiết số 1. Quay tròn phễu chiết nhiều lần, để yên cho dung dịch phân làm 2 lớp, tháo lớp dưới sang phễu số 2 và xử lý với 25 ml ete petrola. Khi đã phân làm hai lớp dưới, chuyển phần ete petrola sang phễu chiết số 1. Chuyển hết phần ete petrola thu được ở phễu chiết số 1 vào bình cầu đã biết khối lượng, đem cất thu hồi ete petrola trên bếp cách thủy. Sau đó, sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 73 - 75^{o}C cho đến khi khối lượng không đổi. Hàm lượng các chất hữu cơ không bị xà phòng hóa so với acid béo trong bánh xà phòng X4, tính theo công thức: X4 =(m1.100)/(m.X1) (Trong đó: m1 (g): Lượng cân còn lại trong bình cầu sau khi sấy; m (g): Lượng mẫu đem phân tích; X1: Hàm lượng acid béo).

- Xác định hàm lượng các chất béo chưa xà phòng hóa: Hàm lượng các chất béo (dầu thực vật) chưa xà phòng hóa so với xà phòng (X5) tính bằng phần trăm (%) theo công thức: X5=X3 - X4.

- Phương pháp đánh giá xà phòng theo tiêu chuẩn TCVN 2224:1991 (Phụ lục 2)

Xà phòng sau khi được tạo thành, sử dụng TCVN 1557:1991 (Phụ lục 1) để lấy mẫu, xác định các chỉ tiêu cảm quan, hóa, lý của xà phòng và so sánh kết quả với TCVN 2224:1991. Các chỉ tiêu ngoại quan và hóa lý phải theo đúng các mức quy định trong TCVN 2224:1991.

- Phương pháp điều tra bảng hỏi

Điều tra khảo sát trên 106 người ngẫu nhiên ở Trường Đại học Đà Lạt và khu ký túc tỉnh Lâm Đồng, để đánh giá thị hiếu của người dùng về sản phẩm xà phòng thiên nhiên được tạo ra từ nghiên cứu này. Mẫu bảng hỏi được thể hiện ở Phụ lục 4.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần với mỗi nghiệm thức. Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê theo kiểm định T test ($p<0,05$) bằng phần mềm R studio version 3.6.2.

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thành phần hóa học của cây *Elsholtzia blanda* Benth.

3.1.1. Hiệu suất tách chiết

Hiệu suất, khối lượng cao chiết thu được khi chiết xuất 25 g mẫu khô nguyên liệu trong 500 ml cồn 70^o bằng phương pháp chiết Soxhlet và hiệu suất tách chiết tinh dầu bằng phương pháp cất kéo hơi nước được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 1. Hiệu suất tách chiết cao và tinh dầu cây Kinh giới núi

	Khối lượng cao lá (g)	**Khối lượng cao hoa (g)**	**Khối lượng cao tổng (g)**	**Khối lượng tinh dầu (g)**
Trung bình	6,14 ± 0,26	5,91 ± 0,21	6,11 ± 0,47	4.79 ± 0,71
Hiệu suất (%)	24,56	23,64	24,44	0,32

Từ kết quả thu được, chúng tôi nhận thấy trong cùng 25 g mẫu đưa vào tách chiết thì cao chiết thu được từ mẫu lá cho hiệu suất tách chiết tốt nhất với tỉ lệ đạt được là 24,56%, ở cao thu từ hoa cho hiệu suất tách chiết thấp nhất với tỉ lệ 23,64% và hiệu suất cao chiết tổng (bộ phận trên mặt đất) là 24,44%.

Hiệu suất tách chiết tinh dầu đạt 0,32% tương đương khối lượng thu được là 4,79 ± 0,71 g/1,5 kg nguyên liệu (thể tích tinh dầu thu được 6,21 $\pm$ 0,64 ml)

3.1.2. Kết quả định tính thành phần hóa học có trong cây Kinh giới núi ở khu vực Lâm Đồng

Sử dụng các phương pháp định tính một số hợp chất thứ cấp trong thực vật, chúng tôi bước đầu đã xác định được một số nhóm hợp chất có trong cao chiết của loài kinh giới núi ở Lâm Đồng như Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả định tính các nhóm hợp chất chính có trong cây Kinh giới núi

STT	NHÓM CHẤT	KẾT QUẢ			STT	NHÓM CHẤT	KẾT QUẢ		
		Cao hoa	**Cao lá**	**Cao tổng**			**Cao hoa**	**Cao lá**	**Cao tổng**
1	Alkaloid	-	-	-	4	Tanin	+	+	+
2	Flavonoid	+	+	+	5	Saponin	+	+	+
					6	Tinh dầu	+	+	+
3	Coomarine	+	+	+	7	Glycoside Tim	+	+	+

Kết quả định tính cho thấy, cao chiết thu từ hoa, lá và cao tổng của Kinh giới núi tại khu vực Lâm Đồng có chứa các nhóm hợp chất như Flavonoid, Coumarine, Glycoside Tim, Tanin, Saponin và Tinh dầu, nhưng không ghi nhận được sự có mặt của nhóm hợp chất alkaloid trong cao chiết của tất cả các bộ phận thử nghiệm. Kết quả này của chúng tôi tương tự như kết quả nghiên cứu về của College (1985), theo công bố của College (1985) thành phần chính trong chi *Elsholtzia* có thể được chia thành các nhóm chính flavonoids, steroid, lignans, coumarin, triterpenoid. Thêm vào đó, theo các nghiên cứu trước đây của tác giả Bestman và cộng sự (1992), Dũng và cộng sự (1996) chứng minh đã cho thấy trong cây Kinh giới núi có chứa tinh dầu. Kết quả định tính thành phần hóa học trong cây Kinh giới núi ở Lâm Đồng cũng tương đồng với các kết quả đã được công bố trước đây.

3.1.3. Kết quả định lượng thành phần hóa học của tinh dầu có trong cây Kinh giới núi tại khu vực Lâm Đồng.

Tinh dầu loài Kinh giới núi thu được bằng phương pháp cất kéo hơi nước có màu vàng nhạt, trong suốt, không xuất hiện các vật chất lơ lửng; mùi tinh dầu thơm nồng, hơi gắt, có cảm giác cay sống mũi; vị đắng, cay nhẹ.

Kết quả phân tích thành phần hóa học của tinh dầu Kinh Giới núi bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ được thể hiện ở bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Thành phần hóa học của tinh dầu Kinh Giới núi phân bố tại khu vực Lâm Đồng (Phụ lục 3)

STT	RT	Tên hợp chất	Tỷ lệ
1	17,52	Camphor	25,14
2	5,63	Camphene	22,64
3	5,09	∝-Pinene	11,53
4	9,18	Cineole	9,89
5	10,87	τ-Terpinene	5,40
6	8,99	D-Limonene	3,75
7	6,55	β-Pinene	2,57
8	4,81	2-Thujene	2,40
9	23,96	Caryophyllene	2,37
10	24,87	Germacrene D	2,18
11	18,45	Endo-borneol	1,56
12	8,69	o-Cymene	1,54
13	9,38	Trans-β-ocimene	1,15
14	6,33	(+)-Sabinene	0,88
15	18,77	Terpinen-4-ol	0,79
16	12,95	Terpinolene	0,78
17	6,95	β-Myrcene	0,74
18	19,25	∝-Terpineol	0,66
19	8,29	∝-Terpinene	0,62
20	25,35	Cadina-1(10),4-diene	0,59
21	25,06	Lepidozene	0,50
22	24,50	Humulene	0,37
23	14,41	Linalool	0,32

Bảng 3 (tiếp):

STT	RT	Tên hợp chất	Tỷ lệ
24	23,24	Copaene	0,32
25	11,11	1-Phenylethanone	0,31
26	23,38	β-Bourbonene	0,28
27	10,04	Cis-ocimene	0,24
28	21,14	$\propto$-Citral	0,20
29	23,46	β-Elemene	0,15
30	5,85	Benzaldehyde	0,14
31	20,45	β- Citral	0,13

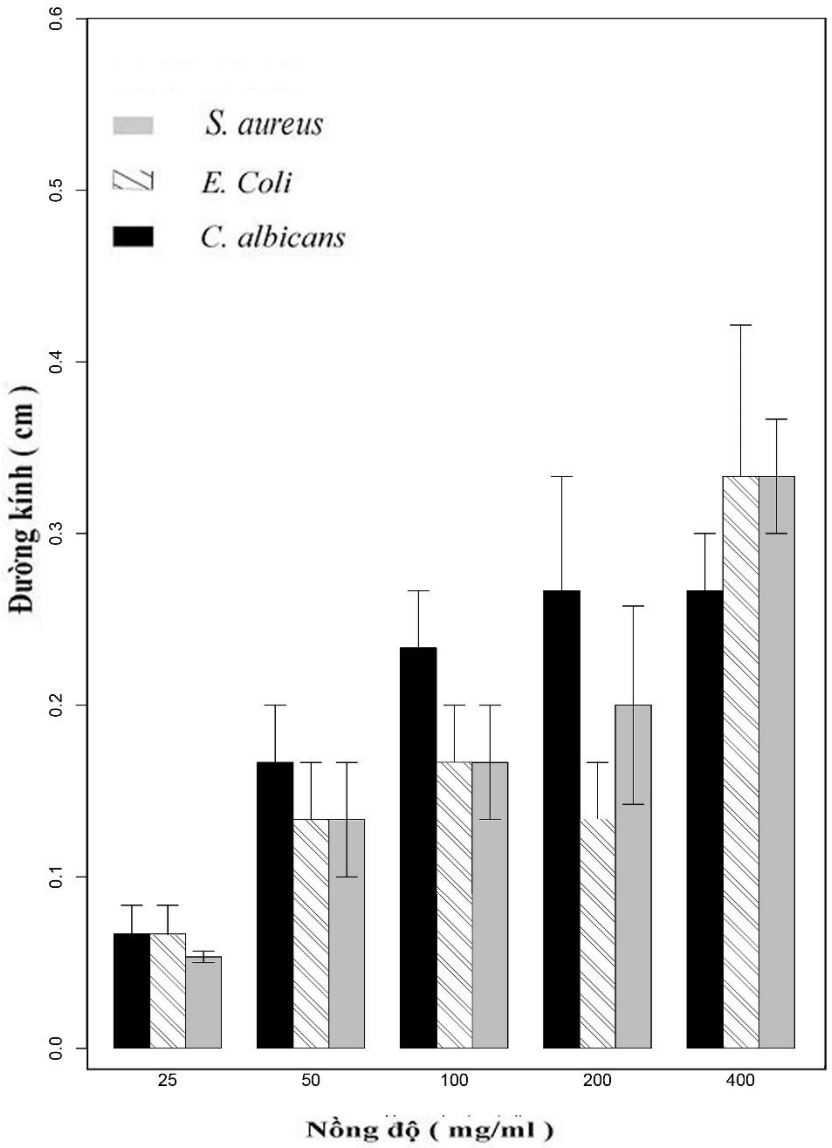
Trong đó, RT là thời gian lưu.

Tinh dầu cây Kinh Giới núi ở Lâm Đồng có 31 cấu tử khác nhau với thành phần chính gồm các chất: α-pinene (11,53%); camphene (22,64%); cineolee (9,89%); τ-terpinene (5,40%); camphor (25,14%), trong đó camphor là hợp chất chiếm tỷ lệ cao nhất với 25,14%. So sánh với kết quả nghiên cứu trước đây của Bestmann (1992), Dũng (1996), chúng tôi nhận thấy thành phần chính trong tinh dầu của loài *E.blanda* Benth. có sự khác biệt. Theo nghiên cứu của Dũng và cộng sự (1996), thành phần chính trong tinh dầu của loài Kinh giới núi ở vùng Sơn La là 1,8-cineol (62%), và ở loài Kinh giới núi phân bố ở Sa Pa, Lào Cai là 1,8-cineol (13,4% - 64%), linalool (15,5% - 18,7%), geranyl acetate (11–31,3%), và sesquiterpene (99%) và nghiên cứu của Bestmann và cộng sự (1992) ghi nhận được thành phần chính trong tinh dầu loài *E. blanda* thu thập từ Jorliat (Assam) là geranyl acetate (71%). Từ đó, có thể nhận thấy thành phần tinh dầu thu được từ loài Kinh giới núi có sự thay đổi về hàm lượng và thành phần hóa học phụ thuộc vào địa điểm phân bố của loài. Theo Saei và cộng sự (2010) thì thành phần hoá học của các một loài thực vật sẽ chịu ảnh hưởng của các yếu tố như sự phân bố ở các khu vực địa lý khác nhau, điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng khác nhau. Do đó, kết quả nghiên cứu này của chúng tôi đã cho thấy loài kinh giới núi ở Lâm Đồng có thành phần chính hoàn toàn khác so với thành phần chính của loài này phân bố ở Sa Pa và Sơn La.

3.2. Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của thành phần hóa học có trong cây Kinh giới núi

3.2.1. Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của cao chiết

Biểu đồ 1 thể hiện khả năng kháng khuẩn của cao chiết thu từ lá của cây Kinh giới ở nồng độ khác nhau (25, 50, 100, 200, 400 mg/ml).



Biểu đồ 1. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thu từ lá cây Kinh giới núi

Dựa trên biểu đồ 1, cho thấy cao lá có khả năng kháng cả ba chủng vi sinh vật thử nghiệm cụ thể:

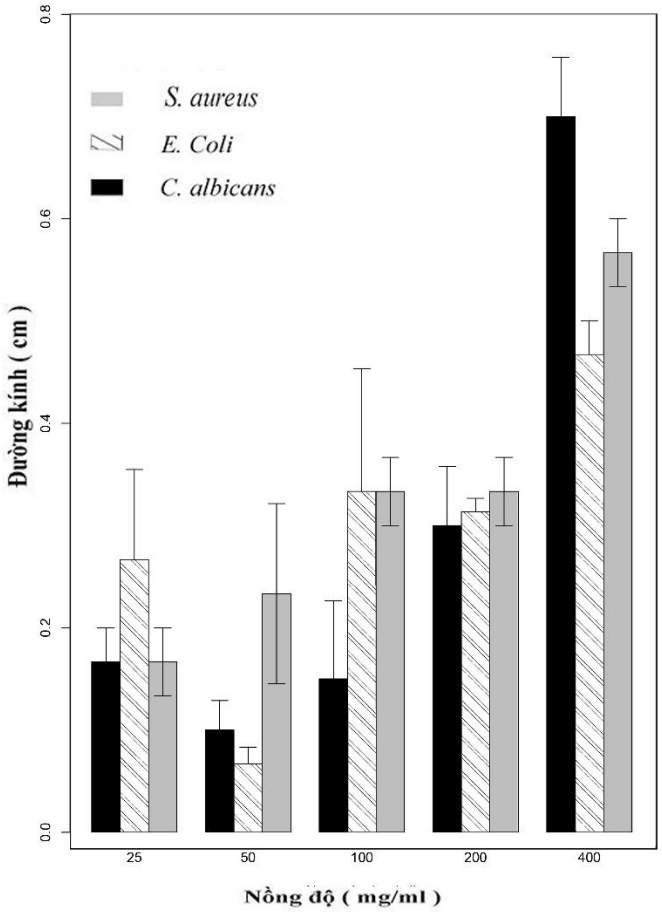
- Chủng *E. coli*: Cao lá cây Kinh giới núi kháng tốt nhất ở nồng độ 400 mg/ml (đường kính kháng khuẩn là 0,33 ± 0,15 cm) và kháng kém nhất ở nồng độ 25 mg/ml

(0,07 ± 0,03 cm). Đối với những nồng độ tương ứng là 50, 100 và 200 kết quả đường kính đo được lần lượt là 0,13 ± 0,06 cm; 0,17 ± 0,06 cm, 0,13 ± 0,06 cm. Kết quả này cho thấy ở nồng độ 50 mg/ml và nồng độ 200 mg/ml kết quả đường kính đo được như nhau và ở các nồng độ không có sự chênh lệch quá lớn. Như vậy, đối với chủng *E. coli*, khả năng kháng khuẩn của cao lá không phụ thuộc quá nhiều vào nồng độ và không có khả năng kháng tốt.

- *S. aureus*: Cao lá cây Kinh giới núi kháng tốt nhất ở nồng độ nồng độ 400 mg/ml (0,33 ± 0,06 cm) và kháng kém nhất ở nồng độ 25 mg/ml (0,03 ± 0,07 cm). Đối với những nồng độ khác 50, 100, 200 mg/ml đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 0,13 ± 0,06 cm, 0,17 ± 0,06 cm, 0,2 ± 0,1 cm. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao lá cây Kinh giới núi đối với chủng *S. aureus* có sự tăng tiến rõ ràng, tuy nhiên đường kính vòng kháng khuẩn vẫn còn rất nhỏ (< 0,5 cm) nên ở cao lá cũng không có khả năng kháng khuẩn tốt với chủng *S. aureus*.

- *C. albicans*: ở nồng độ 200 mg/ml (0,27 ± 0,06 cm) cao chiết thu từ lá Kinh giới núi có khả năng kháng tốt nhất đối với chủng này, ngược lại ở nồng độ 25 mg/ml (0,07 ± 0,03 cm) thì khả năng kháng *C. albicans* thể hiện kém nhất. Kết quả cũng chỉ ra rằng, đối với chủng *C. albicans* khả năng kháng khuẩn tăng lên rõ ràng khi tăng nồng độ cao chiết, tuy nhiên ở nồng độ 200 và 400 mg/ml cho kết quả kháng khuẩn như nhau. Như vậy, nồng độ 200 mg/ml là mức tối đa kháng của cao lá cây Kinh giới núi đối với chủng nấm này.

Biểu đồ 2 thể hiện khả năng kháng khuẩn của cao chiết thu từ hoa của cây Kinh giới ở nồng độ khác nhau (25, 50, 100, 200, 400 mg/ml).



Biểu đồ 2. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thu từ hoa cây Kinh giới núi

Kết quả ở biểu đồ 2 cho thấy, cao hoa có khả năng kháng khuẩn đối với cả 3 chủng vi sinh vật thử nghiệm, cụ thể như sau:

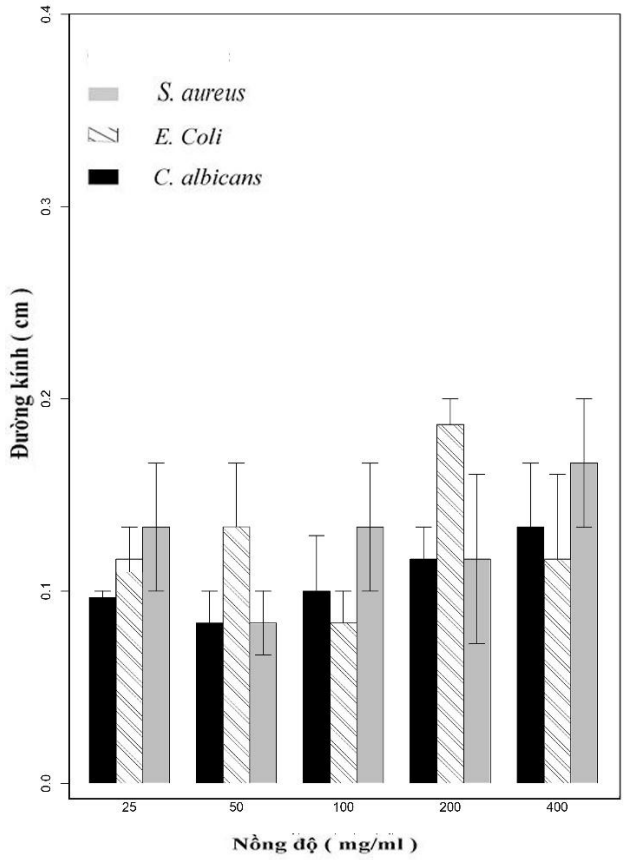
- Chủng *E. coli*: Cao hoa cây Kinh giới núi kháng tốt nhất ở nồng độ 400 mg/ml (đường kính kháng khuẩn là 0,47 ± 0,06 cm) và kháng kém nhất ở nồng độ 50 mg/ml (0,07 ± 0,03 cm). Đối với những nồng độ tương ứng là 25, 100 mg/ml và 200 mg/ml kết quả đường kính đo được lần lượt là 0,27 ± 0,15 cm, 0,33 ± 0,21 cm, 0,30 ± 0,00 cm.

- *S. aureus*: Cao hoa cây Kinh giới núi kháng tốt nhất ở nồng độ nồng độ 400 mg/ml (0,57 ± 0,06 cm) và kháng kém nhất ở nồng độ 25 mg/ml (0,17 ± 0,06 cm) đối với chủng vi sinh vật này. Khi quan sát khả năng kháng khuẩn ở những nồng độ khác bao gồm 50, 100, 200 mg/ml thì đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 0,23 ± 0,15 cm, 0,33 ± 0,06 cm, 0,33 ± 0,06 cm.

- *C. albicans*: đối với chủng vi sinh vật này thì khả năng kháng khuẩn tốt nhất thể hiện ở nồng độ 400 mg/ml (0,70 ± 0,10 cm) và kháng kém nhất ở nồng độ 50 mg/ml (0,10 ± 0,04 cm). Quan sát kết quả của vòng kháng khuẩn ở chủng này thì nhận thấy có sự khác biệt so với hai chủng *S. aureus* và *E. coli*, cụ thể là khả năng kháng khuẩn của cao hoa đối với chủng *C. albicans* diễn tiến theo đồ thị hình sin. Ban đầu ở nồng độ 25 mg/ml đường kính vòng kháng khuẩn đo được là 0,17 ± 0,06 cm nhưng ở nồng độ 50 mg/ml lại giảm còn còn 0,10 ± 0,04 cm, tới nồng độ 100, 200 và 400 mg/ml thì lần lượt tăng lại là 0,15 ± 0,13 cm, 0,30 ± 0,10 cm và 0,70 ± 0,10 cm.

Như vậy, kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao hoa Kinh giới núi đối với ba chủng vi sinh vật trên cho thấy cao chiết này có khả năng kháng tốt đối với cả ba chủng vi sinh vật này ở nồng độ 400 mg/ml.

Biểu đồ 3 thể hiện khả năng kháng khuẩn của cao chiết tổng thu từ phần trên mặt đất của cây Kinh giới ở nồng độ khác nhau (25, 50, 100, 200, 400 mg/ml).



Biểu đồ 3. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thu từ bộ phận trên mặt đất cây Kinh giới núi

Theo biểu đồ 3 cho thấy, cao tổng của cây Kinh giới núi có khả năng kháng khuẩn, cụ thể:

- Đối với chủng *E. coli* khả năng kháng khuẩn tốt nhất là ở nồng độ 200 mg/ml với đường kính vòng kháng khuẩn ghi nhận được là 0,20 ± 0,00 cm, bên cạnh đó ở nồng độ 100 mg/ml ghi nhận đường kính vòng kháng khuẩn nhỏ nhất là 0,08 ± 0,03 cm.

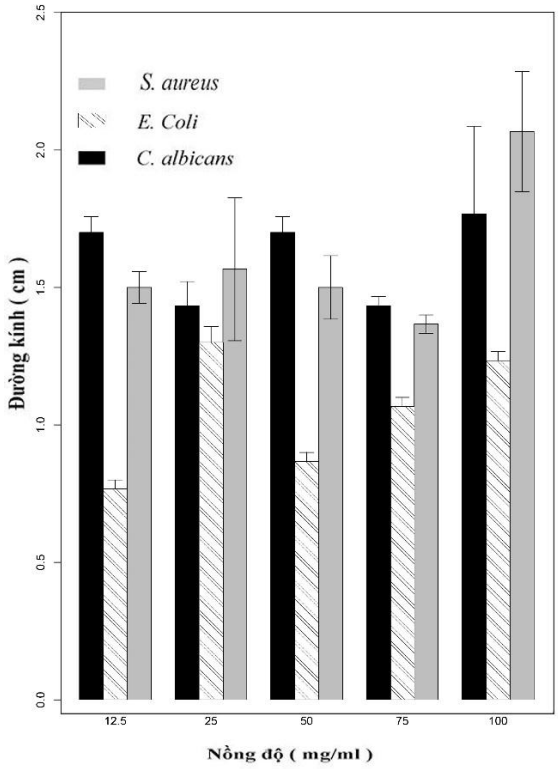
- *S. aureus*: Ghi nhận được kết quả vòng kháng khuẩn tốt nhất là 0,17 ± 0,06 cm ở nồng độ 400 mg/ml, ngược lại kết quả vòng kháng khuẩn nhỏ nhất là 0,08 ± 0,03 cm ở nồng độ 50 mg/ml.

- *C. albicans*: đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 0,13 ± 0,06 cm ở nồng độ 400 mg/ml, đường kính nhỏ nhất là 0,08 ± 0,03 cm ở nồng độ 50 mg/ml.

Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn của cao tổng thu từ cây Kinh giới núi cho thấy tính kháng khuẩn tốt nhất đối với chủng *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn ghi nhận là 0,2 ± 0,00 cm. *E. coli* là vi khuẩn gram âm, có thành peptidoglycan mỏng hơn vi khuẩn gram dương nên các cấu tử có hoạt tính sinh học dễ dàng đi vào trong tế bào ức chế sự phát triển của vi khuẩn (Lichtman và cộng sự, 1994).

3.2.2. Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của tinh dầu

Hoạt tính sinh học của tinh dầu thu từ loài Kinh giới núi được đánh giá thông qua kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của tinh dầu ở các nồng độ khác nhau lên 3 chủng vinh sinh vật là *S. aureus*, *E. coli* và *C. albicans* (Biểu đồ 4).



Biểu đồ 4. Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của tinh dầu cây Kinh giới núi

Kết quả thể hiện ở biểu đồ 4 cho thấy tinh dầu cây Kinh giới núi có khả năng kháng tốt trên ba chủng vi sinh vật được khảo sát, cụ thể:

- Đối với chủng *E. coli*, tinh dầu Kinh giới núi có khả năng kháng ở tất cả nồng độ thử nghiệm cụ thể: ở nồng độ 12,5% kết quả cho ra đường kính vòng kháng khuẩn thấp nhất với 0,76 cm ± 0,06 cm , ở nồng độ 100% kết quả cho ra đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 1,26 cm ± 0,06 cm.

- Đối với chủng *S. aureus*, tinh dầu Kinh giới núi có khả năng kháng ở tất cả nồng độ thử nghiệm. Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn thấp nhất là 1,36 ± 0,45 cm ở nồng độ 25%, tương ứng ở nồng độ 12,5% cho kết quả đường kính vòng kháng khuẩn là 1,50 ± 0,10 cm, kết quả vòng kháng khuẩn lớn nhất là 2,07 ± 0,38 cm đối với ở nồng độ 100%.

- Ở chủng nấm *C. albicans*, tinh dầu Kinh giới núi cũng có kết quả kháng tốt ở tất cả các nồng độ thí nghiệm. Ở nồng độ 25%, kết quả đường kính vòng kháng khuẩn thấp nhất là 1,06 ± 0,15 cm, tương ứng ở nồng độ 12,5% và 50% có đường kính là 1,36 ± 0,10 cm và 1,43 ± 0,2 cm. Tương tự với hai kết quả kháng khuẩn của hai chủng *E. coli* và *S. aureus*, tinh dầu Kinh giới núi có khả năng kháng khuẩn tốt nhất ở nồng độ 100% đối với chủng nấm này (1,77 ± 0,55 cm).

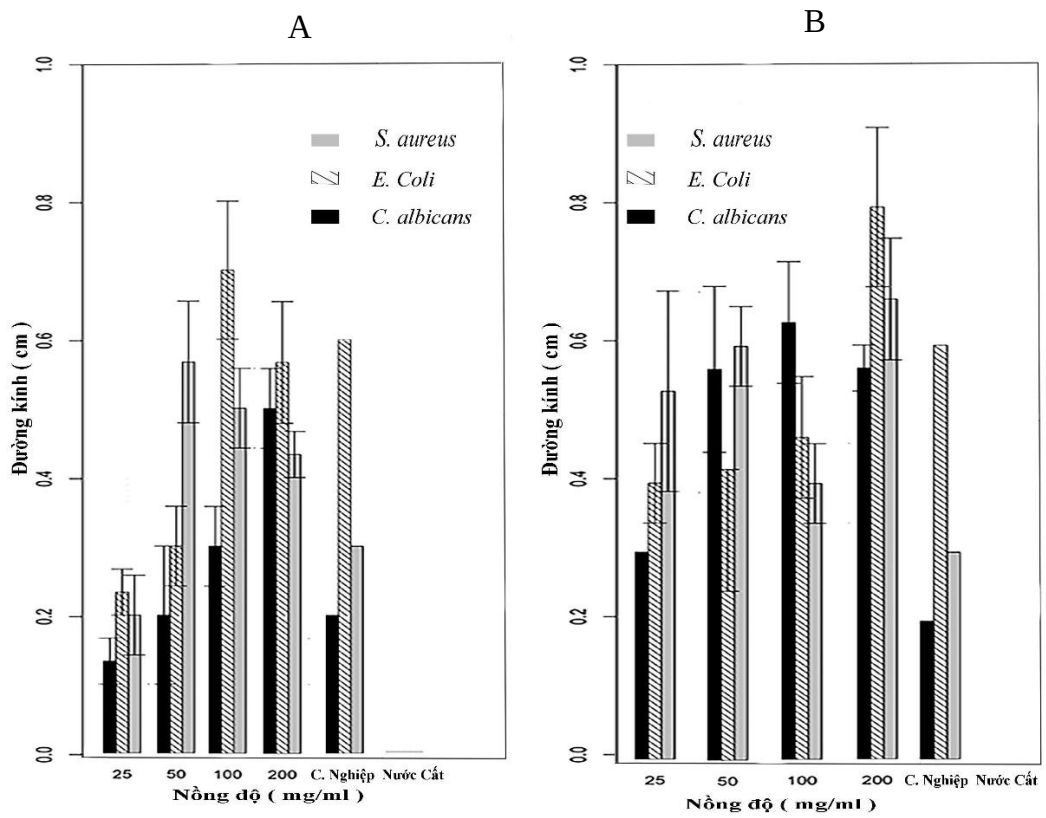
So sánh giữa đường kính vòng kháng khuẩn của tinh dầu ở các nồng độ khác nhau của cả 3 chủng vi sinh vật thử nghiệm với công bố của Billerbeck (2007) về việc phân loại kháng sinh dựa trên đường kính vòng kháng khuẩn (d<0,6 cm: kháng được; 1,3 cm>d > 0,6 cm: kháng trung bình; d>1,3 cm: kháng rất tốt) cho thấy tinh dầu Kinh giới núi ở tất cả các nồng độ đều có khả năng kháng rất tốt đối với cả 3 chủng vi sinh vật thử nghiệm.

Trên cơ sở các kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của cao chiết và của tinh dầu thu được từ loài kinh giới núi phân bố ở Lâm Đồng, chúng tôi nhận thấy hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu cây Kinh giới núi tốt hơn rất nhiều so với hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thu từ hoa, lá và bộ phận trên mặt đất của loài này, do đó chúng tôi sẽ sử dụng tinh dầu để ứng dụng trong việc bổ sung vào sản phẩm xà phòng thiên nhiên. Bên cạnh đó, tinh dầu Kinh giới núi còn có mùi thơm nồng, tính chất này cũng là một trong những yếu tố tạo mùi hương cho sản phẩm xà phòng thiên nhiên được tạo ra trong nghiên cứu này.

3.3. Kết quả tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên

Ứng dụng quy trình tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên của Quân và cộng sự (2019), trong nghiên cứu này chúng tôi đã tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên có bổ sung thêm 5% lượng tinh dầu Kinh giới núi trên 1 kg xà phòng. Từ sản phẩm xà phòng thiên nhiên tạo ra, chúng tôi đã tiến hành đánh giá các chỉ tiêu hoá lý, chỉ tiêu cảm quan và đánh giá khả năng kháng khuẩn của sản phẩm này và thu được các kết quả sau:

3.3.1. Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của xà phòng thiên nhiên



Biểu đồ 5. A. Đường kính vòng kháng khuẩn của phôi xà phòng, B. Đường kính vòng kháng khuẩn của xà phòng có bổ sung tinh dầu Kinh giới núi.

Biểu đồ 5 so sánh khả năng kháng khuẩn của xà phòng khi bổ sung tinh dầu Kinh giới núi và phôi xà phòng thiên nhiên không bổ sung tinh dầu. Kết quả khảo sát chỉ ra rằng:

- Ở nồng độ 25 mg/ml, xà phòng được bổ sung tinh dầu Kinh giới núi cho kết quả kháng tốt hơn so với phôi xà phòng. Cụ thể, đối với chủng *E. coli*, xà phòng có bổ sung tinh dầu cho kết quả đường kính vòng kháng khuẩn là 0,40 ± 0,10 cm; ở phôi xà phòng đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 0,23 ± 0,06 cm. Với chủng *S. aureus*, xà phòng có bổ sung tinh dầu cho kết quả kháng khuẩn với đường kính đo được là 0,60 ± 0,10 cm, tương ứng với phôi xà phòng là 0,20 ± 0,10 cm. Ở chủng *C. albicans*, đường kính vòng kháng khuẩn ở xà phòng có tinh dầu Kinh giới núi đạt được là 0,30 ± 0,00 cm, đối với phôi xà phòng vòng kháng khuẩn đo được có đường kính là 0,13 ± 0,06 cm

- Ở nồng độ 50 mg/ml, cả hai đều cho thấy khả năng kháng khuẩn. Cụ thể, đối với chủng *E. coli*, xà phòng có bổ sung tinh dầu cho kết quả đường kính vòng kháng khuẩn là 0,33 ± 0,15 cm; ở phôi xà phòng đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 0,30 ± 0,10 cm. Với chủng *S. aureus*, xà phòng có bổ sung tinh dầu cho kết quả kháng

khuẩn với đường kính đo được là 0,30 ± 0,10 cm, tương ứng với phôi xà phòng là 0,57 ± 0,15 cm. Ở chủng *C. albicans*, đường kính vòng kháng khuẩn đạt ở xà phòng có tinh dầu Kinh giới núi đạt được là 0,30 ± 0,00 cm đối với phôi xà phòng vòng kháng khuẩn đo được có đường kính là 0,13 ± 0,06 cm

- Ở nồng độ 100 mg/ml, đối với chủng *E. coli*, xà phòng có bổ sung tinh dầu cho kết quả đường kính vòng kháng khuẩn là 0,47 ± 0,15 cm; ở phôi xà phòng đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 0,57 ± 0,15 cm. Với chủng *S. aureus*, xà phòng có bổ sung tinh dầu cho kết quả kháng khuẩn với đường kính đo được là 0,40 ± 0,10 cm, tương ứng với phôi xà phòng là 0,50 ± 0,10 cm. Ở chủng *C. albicans*, đường kính vòng kháng khuẩn ở xà phòng có tinh dầu đạt được là 0,63 ± 0,15 cm đối với phôi xà phòng vòng kháng khuẩn đo được có đường kính là 0,30 ± 0,1- cm

- Ở nồng độ 200 mg/ml, xà phòng được bổ sung tinh dầu Kinh giới núi cho kết quả kháng tốt hơn so với phôi xà phòng. Cụ thể, đối với chủng *E. coli*, xà phòng có bổ sung tinh dầu cho kết quả đường kính vòng kháng khuẩn là 0,80 ± 0,10 cm; ở phôi xà phòng đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 0,57 ± 0,15 cm. Với chủng *S. aureus*, xà phòng có bổ sung tinh dầu cho kết quả kháng khuẩn với đường kính đo được là 0,67 ± 0,15 cm, tương ứng với phôi xà phòng là 0,43 ± 0,06 cm. Ở chủng *C. albicans*, đường kính vòng kháng khuẩn đo được ở xà phòng có tinh dầu kinh giới núi là 0,57 ± 0,06 cm, tương ứng ở phôi xà phòng là 0,50 ± 0,10 cm.

Từ kết quả nghiên cứu có thể thấy xà phòng được bổ sung tinh dầu Kinh giới núi có khả năng kháng khuẩn tốt hơn phôi xà phòng thiên nhiên không bổ sung tinh dầu và xà phòng công nghiệp. Đối với xà phòng thiên nhiên được bổ sung tinh dầu Kinh giới núi nồng độ kháng khuẩn tốt nhất trên ba chủng *E. coli*, *C. albicans* và *S. aureus* lần lượt tương ứng là 200 mg/ml, 100 mg/ml và 200 mg/ml. Như vậy, có thể sử dụng tinh dầu Kinh giới núi như là một thành phần bổ sung cho xà phòng thiên nhiên để ứng dụng trong đời sống của con người.

3.3.2. Kết quả đánh giá xà phòng

Sử dụng các phương pháp đánh giá ngoại quan và đánh giá các chỉ tiêu hoá lý theo TCVN 2224:1991, chúng tôi đã thu được các kết quả đánh giá về chất lượng của mẫu phôi

xà phòng thiên nhiên và xà phòng thiên nhiên có bổ sung tinh dầu kinh giới núi thể hiện ở bảng 4 và bảng 5.

Bảng 4. So sánh các tiêu chuẩn ngoại quan của xà phòng thiên nhiên

Chỉ tiêu	TCVN 1557:1991	
	Mẫu phôi xà phòng thiên nhiên	**Mẫu xà phòng đã phối hương liệu Cây Kinh giới núi**
Kết cấu của bánh	Chắc mịn, không có vết rạn nứt	Chắc mịn, không có vết rạn nứt
Màu	Màu trắng kem đồng đều.	Có màu nâu đặc trưng của bột Kinh giới núi khi bị kiềm hóa trong quá trình tạo sản phẩm xà phòng..
Mùi	Có mùi đặc trưng, không có mùi hôi chua của chất béo chưa phân hủy.	Có mùi thơm đặc trưng của cây Kinh giới núi, không có mùi hôi chua của chất béo chưa phân hủy.

Bảng 5. Kết quả xác định các chỉ tiêu hóa lý của xà phòng theo TCVN 2224:1991

Chỉ tiêu	Mẫu phôi xà phòng	Mẫu xà phòng đã phối cây Kinh Giới núi	TCVN 2224:1991
Hàm lượng acid béo (%)	71,974	72,195	-
Hàm lượng NaOH (%) (kiềm tự do)	0,032	0,028	< 0,05 %
Tổng hàm lượng chất hữu cơ và chất béo chưa xà phòng hóa (%)	4,054	5,964	-
Hàm lượng chất hữu cơ không xà phòng hóa (%)	0,009	1,351	<1,50
Hàm lượng chất béo không xà phòng hóa (%)	3,941	4,613	<1,00

Kết quả phân tích cảm quan cho thấy mẫu xà phòng có kết cấu bánh chắc, cứng không có vết rạn nứt. Như vậy, phôi xà phòng thiên nhiên và sản phẩm xà phòng thiên nhiên có bổ sung tinh dầu kinh giới núi đảm bảo được các tiêu chuẩn về ngoại quan theo như TCVN 2224:1991.

Các chỉ tiêu hóa lý của xà phòng <0,05%, hàm lượng chất hữu cơ không xà phòng hóa nhỏ hơn 1,50%. Hàm lượng acid béo không xà phòng hóa lớn hơn TCVN 2224:1991 (>1,00%). Chất lượng của xà phòng ngoài đánh giá thông qua khả năng sát khuẩn còn phải đánh giá cả khả năng dưỡng ẩm cho da nên lượng acid béo cần phải lấy dư so với lượng NaOH, để đảm bảo lượng acid béo còn lại trong bánh xà phòng giữ chức năng dưỡng ẩm, dưỡng da. Do đó, sản phẩm xà phòng thiên nhiên trong nghiên cứu này có hàm lượng acid béo vượt quá TCVN 2224:1991 là đạt được yêu cầu đưa ra.

Bên cạnh việc đánh giá các chỉ tiêu ngoại quan và lý hoá của xà phòng thiên nhiên có bổ sung tinh dầu kinh giới núi, chúng tôi cũng tiến hành đánh giá thị hiếu của người dùng thông qua phương pháp điều tra bảng hỏi. Lập bảng đánh giá khảo sát trên của 106 người (cả nam và nữ) độ tuổi từ 18 đến 45 về tính chất của sản phẩm chúng tôi thu được kết quả như bảng 6

Bảng 6. Kết quả khảo sát thị hiếu của người dùng đối xà phòng thiên nhiên có bổ sung tinh dầu Kinh giới núi (điểm)

Tính chất sản phẩm	Điểm
Độ cứng	**2,9**
Nồng độ mùi	**2,2**
Màu sắc	**2,1**
Khả năng làm sạch	**2,7**
Khả năng tạo bọt	**2,7**
Cảm giác sau khi rửa	**2,7**
Độ yêu thích	**2,6**

Kết quả khảo sát thị hiếu của người dùng đối với sản phẩm xà phòng thiên nhiên có bổ sung tinh dầu Kinh giới núi cho thấy tất cả các chỉ tiêu khảo sát đều được đa số người dùng đánh giá ở mức độ tốt. Tuy nhiên, chỉ tiêu về màu sắc và nồng độ mùi của xà phòng có số điểm đánh giá thấp hơn các chỉ tiêu khác nhưng vẫn ở mức tốt. Điều này có thể khắc phục được bằng cách bổ sung màu tự nhiên và tăng tỷ lệ tinh dầu phối trộn vào phôi xà phòng nếu như sau này chúng tôi ra sản phẩm để thương mại hoá.

Nói tóm lại, dựa vào các kết quả đánh giá cảm quan, kết quả phân tích các chỉ tiêu hóa lý và đánh giá thị hiếu của người sử dụng thì sản phẩm xà phòng thiên nhiên có bổ sung tinh dầu cây Kinh giới núi có chức năng làm sạch, dưỡng ẩm, dưỡng da tốt, tạo bọt tốt và đảm bảo các yếu tố thẩm mỹ và hương thơm.

CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu chúng tôi đưa ra các kết luận sau:

- Cao chiết thu từ lá loài Kinh giới núi (*E. blanda*) cho hiệu suất tách chiết tốt nhất với tỉ lệ đạt được là 24,56%, ở cao hoa cho hiệu suất tách chiết thấp nhất với tỉ lệ 23,64%. Hiệu suất tách chiết tinh dầu loài đạt 0,32% tương đương khối lượng thu được là 4,79 ± 0,71 g.

- Bước đầu định tính được thành phần hóa học của cao chiết thu từ cây Kinh giới núi phân bố ở khu vực Lâm Đồng có các nhóm hợp chất như flavonoid, coumarine, glycoside tim, tanin, saponin và tinh dầu.

- Tinh dầu Kinh giới núi tách chiết bằng phương pháp cất kéo hơi nước có màu vàng trong suốt, mùi thơm nồng, vị hơi cay. Thành phần hóa học của tinh dầu cây Kinh giới núi phân bố ở Lâm Đồng gồm có 31 hợp chất hóa học khác nhau, trong đó Camphor và Camphene là các hợp chất chiếm tỷ lệ cao nhất lần lượt là 25,14% và 22, 64%.

- Cao chiết và tinh dầu của loài Kinh giới núi (*E. blanda*) ở Lâm Đồng đều có khả năng kháng khuẩn, tuy nhiên tinh dầu có khả năng kháng khuẩn trên ba chủng *E. coli, C. albicans* và *S. aureus* tốt hơn so với cao chiết.

- Tinh dầu Kinh giới núi có thể ứng dụng để tạo mùi thơm cho sản phẩm xà phòng thiên nhiên. Sản phẩm xà phòng thiên nhiên này có khả năng kháng khuẩn trên ba chủng vi sinh vật thử nghiệm.

4.2. Kiến nghị

- Thu thập thêm mẫu tại nhiều khu vực ở Lâm Đồng và thu nhận mẫu theo từng mùa khác nhau để đánh giá hàm lượng tinh dầu cũng như thành phần hoá học của cao chiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

Bích Đ. H., Chung Đ. Q., Chương B. X., Dong N. T., Đàm Đ. T., Hiển P. V., Lộ V. N., Mai P. D., Mãn P. K., Nhu Đ. T., Tập N., Toàn T. (2003). Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1. *Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật*.

Chi V.V. (2003). Từ điển thực vật thông dụng, tập 1. *Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.*

Cục Y Tế Dự Phòng, Bộ Y Tế (2016). *http://vncdc.gov.vn/vi/danh-muc-benh-truyen-nhiem/1113/benh-do-nam-can-di-da-an-bi-cang*. Truy cập ngày 08/06/2020.

Chi V.V. (2003). Từ điển thực vật thông dụng, tập 1. *Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.*

Chính L. H (2007). Vi sinh vật y học. *Nhà xuất bản Y học*

Dung P. T. (2006), Nghiên cứu một số loài kinh giới (*Elsholtzia)* ở Sa Pa, Lào Cai. Khóa luận tốt nghiệp DS khóa 2001-2006, Đại học Dược Hà Nội, tr.31-33, tr.40-41.

Dũng, N. L., Chiến, N. Đ., & Ty, P. V. (2007). Vi sinh vật học.

Đàn, N. V., Tựu N. V. (1985) Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc. *Nhà xuất bản Y học.*

Hòa, H. Đ., & Lợi, N. V. (2017). Xác định các cấu tử hóa học và hoạt tính sinh học của tinh dầu cây Kinh giới Dày Hà Giang (*Elsholtzia winitiana* Craib). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Thái Nguyên*, *164*(04), 127-131.

Hộ P. H. (2003) Cây cỏ Việt Nam, tập 3. *Nhà xuất bản Trẻ.*

Nhàn Đ. T. T, Huyền L. T (2017). Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm và tinh dầu của cây kinh giới (*Elsholtzia ciliata (Thunb.) Hyland). Tạp chí Đại học Sư pham, Đại học Huế.*

Phúc, T. N. Đ. (2013). Staphylococcus aureus.

Phúc, T.Đ., Hương Đ. T. V., Huy, C. N. & Hương, P. T. T (2017). Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây Kinh giới ở Việt Nam. *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, *22*(3), 112.

Quân N. H, Quyên V. T. T (2019). Nghiên cứu tạo sản phẩm xà phòng tự nhiên quy mô phòng thí nghiệm. Đề tài Nghiên cứu khoa học khoa Sinh học 2018 – 2019, Đại học Đà Lạt.

Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 1557:1991. Xà phòng bánh phương pháp thử.

Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 2224:1991. Xà phòng tắm dạng bánh - yêu cầu kỹ thuật

Tuân, N. N. (2002). Vệ sinh thịt. *NXB Nông nghiệp Tp. Hồ Chí Minh*.

Thu N.V. (1990) Hóa học saponin, Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.

Tài liệu tiếng Anh

Bestmann, H. J., Rauscher, J., Vostrowsky, O., Pant, A. K., Dev, V., Parihar, R., & Mathela, C. S. (1992). Constituents of the essential oil of *Elsholtzia blanda* Benth (Labiatae). *Journal of Essential Oil Research*, 4(2), 121-124.

Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 3(2), 135-140.

Billerbeck, V. G. (2007). Essential oils and antibiotic-resistant bacteria. *Phytotherapie*, 5(5), 249.

Calderone, R. A., & Clancy, C. J. (Eds.). (2011). *Candida* and *candidiasis*. *American Society for Microbiology Press*.

Cannell, R. J. (Ed.). (1998). Natural products isolation (Vol. 4). *Springer Science & Business Media.*

Chauhan, A., Venkatesha, K. T., Padalia, R. C., Singh, V. R., Verma, R. S., & Chanotiya, C. S. (2019). Essential oil composition of leaves and inflorescences of *Elsholtzia densa* Benth. from western Himalaya. *Journal of Essential Oil Research*, 31(3), 217-222.

Chen, R., Zhou, C., & Chen, H. (2004). Chemical connstituents of *Elsholtzia bodinieri*. *Chinese traditional and herbal drugs*, 35(10), 1084-1086.

Choi, E. J., Kim, T., & Kim, G. H. (2008). Antioxidant Effects of *Elsholtzia splendens* Extract on DMB-Ainduced Oxidative Stress in Mice. *Food Science and Biotechnology*, 17(6), 1341-1344.

College, J. N. M. (1975). Dictionary of Chinese Crude Drug. *Science and Technology Press*, Shanghai, p. 1208.

College, J. N. M. (1985). The Dictionary of Traditional Chinese Medicine.

College, J. N. M. (2005) Dictionary of Chinese herbs [M]. Shanghai: Science and Technology Press, 94–2132.

Ding, C., Zhou, L., Ji, L., Ji, W., & Ma, Y. (2004). Studies on chemical constituents from tibetan medicine *Elsholtzia ianthina*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 24(6), 1093-1095.

Ditchfield, C. (2001). The Story Behind Soap. Heinemann Library.

Du, H. Q., Zhao, X., & Fang, H. J. (1989). Study on chemical constituents of essential oil from *Elsholtzia staunionii* [J]. *Med Anal J*, 9, 18-21.

Dung, N. X. N., Huy, D. Q., Khien, P. V., Moi, L. D., Cu', L.U. D., Nam, V. V., ... & Leclercq, P. A. (1996). Contribution of HRC to the study on the chemistry of natural plants, chemotaxonomy, and biodiversity conservation. *Journal of High Resolution Chromatography*, 18(9), 603-606.

Fang, H., Duan, H., Xu, Y., & Zhou, T. (1993). Studies on the Chemical Components of Essential Oil of *Elsholtzia blanda*. *Chinese journal of Chromatography* ,11, 69-69.

Fu, L. Z., Li, H. Z., & Li, R. T. (2010). Constituent Analysis of Two *Elsholtzia Volatile* Oils [J]. *Journal of Kunming University of Science and Technology* (Science and Technology), 1.

Gao, Y. T., Li, L., Dai, J. H., Bei, Y. X., & Guo, Y. (2009). Extraction of flavonoid from Chinese materia medics by ultrasonic extraction coupling with propyl-alcohol ammonium sulfate aqueous two-phase separation and its antioxidation of extractives. *Chin Pharm J*, 44(44), 736-739.

Gong, M. X. (1997). Research progress of *Elsholtzia splendens* on pharmacology. *Beijing Med*, 6, 46-48.

Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Berg, J. V., Hu, J., Messer, S., ... & Diekema, D. (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases*, 37(9), 1172-1177.

Guo, Z. Q., Lv, H. N., Chen, Q. L., & She, G. M. (2010). DPPH and ABTS radical scavenging capacity of *Elsholtzia rugulosa*. *Chin J Experim Trad Med Formulae*, 16, 180-183.

Guo, Z., Liu, Z., Wang, X., Liu, W., Jiang, R., Cheng, R., & She, G. (2012). *Elsholtzia: phytochemistry and biological activities*. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 1-8.

Haiyun, L., Yijia, L., Honggang, L., & Honghai, W. (2004). Protective effect of total flavones from *Elsholtzia blanda* (TFEB) on myocardial ischemia induced by coronary occlusion in canines. *Journal of ethnopharmacology*, 94(1), 101-107.

He, F., Shi, X., Li, H., Tian, Y., Su, W., Chen, J., & Zhao, Y. (1995). Studies on the chemical components of essential oils of *Elsholtzia patrini* Garcke. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 15(5), 20-22.

Hen, L. (1979). Flora reipublicae popularis sinicae. Inst Bot Kummingense Acad Sin, 13, 1-12.

Hu, H. B., Cao, H., Jian, Y. F., & Zheng, X. D. (2007). Study on extraction and antibacterial activity of active constituents of *Elshoitzia cilia* a Hyland. *Pratacul Tural Science*, 24, 36-39.

Hu, H. B., Jian, Y. F., Cao, H., & Zheng, X. D. (2007). Phenolic compounds from *Elsholtzia bodinieri* van't. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 54(5), 1189-1194.

Hu, H. B., Zheng, X. D., Hu, H. S., & Zhang, Y. Q. (2006). Studies on chemical constituents from *Elsholtzia bodinieri* vaniot (I) in Gansu. *China. J Baoji Univ Arts Sci* (Nat Sci), 26, 196-199.

Hu, H., & Zheng, X. (2006). Study on extraction, separation and antimicrobial activity of volatile oil from *Elsholtzia rugulosa*. *Chinese Journal Of Hospital Pharmacy*, 26(1), 14.

Huang, B. D., Zheng, S. Z., & Shen, X. W. (2004). Study on oil constituents of *Elsholtzia rugulosa* by means of supercritical fluid CO2 extract [J]. *Acta Lanzhou Med Coll*, 30, 34-37.

Isobe, T., & Noda, Y. (1992). Studies of the chemical constituents of *Elsholtzia* herb. Nippon kagaku kaishi (1972), (4), 423-425.

Jiang, L., Yao, Q., & Xie, Y. (2009). Study on chemical constituents of Sonchus arvensis L. *Food and Drug*, 11(3), 27-29.

Kabir, M. A., Hussain, M. A., & Ahmad, Z. (2012). *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. ISRN microbiology, 2012.

Kang, S., Li, L., Wang, Y., & Zheng, S. (2004). Flavones from *Elsholtzia stauntonii*.

Kim, D. W., Son, K. H., Chang, H. W., Bae, K., Kang, S. S., & Kim, H. P. (2003). Anti-inflammatory activity of *Elsholtzia splendens*. *Archives of pharmacal research*, 26(3), 232.

Kim, S. S., Oh, H. J., Baik, J. S., Oh, T. H., Yun, P. Y., Kim, C. S., ... & Hyun, C. G. (2008). Chemical composition and biological activities of *Elsholtzia splendens* essential oil. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 51(2), 69-72.

Klein, H. P. (1978). The Viking biological experiments on Mars. Icarus, 34(3), 666-674.

Kotoky, R., Saikia, S. P., Chaliha, B., & Nath, S. C. (2017). Chemical compositions of the essential oils of inflorescence and vegetative aerial parts of *Elsholtzia blanda* (Benth.) Benth. (Lamiales: Lamiaceae) from Meghalaya, North-East India. Brazilian Journal of Biological Sciences, 4(7), 19-23.

Lai, G. F., Zhu, X. D., Luo, S. D., & Wang, Y. F. (2008). Chemical constituents from *Elsholtzia rugulosa. Chin Trad Herbal Drugs*, 39, 661-664.

Lalramnghinglova, H. (2003). Ethno-Medicinal Plants of Mizoram. Bis Raven Singh Mahendra Pal Singh, Dehra Dun, Uttrakhand, India. pp. 175–176.

Lee, J. S., Kim, G. H., & Lee, H. G. (2010). Characteristics and antioxidant activity of *Elsholtzia splendens* extract-loaded nanoparticles. Journal of agricultural and food chemistry, 58(6), 3316-3321.

Li, H., Nakashima, T., Tanaka, T., Zhang, Y. J., Yang, C. R., & Kouno, I. (2008). Two new maltol glycosides and cyanogenic glycosides from *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. Journal of natural medicines, 62(1), 75-78

Li, R. T., Li, J. T., Wang, J. K., Han, Q. B., Zhu, Z. Y., & Sun, H. D. (2005). Two New E‐Secoursane Glycosides: Bodiniosides A and B, Isolated from *Elsholtzia bodinieri*. Helvetica chimica acta, 88(2), 252-258.

Lichtman, S. N., Wang, J., Schwab, J. H., & Lemasters, J. J. (1994). Comparison of peptidoglycan‐polysaccharide and lipopolysaccharide stimulation of Kupffer cells to produce tumor necrosis factor and interleukin‐1. *Hepatology*, 19(4), 1013-1022.

Ling, H., & Lou, Y. (2005). Total flavones from *Elsholtzia blanda* reduce infarct size during acute myocardial ischemia by inhibiting myocardial apoptosis in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 101(1-3), 169-175.

Liu, A. L., Liu, B., Qin, H. L., Lee, S. M. Y., Wang, Y. T., & Du, G. H. (2008). Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa*. Planta medica, 74(08), 847-851.

Liu, A., Lee, S. M., Wang, Y., & Du, G. (2007). *Elsholtzia*: review of traditional uses, chemistry and pharmacology. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 16(2), 73.

Liu, Y., Li, X. F., Liu, A. L., Li, Z. H., Du, G. H., & Qin, H. L. (2009). Chemical constituents from leaves of *Elsholtzia rugulosa.* Chin Trad Herbal Drugs, 40, 1356-1359.

Lu, J., Shen, T., Guo, Z., Shen, X., & Zheng, S. (2001). The chemical constituents of *Elsholtzia blanda*. Acta Botanica Sinica, 43(5), 545-550.

Mabry, T. J. (1970). k. R. Markham and MB Thomas. The systematic identification of flavonoïds.

Meiller, T. F., Hube, B., Schild, L., Shirtliff, M. E., Scheper, M. A., Winkler, R., ... & Jabra-Rizk, M. A. (2009). A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. PloS one, 4(4), e5039.

Meyer-Warnod, B. (1984). Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfumer & flavorist*, 9(2), 93-104.)

Mu, Y. L., Hu, Z. L., Zhou, L., Zhang, Q., Wang, X. J., & Xie, Y. Y. (2009). Protective effects of luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside on neonatal rat cardiomyocytes injury induced by H_2O_2 [J]. *Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine*, 1.

Nugroho, A., Park, J. H., Choi, J. S., Park, K. S., Hong, J. P., & Park, H. J. (2019). Structure determination and quantification of a new flavones glycoside with anti-acetylcholinesterase activity from the herbs of *Elsholtzia ciliata. Natural product research*, 33(6), 814-821.

Odds, F. C. (1988). *Candida* and *candidosis*: a review and bibliography. Bailliere Tindall.

Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clinical microbiology reviews, 20(1), 133-163.

Phetsang, S., Panyakaew, J., Wangkarn, S., Chandet, N., Inta, A., Kittiwachana, S., ... & Mungkornasawakul, P. (2019). Chemical diversity and anti-acne inducing bacterial potentials of essential oils from selected *Elsholtzia* species. *Natural product research*, 33(4), 553-556.

Rana, V. S., Devi, L. R., Verdeguer, M., & Blazquez, M. A. (2012). *Elsholtzia blanda* Benth.: new citral-rich chemotypes from India. Journal of herbs, spices & medicinal plants, 18(2), 132-139.

Raven, P., & Hong, D. (1994). Flora of China.

Ren, P., Shen, X., & Zheng, S. (2002). Studies on the chemical components and applicant of essential oils of *Elsholtzia blanda* Benth. *Journal of Northwest Normal University* (Natural Science), 38(3), 58-60.

Roper, Sabine & Elisabeth (2014). Basic Soap Making: A guide to make your own soaps. Center for Children in Need.

Ruhnke, M. (2002). Skin and mucous membrane infections. *Candida* and *candidiasi*s. ASM Press, Washington, DC, 307-325.

Saei -Dehkordi, S. S., Tajik, H., Moradi, M., & Khalighi-Sigaroodi, F. (2010). Chemical composition of essential oils in Zataria multiflora Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and chemical toxicology*, 48(6), 1562-1567.

Schelenz, S. (2008). Management of candidiasis in the intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(suppl_1), i31-i34.

Schulze, J., & Sonnenborn, U. (2009). Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. Deutsches Ärzteblatt International, 106(51-52), 837.

Scott E. M., John J. I., Harvey, J., Gilmour, A., Sita R. T., Reginald Bennett and Bergdoll, M.S. (2000), S*taphylococcus*. Encyclopedia of Food Microbiology, Academic Press, San Diego - San Francisco - New Yolk – Boston – London – Sydney - Tokyo. p.2062-2083

Shang-zhen, Z., Xiu-rong, L., Xu-wei, S., & Xin-fu, P. (1992). Studies on the Chemical Constituents of *Elsholtzia eriostachya* Benth. *Journal of Integrative Plant Biology*, 34(9).

Shi, X. F., He, F. J., & Yu, Y. (1994). Study on chemical constituents of essential oil from *Elshotzia ciliate* (Thunb.) Hyland [J]. Gansu Med, 13, 152-153.

Simmons, W.H. & Appleton, H.A. (2007). The Handbook of Soap Manufacture. A Public Domain Book.

Sobel, J. D. (1997). Vaginitis. New England Journal of Medicine, 337(26), 1896-1903.

Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. Polytechnisches J, 232, 461-465.

Spitz & Luis (1990). Soap Technologies in the 1990s. *American Oil Chemists Society*.

Steffan, P., Vazquez, J. A., Boikov, D., Xu, C., Sobel, J. D., & Akins, R. A. (1997). Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(8), 2031-2039.

Thomssen, E.G. (1992). Soap Making Manual. New York D. Van Nostrand Company.

Wey, S. B., Mori, M., Pfaller, M. A., Woolson, R. F., & Wenzel, R. P. (1988). Hospital-acquired candidemia: the attributable mortality and excess length of stay. *Archives of internal medicine*, 148(12), 2642-2645.

Yang, Y. B., Liu, S. Q., Wang, B. D., Zhu, C., Zhu, D. Y., Kong, X. M., & Yang, Y. Q. (1997). Studies on diterpenoid in *Rabdosia phyllopodia* (Labictae). Chin J Appl Environ Biol, 3, 79-81.

Zhang, J. C., Liu, W., Yan, H. P., Li, Y., & Xue, C. L. (2007). Study on antioxidant activity of *Elsholtzia bodinieri* Vaniot and determination of microelements. *Food Sci Technol*, 4, 206-207.

Zhang, L. W., Shi, Y. S., Zhang, Y. S. (1999). Study on the main constituents of essential oil of *Mosla chinensis* [J]. J *Chin Med Mater*, 30, 42-43.

Zhang, W.L., Du, J., (1999). Separation and evaluation of flavonoid glycosides from *Elsholtzia blanda* benth. *China Journal of Chinese Materia Medica* 24, 96–98.

Zhang, Y., Liu, H., & Zhu, W. (2002). Advances in the study of *Elsholtzia splendens*. Zhong yao cai =Zhongyaocai= *Journal of Chinese medicinal materials*, 25(2), 146-147.

Zhao, D., Yang, Y., Zhang, W., Liu, X., Zhai, C., & Wang, H. (2005). Studies on chemical constituents from *Elsholtzia bodinieri* Vaniot. Zhong yao cai= Zhongyaocai= *Journal of Chinese medicinal materials*, 28(2), 94-96.

Zheng, F. M., Yao, T. W., & Zeng, S. (2005). Analysis of luteolin in *Elsholtzia blanda* Benth. by RP-HPLC. Die Pharmazie-An *International Journal of Pharmaceutical Science*s, 60(9), 648-649.

Zheng, S. Z., Limao, C. R., Dai, R., Kang, S. H., Ren, P., & Shen, X. W. (2001). Composition of *Elsholtzia stauntonii* essential oil prepared by steam distillation and supercritical CO2 fluid extraction. J Northwest Norm Univ (Nat Sci), 37(3), 37-40.

Zheng, S., Lu, J., Shen, T., Liu, H., & Shen, X. (2001). New C-methylated flavones from *Elsholtzia blanda* Benth.

Zhu, G. P., & Zhou, W. S. (1989). Study on chemical constituent of essential oil from *Elsholtzia rugulosa* Hemsl [J]. Chin Med Abs, 11, 33-35.

Zuo, G. Y., Wang, G. C., Zhao, Y. B., Xu, G. L., Hao, X. Y., Han, J., & Zhao, Q. (2008). Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of ethnopharmacology*, 120(2), 287-290.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Tiêu chuẩn Việt Nam 1557:1991

TCVN 1557:1991

Xà phòng bánh - Phương pháp thử

Đánh giá chỉ tiêu cảm quan:

Dùng dao cắt đôi bánh xà phòng quan sát xem bánh có đều đặn, bở, vết rạn nứt, độ đều màu và có bị phân lớp hay không. Mùi của xà phòng được xác định ngay sau khi cắt hoặc xoa vào lòng bàn tay rồi tiến hành ngửi để đánh giá. Có thể đem làm nóng xà phòng cho đến khi xà phòng tan chảy ra rồi bắt đầu ngửi để đánh giá.

Xác định bằng phương pháp cảm quan bằng cách dùng các từ thích hợp như: trắng kem, trắng, hơi vàng ....

Đối với mẫu có dùng màu tự nhiên: sử dụng phương pháp đánh giá cảm quan bằng cách so sánh màu của xà phòng với màu tự nhiên trước khi được phối vào màu của xà phòng.

Đánh giá chỉ tiêu hóa lý:

- Xác định hàm lượng acid béo:

Nguyên tắc: Dùng acid vô cơ mạnh để phân hủy xà phòng và giải phóng các acid béo và muối. Tách các acid béo bằng dung môi hữu cơ, sấy và cân.

Tiến hành: Cân khoảng 5g xà phòng với độ chính xác đến 0,001g hòa tan lượng cân vào 60ml nước cất ở 80 – 90^{o}C, làm nguội dung dịch đến khoảng 40^{o}C thêm 5 giọt chỉ thị metyl da cam, dùng dung dịch axit clohidric 20% trung hòa đến khi toàn bộ dung dịch có màu hồng.

Chuyển dung dịch trên vào chiết số 1, thêm vào phễu 50ml ete etylic.

Tráng cốc bốn lần, hai lần dùng nước cất, mỗi lần 25ml, một lần axit clohiđric 20% (5ml) và cuối cùng dùng 25ml ete etylic để tráng, và ete sau mỗi lần tráng đều cho vào phễu chiết số 1. Lắc nhẹ lượng chứa trong phễu chiết số 1 bằng cách quay tròn, để yên phễu chiết cho phân làm hai lớp. Tháo lớp nước ở dưới vào phễu chiết số 2.

Thêm 15ml ete etylic vào phễu chiết số 2, và cũng xử lý như trên. Tháo lớp nước ở dưới vào phễu số 3. Chuyển phần ete ở phễu chiết số 2 sang phễu chiết số 1,

dùng ete etylic (khoảng 15ml) tráng sạch phễu chiết số 2, chuyển sang phễu chiết số 3 và tiếp tục chiết như trên. Phần ete ở phễu chiết số 3 cũng gộp chung vào phễu số 1. Dùng 20ml ete etylic tráng sạch phễu chiết số 3 và góp vào phễu chiết số 1.

Rửa phần ete ở phễu chiết số 1 có chứa axit béo bằng dung dịch natri clorua 10% cho đến phản ứng trung bình (thử với metyla da cam).

Sau đó, lọc phần ete đã rửa qua giấy lọc, có khoảng 5g natri sunfat khan vào bình cầu đã cân. Dùng ete etylic rửa sạch phễu chiết số 1 và giấy lọc. Cất thu hồi ete etylic trên bếp cách thủy. Sau khi cất thu hồi ete, đem sấy bình cầu ở 70^0C. Sau đó, lấy ra làm nguội trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng. Đem cân bình cầu có chứa các axit béo với độ chính xác đến 0,001g.

Quá trình sấy kết thúc, nếu hiệu số khối lượng giữa hai lần cân không chênh lệch quá 0,002g.

Hàm lượng các axit béo (X_1) tính bằng phần trăm theo công thức:

$X_1=F.\frac{m_{1.100}}{m}$

trong đó:

F- tỷ số khối lượng trung bình của bánh xà phòng với khối lượng danh nghĩa của bánh xà phòng;

m_1-khối lượng các acid béo sau khi sấy (g);

m- khối lượng mẫu đem phân tích (g).

- Xác định hàm lượng natri hidroxit (kiềm tự do):

Mục đích: Phương pháp này nhằm xác định hàm lượng NaOH dư trong quá trình xà phòng hóa tạo ra xà phòng.

Nguyên tắc: Dùng dung dịch acid clohidric đã biết nồng độ để chuẩn lượng kiềm tự do trong mẫu với chỉ thị phenolphtalein.

Tiến hành: Cân khoảng 5g xà phòng với độ chính xác đến 0,001g trong bình nón, thêm vào 100ml ethanol 75% (cồn đã được trung hòa bằng dung dịch natri hiđroxit 0,001N với chỉ thị fenolftalein).

Nối bình nón với ống làm lạnh hồi lưu, đun trên bếp cách thủy cho đến khi tan hết xà phòng, sau đó thêm vào bình nón 25ml dung dịch bari clorua 10% và tiếp tục đun nhẹ.

Không lọc kết tủa, vừa lắc, vừa dùng dung dịch axit clohiđric 0,1N chuẩn với chỉ thị phenolphtalein đến chuyển màu.

Hàm lượng natri hiđroxit (kiềm tự do), X_2 tính bằng phần trăm theo công thức:

$$X_2 = F. \frac{V.K.0,004.100}{m}$$

Trong đó:

F - Tỷ số khối lượng trung bình của bánh xà phòng với khối lượng danh nghĩa của bánh xà phòng;

V (ml) - Lượng acid HCl 0.1N tiêu tốn trong quá trình chuẩn độ.

0,004 - Lượng natri hiđroxit (kiềm tự do) tương ứng với 1ml dung dịch axit clohiđric 0,1N (g).

m (g): Khối lượng mẫu đem phân tích.

Xác định tổng hàm lượng các chất hữu cơ và chất béo chưa xà phòng hóa

Nguyên tắc: Dùng ete petrola tách các chất hữu cơ và các chất béo không bị xà phòng hóa trong xà phòng, sấy và cân.

Tiến hành: Cân khoảng 5g xà phòng với độ chính xác đến 0,001g. Hòa tan mẫu vào 100 ml ethanol 60%, chuyển toàn bộ dung dịch vào phễu chiết số 1. Dùng e thanol 60% tráng cốc, đổ dung dịch và phễu chiết số 1 và thêm vao phễu 150ml ete petrola, lắc mạnh trong 1 phút, để yên sau khi tách lớp, tháo lớp nước phía dưới vào phễu số 2 và xử lý tiếp với 50ml ete petrola nữa. Sa khi tách lớp dưới, chuyển phần ete petrola vào phếu chiết só 1. Dùng nước cất rửa phần ete petrola trong phếu cho đến khi sạch xà phòng (nước rửa đem pha loãng và đun nóng nếu không xuất hiện màu hồng với chỉ thị phenolphtalein là được).

Lọc phân ete petrola sau khi rửa qua phễu có 5g natri sunfat khan vào bình cầu ở nhiệt độ 73-75^{0}C cho đến khối lượng không đổi.

Quá trinh sấy kết thúc nếu hiệu số khối lượng giữa hai lần cân liên tiếp không vượt quá 0,002g.

Tổng hàm lượng các chất hữu cơ có trong xà phòng không bị xà phòng hóa và các chất béo chưa xà phòng hóa so với hàm lượng acid béo trong bánh xà phòng (X_3), tính bằng phần tăm theo công thức:

$$X_3 = \frac{m_{1.100}}{m.X_1}$$

Trong đó:

m_1 (g): Lượng cân còn lại trong bình cầu sau khi sấy.

m (g): Khối lượng mẫu đem phân tích.

X_1: Hàm lượng acid béo.

Xác định hàm lượng các chất béo chưa xà phòng hóa:

Tiến hành: Hòa cặn ở X_3 vào 25ml dung dịch kali hidroxit 0,5N trong cồn. Nối bình cầu với ống làm lạnh hồi lưu, đem đun cách thủy 1 giờ. Chuyển dung dịch xà phòng thu được vào phếu chiết số 1. Quay tròn phễu chiết nhiều lần, để yên cho dung dịch phân làm 2 lớp, tháo lớp dưới sang phếu số 2 và xử lý với 25ml ete petrola. Khi đã phân làm hai lớp dưới, chuyển phần ete petrola sang phễu chiết số 1. Chuyển hết phần ete petrola thu được ở phễu chiết số 1 vào bình cẫu đã biết khối lượng, đem cất thu hồi ete petrola trên bếp cách thủy. Sau đó, sấy trong tủ sấy ở nhiển độ 73-75^{0}C cho đến khi khối lượng không đổi.

Hàm lượng các chất hữu cơ không bị xà phòng hóa so với acid béo trong bánh xà phòng X_4, tính theo công thức:

$$X_4 = \frac{m_1.100}{m.X_1}$$

Trong đó:

m_1 (g): Lượng cân còn lại trong bình cầu sau khi sấy.

m (g): Lượng mẫu đem phân tích.

X_1: Hàm lượng acid béo.

Xác định hàm lượng chất béo chưa xà phòng hóa:

Hàm lượng các chất béo chưa xà phòng hóa so với xà phòng hóa X_5 tính bằng phần trăm theo công thức:

$X_5 = X_3 – X_4$

Trong đó X_3 và X_4 được xác định ở mục trên.

Phụ lục 2: Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 2224:1991

TCVN 2224:1991

Xà phòng tắm dạng bánh – Yêu cầu kỹ thuật

Tiêu chuẩn áp dụng cho các loại xà phòng tắm dạng bánh, được sản xuất từ dầu thực vật, mỡ động vật và các loại acid béo tổng hợp.

1. Yêu cầu kỹ thuật

1.1. Các chỉ tiêu ngoại quan của bánh xà phòng tắm phải theo đúng các yêu cầu quy định trong bảng 1

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Kết cấu bánh	Chắc, mịn, không có vết rạn nứt
2. Màu	Tươi sáng, đồng nhất và tương ứng với màu đã quy định
3. Mùi	Có mùi thơm dễ chịu, đặc trưng theo từng sản phẩm, không có mùi hôi, chua của mỡ bị phân hủy

1.2. Các chỉ tiêu hóa lý của của xà phòng bánh phải theo đúng các mức quy định trong bảng 2

Tên chỉ tiêu	Loại 77% P.A	Loại 80% P.A
1. Khối lượng danh nghĩa của một bánh xà phòng, tính bằng gram.	10; 25; 50	75; 100
2. Hàm lượng acid béo, tính bằng % so với khối lượng danh nghĩa	75 ± 1,5	80 ± 1,0
3. Hàm lượng natri hidroxit, tính bằng % so với khối lượng danh nghĩa không lớn hơn.	0,05	

4. Hàm lượng các chất béo chưa xà phòng hóa, tính bằng % so với khối lượng acid béo, không lớn hơn.	1.00
5. Hàm lượng các chất hữu cơ không xà phòng hóa, tính bằng % so với khối lượng acid béo, không lớn hơn	1.50

Phụ lục 3: Bảng phân tích thành phần hóa học tinh dầu.

CASE

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TP. HỒ CHÍ MINH
TRUNG TÂM DỊCH VỤ PHÂN TÍCH THÍ NGHIỆM TP. HỒ CHÍ MINH
CENTER OF ANALYTICAL SERVICES AND EXPERIMENTATION HCMC

VIMCERTS 147

Mã số mẫu/ Sample Code BN19081047 MM19083111	**KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM** *TEST REPORT*	BMKD 03/1 – LBH 00 Ngày/Date : 28/08/2019

Tên khách hàng/ *Customer* : **ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT**
Địa chỉ/ *Address* : 01 PHÙ ĐỔNG THIÊN VƯƠNG - TP. ĐÀ LẠT - TỈNH LÂM ĐỒNG
Tên mẫu/ *Name of sample* : **TINH DẦU ELSHOLTZEASP**
Số lượng/ *Quantity* : 1
Tình trạng mẫu/ *Sample description* : Dạng lỏng
Ngày nhận mẫu/ *Date of receiving* : 19/08/2019
Ngày hẹn trả KH/ *Date of issue* : 28/08/2019

STT/ *No*	Chỉ tiêu kiểm nghiệm/ *Parameters*	Đơn vị tính/ *Unit*	Kết quả/ *Result*	Phương pháp/ *Test method*
1	Định tính thành phần	%	Xem bảng kết quả đính kèm.	CASE.NC.0075

(*) Phương pháp được VILAS công nhận / *Method is accreditated by VILAS*
(**) Kết quả được thực hiện bởi nhà thầu phụ / *Subcontracted test.*

Phụ trách phòng thử nghiệm/
Officer in charge of laboratory

Th.S Nguyễn Hoàng Ngọc Hân

TL.GIÁM ĐỐC/ PP.DIRECTOR
TRƯỞNG PHÒNG/ HEAD OF DIVISION

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
TRUNG TÂM DỊCH VỤ PHÂN TÍCH THÍ NGHIỆM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Lý Tuấn Kiệt

1/Thông tin về mẫu được ghi theo yêu cầu khách hàng/ *Information of sample is written as customer's request.*
2/ Không được sao chép kết quả này, 1 phần hay toàn bộ, nếu không được sự đồng ý bằng văn bản của Giám Đốc Trung Tâm Dịch Vụ Phân Tích Thí Nghiệm TP.HCM
This above result shall not reproduced, partly or fully, unless written approval of Director of CASE.
3/ Kết quả phân tích chỉ có giá trị trên mẫu thử/ *The testing result is only valid on tested sample.*

TRỤ SỞ CHÍNH
Đ: 02 Nguyễn Văn Thủ, P. Đa Kao, Q. 1, TP. HCM
N: 1800 1105
T: (84 28) 391 7216
E: case@hcm@case.vn

CN CẦN THƠ
Đ: F267 - F268 Đường số 6, KDC 586, P. Phú Thứ, Cái Răng, Cần Thơ
T: (84 292) 3918216 - 217 - 218
F: (84 292) 3918219
E: support@case.com.vn

VP ĐẠI DIỆN MIỀN TRUNG
Đ: STH278, Đường 8E, KĐT Lê Hồng Phong II, P. Phước Hải, Nha Trang, Khánh Hòa
N: (84 258) 246 5255
F: (84 258) 246 5355
E: vanphongdaidienmientrung@case.vn

CASE
SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TP. HỒ CHÍ MINH
TRUNG TÂM DỊCH VỤ PHÂN TÍCH THÍ NGHIỆM TP. HỒ CHÍ MINH
CENTER OF ANALYTICAL SERVICES AND EXPERIMENTATION HCMC

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM/ *TEST REPORT*

P_19081047/ MM19083111

STT/*No.*	RT	TÊN/*NAME*	%
1	4.81	2-Thujene	2.40
2	5.09	α-Pinene	11.53
3	5.63	Camphene	22.64
4	5.85	Benzaldehyde	0.14
5	6.33	(+)-Sabinene	0.88
6	6.55	β-Pinene	2.57
7	6.95	β-Myrcene	0.74
8	8.29	α-Terpinene	0.62
9	8.69	o-Cymene	1.45
10	8.99	D-Limonene	3.75
11	9.18	Cineole	9.89
12	9.38	Trans-β-ocimene	1.15
13	10.04	Cis-ocimene	0.24
14	10.87	τ-Terpinene	5.40
15	11.11	1-Phenylethanone	0.31
16	12.95	Terpinolene	0.78
17	14.41	Linalool	0.32
18	17.52	Camphor	25.14
19	18.45	Endo-borneol	1.56
20	18.77	Terpinen-4-ol	0.79
21	19.25	α-Terpineol	0.66
22	20.45	β-Citral	0.13
23	21.14	α-Citral	0.20
24	23.24	Copaene	0.32
25	23.38	β-Bourbonene	0.28
26	23.46	β-Elemene	0.15
27	23.96	Caryophyllene	2.37
28	24.50	Humulene	0.37
29	24.87	Germacrene D	2.18
30	25.06	Lepidozene	0.50
31	25.35	Cadina-1(10),4-diene	0.59

---KẾT THÚC/ *FINISH*---

1/ Thông tin về mẫu được ghi theo yêu cầu khách hàng/ *Information of sample is written as customer's request*
2/ Không được sao chép kết quả này, 1 phần hay toàn bộ, nếu không được sự đồng ý bằng văn bản của Giám Đốc Trung Tâm Dịch Vụ Phân Tích Thí Nghiệm TPHCM
This above result shall not reproduced, partly or fully, unless written approval of Director of CASE.
3/ Kết quả phân tích chỉ có giá trị trên mẫu thử/ *This testing result is only valid on tested sample.*

TRỤ SỞ CHÍNH
(9) 02 Nguyễn Văn Thủ, P. Đa Kao, Q.1, TP. HCM
1800 1105
(84.28) 3911 7216
casehcm@case.vn

CN CẦN THƠ
(9) F2.67-F2.68, Đường số 6, KDC 586, P. Phú Thứ, Cái Răng, Cần Thơ
(84.292) 3918216 - 217 - 218
(84.292) 3918219
support@case.com.vn

VP ĐẠI DIỆN MIỀN TRUNG
(9) 51 H2.75, Đường số E, KĐT Lê Hồng Phong I, P. Phước Hải, Nha Trang, Khánh Hòa
(84.258) 246 5255
(84.258) 246 5355
vanphongmientrung@case.vn

Phụ lục 4: Phiếu đánh giá cảm quan sử dụng xà phòng thiên nhiên

SẢN PHẨM XÀ PHÒNG THIÊN NHIÊN ĐƯỢC NGHIÊN CỨU TẠI PHÒNG TÀI NGUYÊN THỰC VẬT - KHOA SINNH HỌC

Tên người khảo sát:..... Tuổi.....

Xin chào anh/chị chúng tôi là nhóm sinh viên chuyên ngành Công nghệ Sinh học của trường Đại học Đà Lạt. Hiện tại chúng tôi đang thực hiện một nghiên cứu khoa học: **"Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học, khảo sát hoạt tính sinh học của loài Kinh Giới núi (*Elsholtzia blanda* Benth.) tại khu vực Lâm Đồng và ứng dụng tạo sản phẩm xà phòng thiên nhiên."**

Chị có thể dành chút thời gian dùng thử sản phẩm của chúng tôi và trả lời vài câu hỏi khảo sát dưới đây để chúng tôi có thể đánh giá chất lượng sản phẩm nghiên cứu của chúng tôi một cách khách quan nhất. Rất mong sự cộng tác của anh/chị!

Anh chị hay khoanh tròn theo thang điểm từ 1 đến 4:

STT	**Chỉ tiêu đánh giá**	**Điểm**			
1	Độ cứng của xà phòng	1	2	3	4
2	Mùi thơm	1	2	3	4
3	Màu sắc	1	2	3	4
4	Khả năng làm sạch	1	2	3	4
5	Khả năng tạo bọt	1	2	3	4
6	Cảm giác sau khi sử dụng	1	2	3	4
7	Mức độ yêu thích	1	2	3	4

Chúng tôi chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của anh chị !

Phụ lục 5: Bảng kết quả đánh giá cảm quan dựa trên 106 phiếu khảo sát.

Theo khảo sát ý kiến của 106 người (cả nam và nữ) độ tuổi từ 18 đến 50 về tính chất của sản phẩm tại trường Đại học Đà Lạt và khu ký túc xá sinh viên thành phố Đà Lạt ta có:

Bảng : Đánh giá cảm quan của sản phẩm (người)

Tính chất của sản phẩm		**Kết quả**
Độ cứng	Cứng	37
	Hơi cứng	52
	Vừa phải	14
	Mềm	3
Nồng độ mùi	Không mùi	12
	Nhẹ	64
	Vừa phải	28
	Nồng	2
Màu sắc	Không thích	25
	Bình thường	50
	Thích	24
	Rất thích	7
Khả năng làm sạch	Không tốt	2
	Vừa phải	20
	Tốt	46
	Rất tốt	38
Khả năng tạo bọt	Không bọt	7
	Ít bọt	38
	Vừa phải	42
	Nhiều bọt	19

Cảm giác sau khi rửa	Không thích	4
	Bình thường	38
	Thích	49
	Rất thích	15
Độ yêu thích	Không thích	10
	Bình thường	26
	thích	60
	Rất thích	10

Phụ lục 6 : Bảng đánh giá tính chất sản phẩm của xà phòng theo thang điểm 4

Tính chất sản phẩm	**Thang điểm**			
	1	2	3	4
Độ cứng	Cứng	Hơi cứng	Vừa phải	Mềm
Nồng độ mùi	Không mùi	Nhẹ	Vừa phải	Nồng
Màu sắc	Không thích	Bình thường	thích	Rất thích
Khả năng làm sạch	Không tốt	Vừa phải	Tốt	Rất tốt
Khả năng tạo bọt	Không bọt	Ít bọt	Vừa phải	Nhiều bọt
Cảm giác sau khi rửa	Không thích	Bình thường	thích	Rất thích
Độ yêu thích	Không thích	Bình thường	thích	Rất thích

Phụ lục 7: Hình ảnh chiết cao



Phụ lục 8: Màu sắc của tinh dầu Kinh giới núi được tách chiết bằng phương pháp cất kéo hơi nước

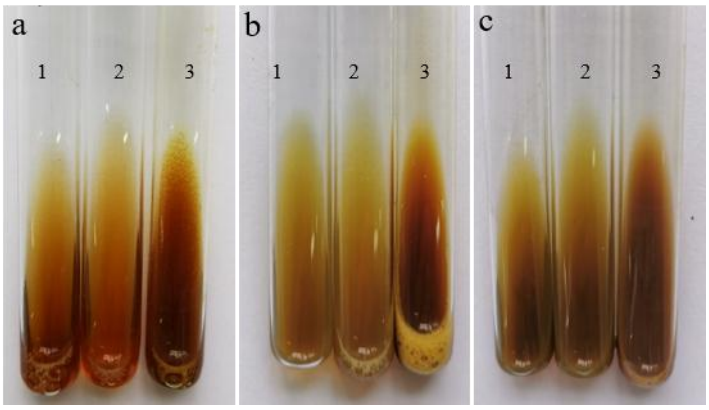


Phụ lục 9: (a) Phôi xà phòng ; (b) sản phẩm xà phòng có bổ sung cây Kinh Giới núi.



Phụ lục 10: Kết quả định tính các nhóm hợp chất có trong cao chiết cây Kinh giới núi

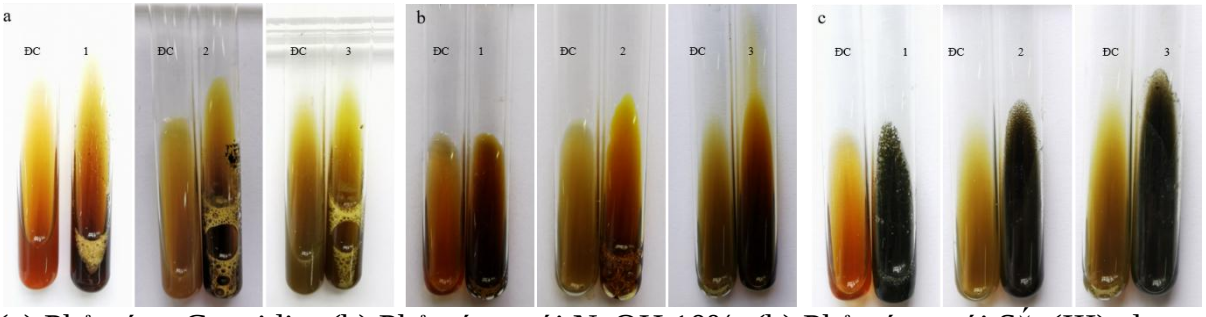
1. *Định tính Alkaloid*



(a) Cao tổng; (b) Cao hoa; (c) Cao lá

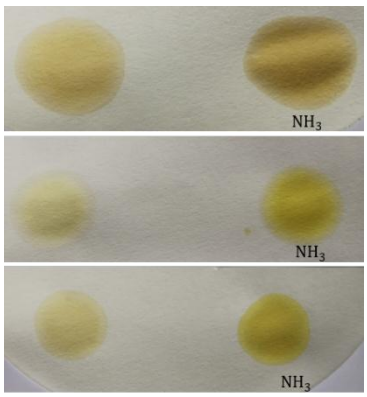
(1) Đối chứng; (2) Thuốc thử Mayer; (3) Thuốc thử Bouchardat

2. *Định tính Flavonoid*



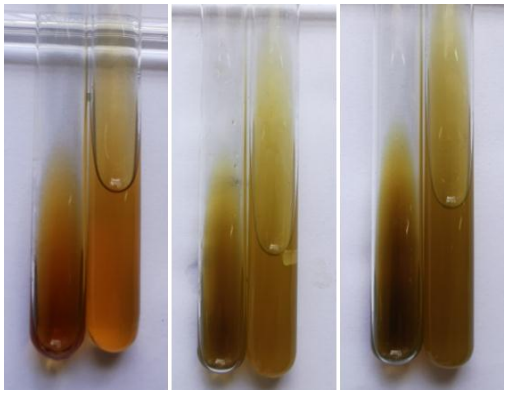
(a) Phản ứng Cyanidin; (b) Phản ứng với NaOH 10%; (b) Phản ứng với Sắt (III) clorua 5%.

(1) Cao tổng; (2) Cao hoa; (3) Cao lá



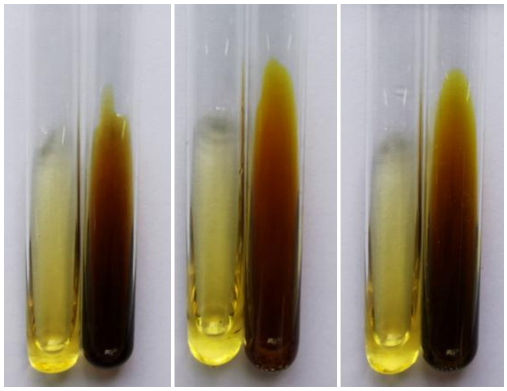
Phản ứng với khí NH_3

3. *Định tính Coumarine*



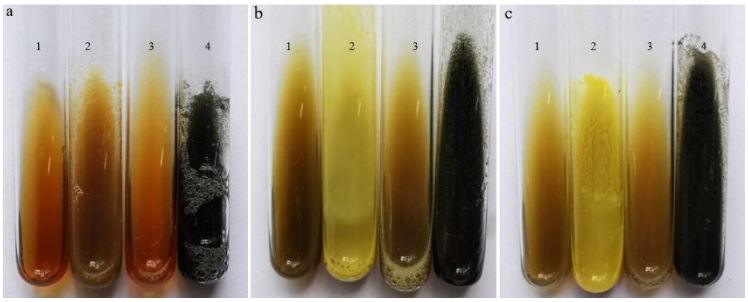
Phản ứng mở vòng lacton

4. *Định tính Glycosyde Tim*



Phản ứng Bajiet

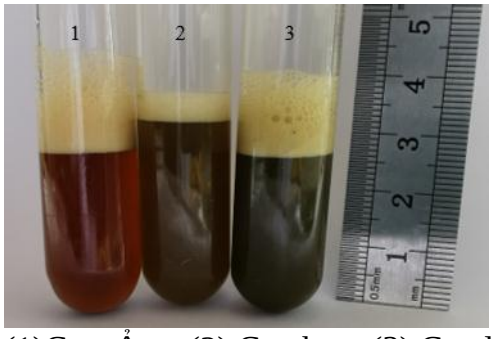
5. *Định tính Tanin*



(a) Cao tổng; (b) Cao hoa; (c) Cao lá

(1) Ống đối chứng; (2) Phản ứng với chì acetate 10%; (3)Phản ứng với gelatin 1%; (4) Phản ứng với Sắt (III) Clorua.

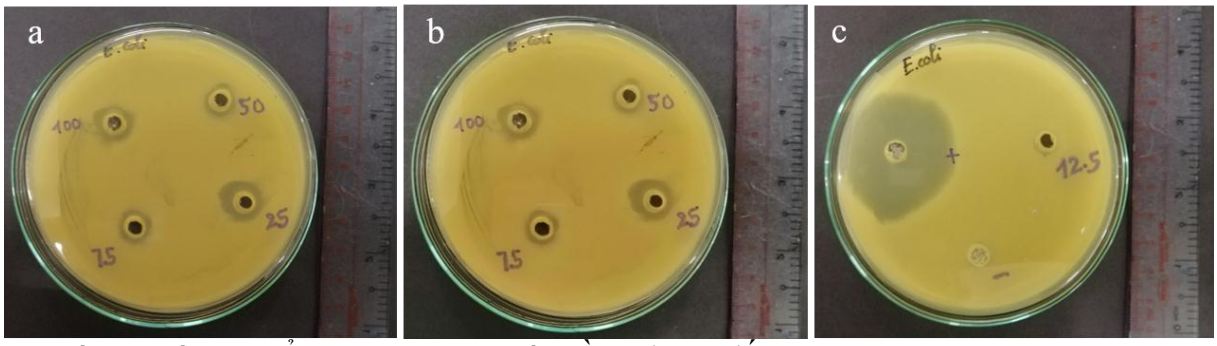
6. *Định tính Saponin*



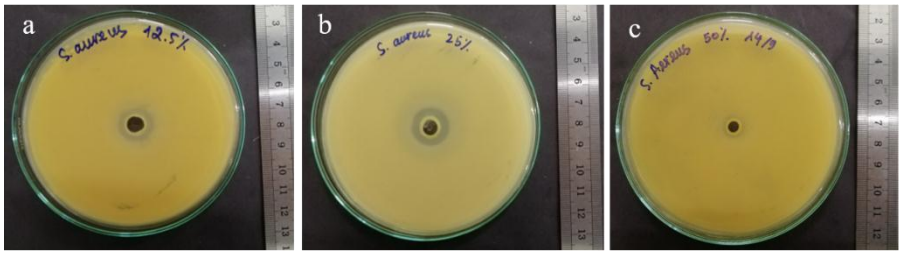
(1)Cao tổng; (2) Cao hoa; (3) Cao lá

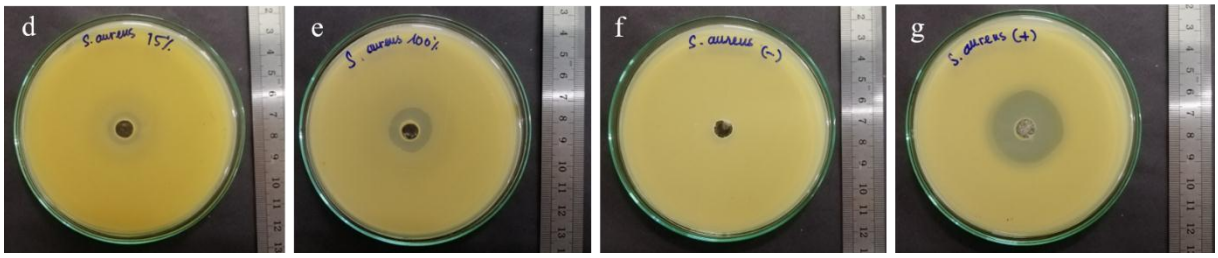
Phụ lục 11: Đường kính vòng kháng khuẩn (MIC)

1. Đường kính vòng kháng khuẩn của tinh dầu

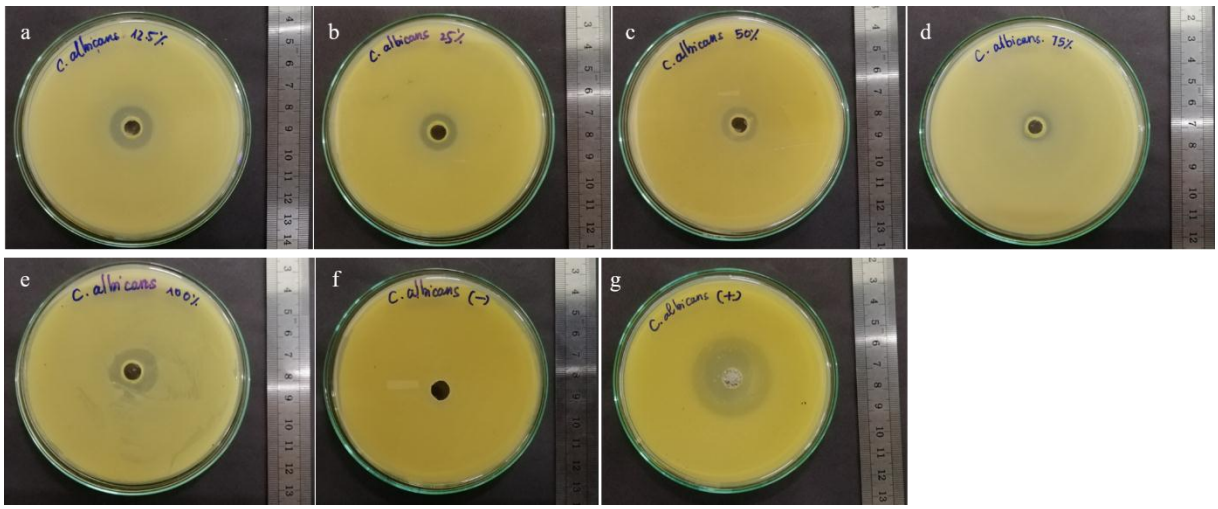


Vòng kháng khuẩn của *E. coli* ở các nồng độ và đối chứng





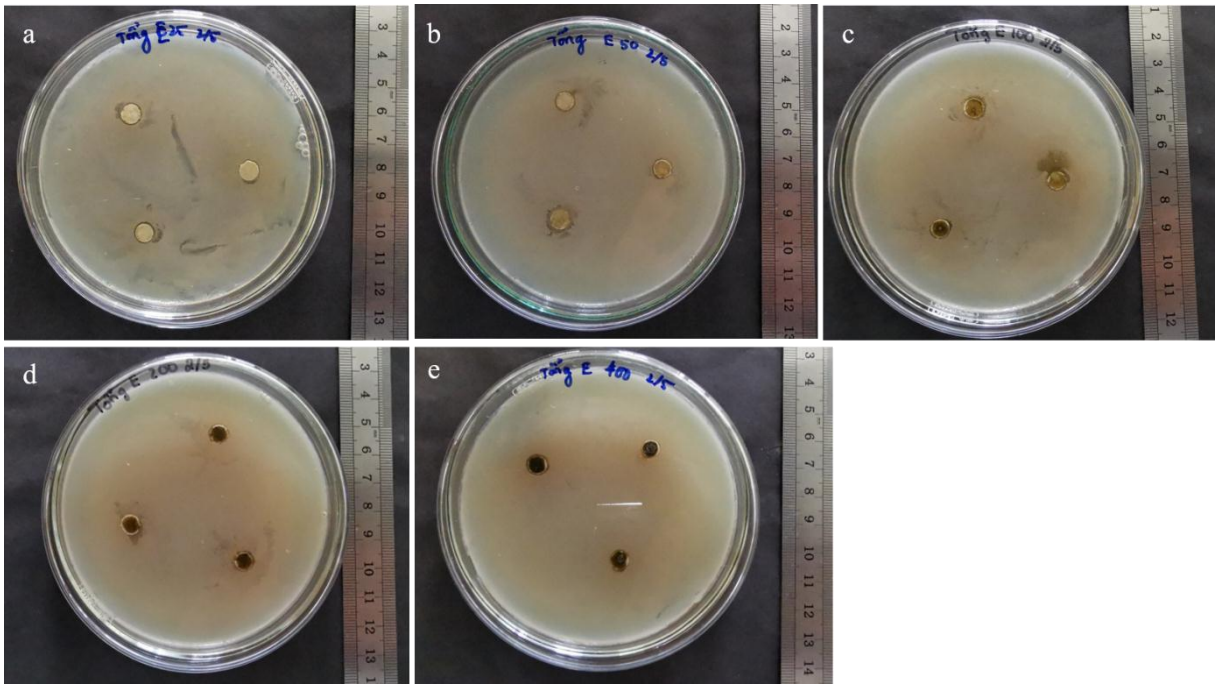
Vòng kháng khuẩn của *S. aureus* ở các nồng độ



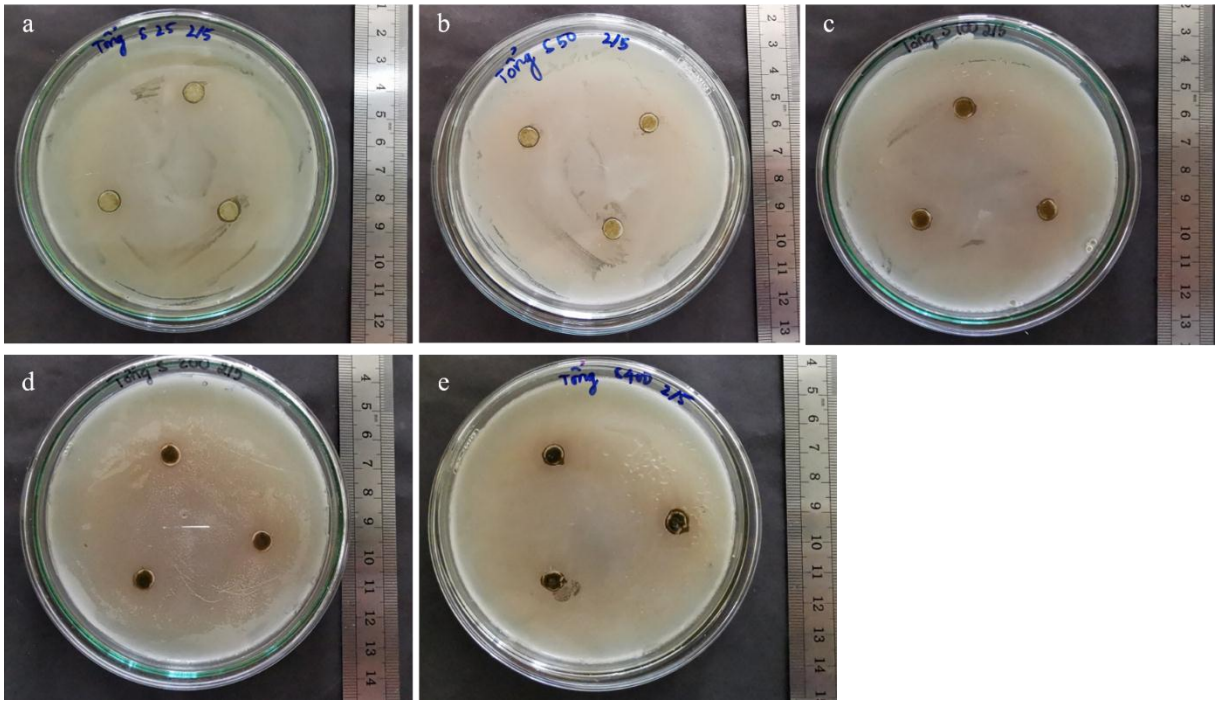
Vòng kháng khuẩn của *C. alibicans* ở các nồng độ

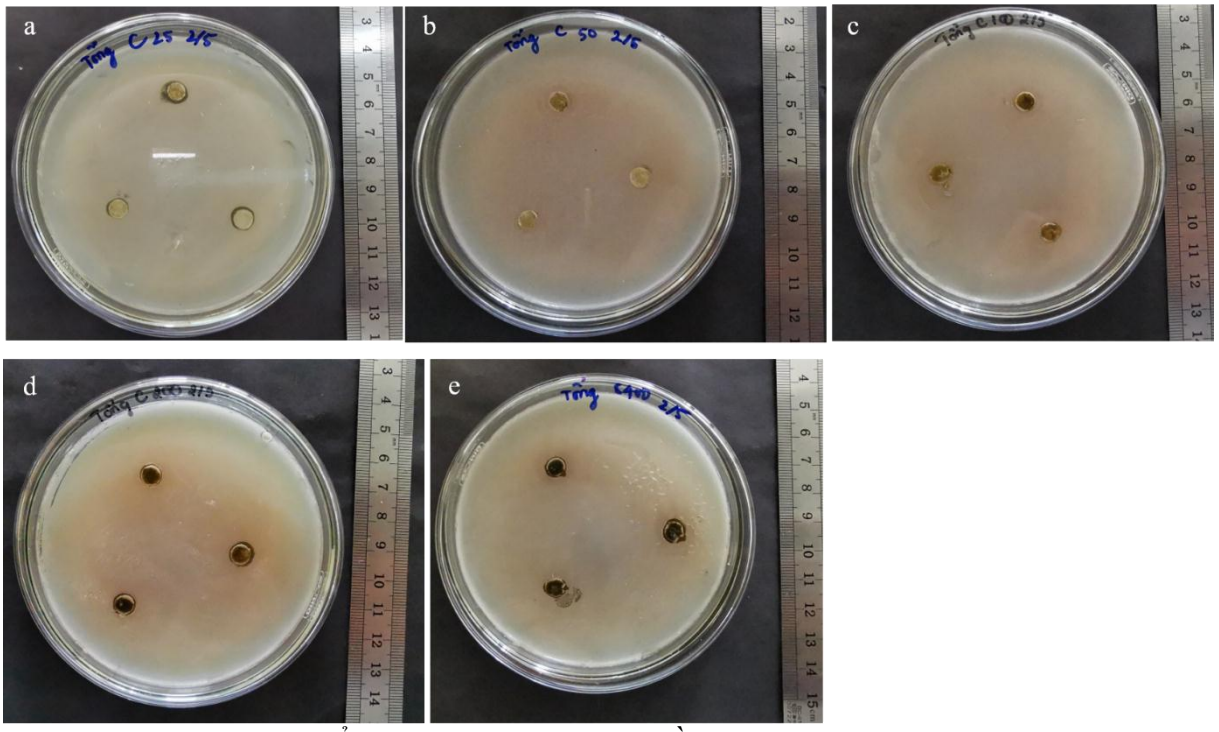
2. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết

a. Cao tổng



Vòng kháng khuẩn của *E. coli* ở các nồng độ

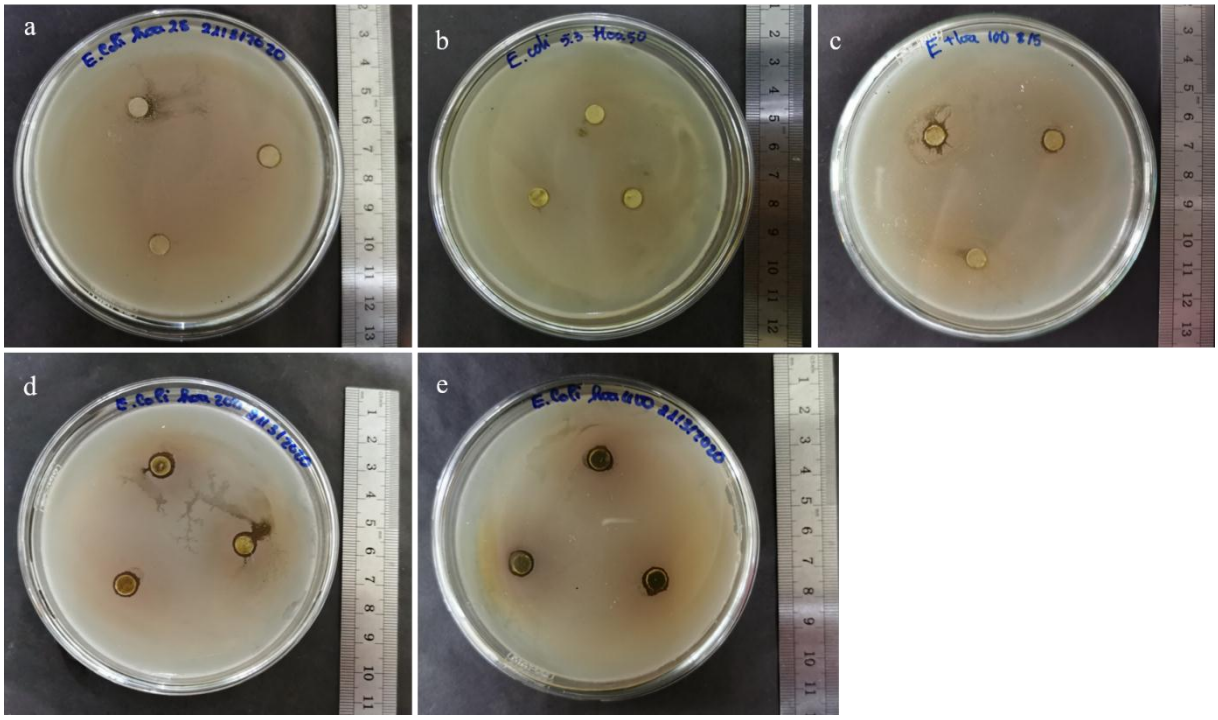




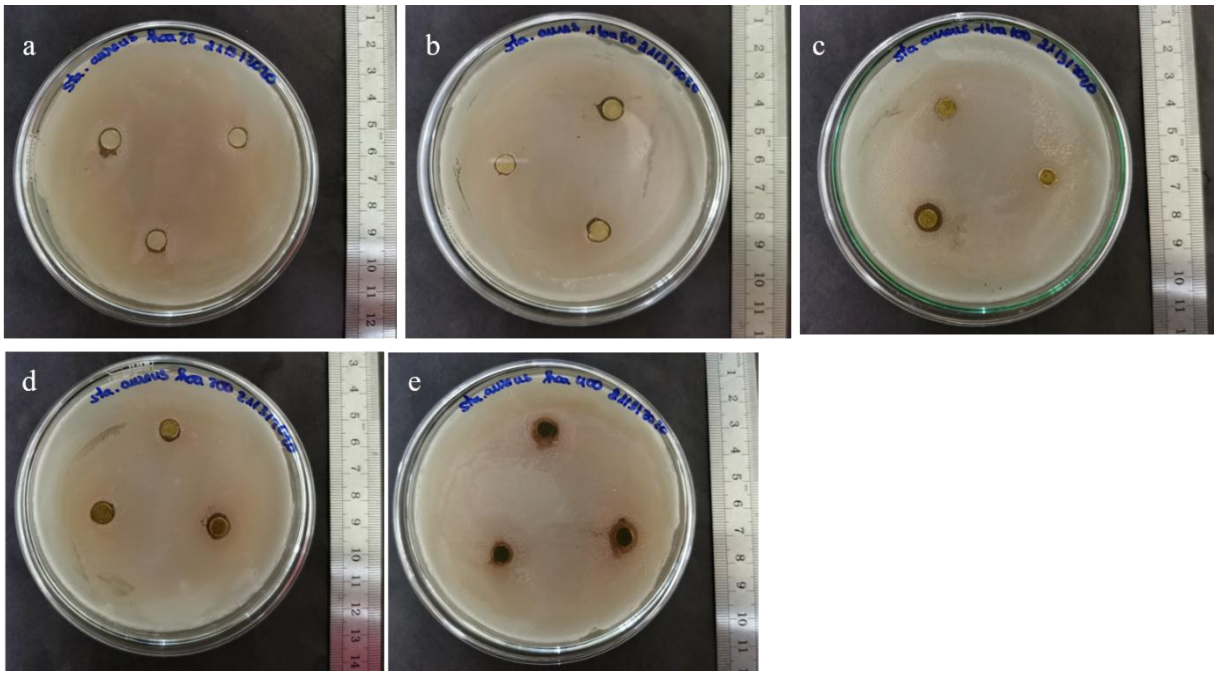
Vòng kháng khuẩn của *S. aureus* ở các nồng độ

Vòng kháng khuẩn của *C. albicans* ở các nồng độ

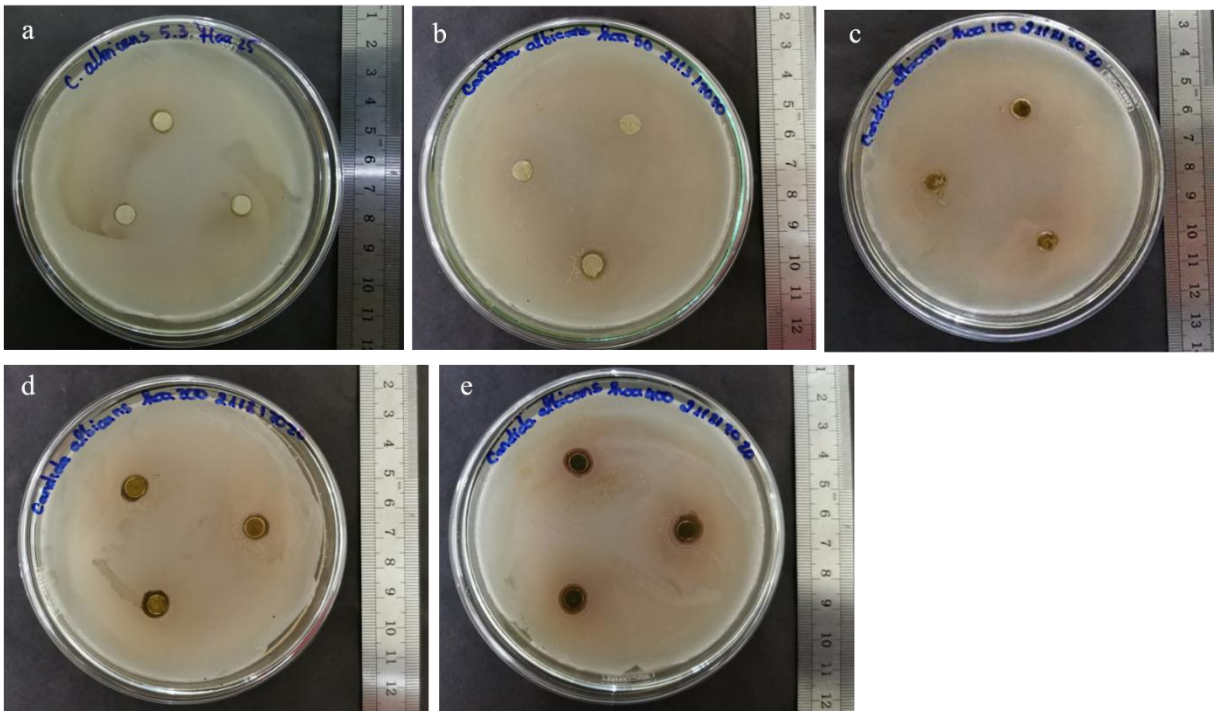
b. Cao hoa



Vòng kháng khuẩn của *E. coli* ở các nồng độ

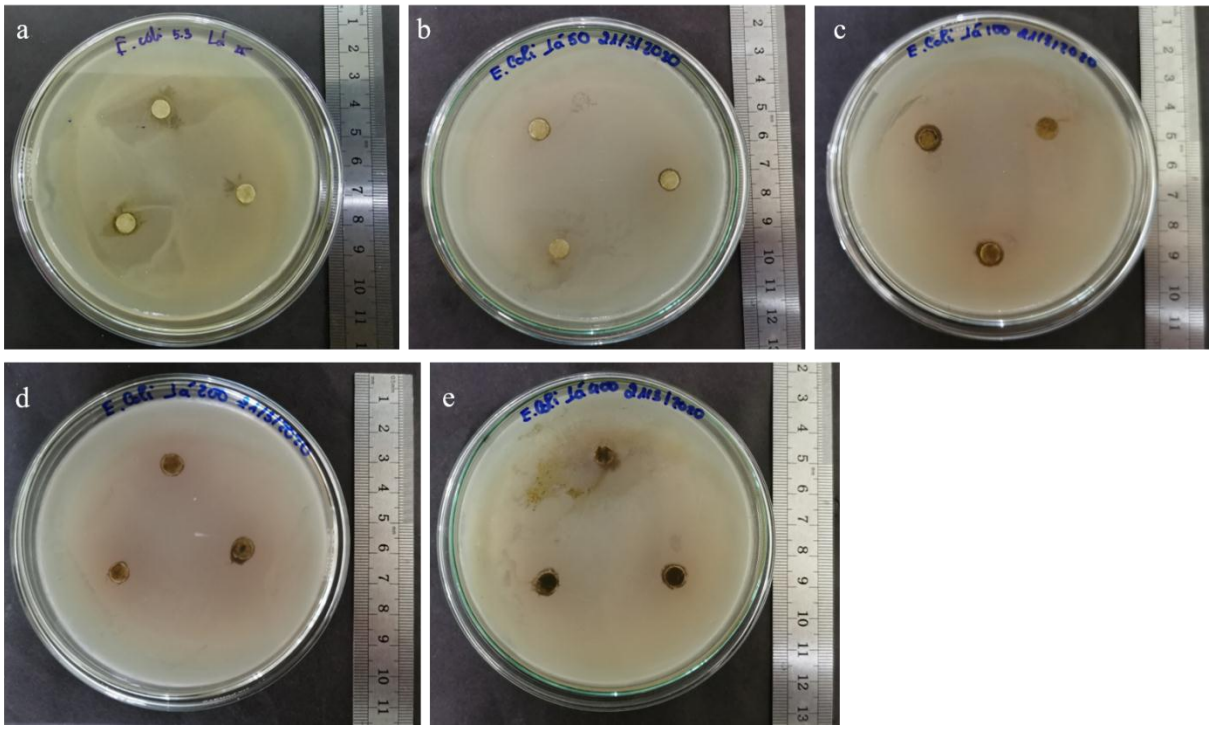


Vòng kháng khuẩn của *S. aureus* ở các nồng độ

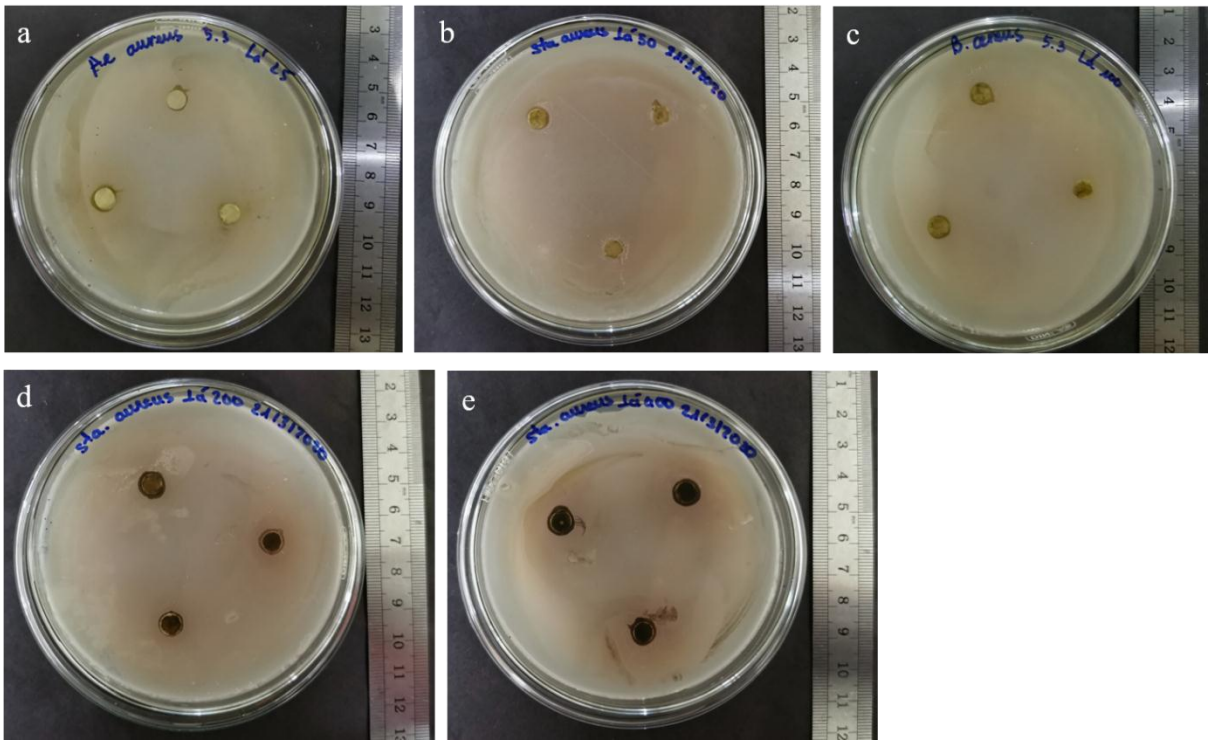


Vòng kháng khuẩn của *C. albicans* ở các nồng độ

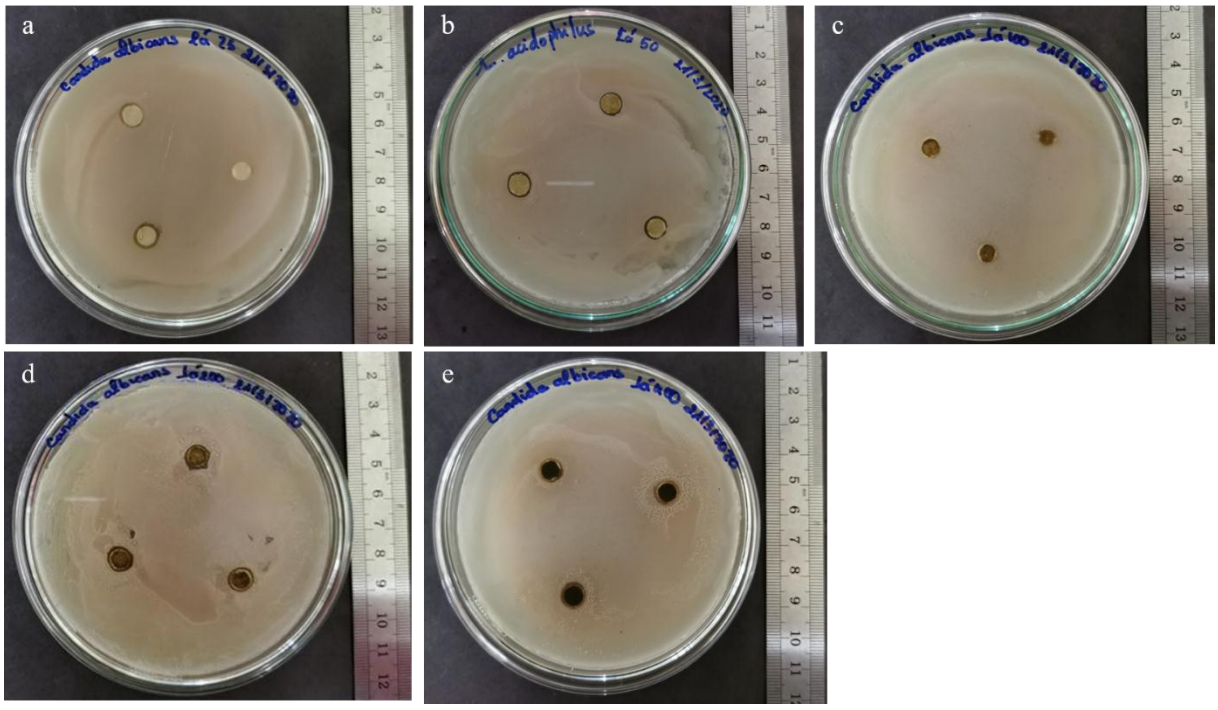
c. Cao lá



Vòng kháng khuẩn của *E. coli* ở các nồng độ



Vòng kháng khuẩn của *S. aureus* ở các nồng độ



Vòng kháng khuẩn của *C. albicans* ở các nồng độ

Phụ lục 12: **Bảng kết quả khảo sát hoạt tính sinh học**

1. **Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của cao lá Kinh giới núi**

Nồng độ mẫu chiết (mg/ml)	***Đường kính vòng kháng khuẩn (cm)***		
	E.coli	***C.albicans***	***S.aureus***
25	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,05 ± 0,01
50	0,13 ± 0.05	0,17 ± 0,06	0,13 ± 0,06
100	0,17 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,17 ± 0,06
200	0,13 ± 0,06	0,27 ± 0,12	0,20 ± 0,10
400	0,33 ± 0,15	0,27 ± 0,06	0,33 ± 0,06
(+) Chlormphenicol	**2,04 ± 0,23**	**1,1 ± 0,1**	**1,47 ± 0,31**
(-) DMSO	**0**	**0**	**0**

2. **Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của cao hoa Kinh giới núi**

Nồng độ mẫu chiết (mg/ml)	***Đường kính vòng kháng khuẩn (cm)***		
	E.coli	***C.albicans***	***S.aureus***
25	0,27 ± 0.15	0,17 ± 0,06	0,17 ± 0,06
50	0,07 ± 0.03	0,10 ± 0,05	0,23 ± 0,15
100	0,33 ± 0.21	0,15 ± 0,13	0,33 ± 0,06
200	0,31 ± 0.02	0,30 ± 0,10	0,33 ± 0,06
400	0,47 ± 0.06	0,70 ± 0,10	0,57 ± 0,06
(+) Chlormphenicol	**2,04 ± 0.23**	**1,2 ± 0,26**	**1,1 ± 0,10**
(-) DMSO	**0**	**0**	**0**

3. **Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học của cao tổng Kinh giới núi**

Nồng độ mẫu chiết (mg/ml)	***Đường kính vòng kháng khuẩn (cm)***		
	E.coli	***C.albicans***	***S.aureus***
25	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,06
50	0,13 ± 0,06	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,03
100	0,08 ± 0,03	0,10 ± 0,05	0,13 ± 0,06
200	0,19 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,08

400	0,12 ± 0,08	0,13 ± 0,06	0,17 ± 0,06
(+) Chlormphenicol	**2,04 ± 0,23**	**1,7 ± 0,10**	**1,47 ± 0,31**
(-) DMSO	**0**	**0**	**0**

4. Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học tinh dầu Kinh giới núi

Nồng độ mẫu chiết (%)	***Đường kính vòng kháng khuẩn (cm)***		
	E.coli	***C.albicans***	***S.aureus***
12,5	0,76 ± 0,06	1,36 ± 0,06	1,50 ± 0,10
25	1,23 ± 0,06	1,43 ± 0,15	1,37 ± 0,06
50	0,87 ± 0,06	1,47 ± 0,12	1,50 ± 0,20
75	1,07 ± 0,06	1,70 ± 0,10	1,57 ± 0,45
100	1,26 ± 0,12	1,77 ± 0,55	2,07 ± 0,38
(+) Chlormphenicol	3,93 ± 0,12	3,77 ± 0,25	3,4 ± 0,26
(-) DMSO	**0**	**0**	**0**

5. Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học xà phòng

Nồng độ mẫu (mg/ml)	***Đường kính vòng kháng khuẩn (cm)***		
	E.coli	***C.albicans***	***S.aureus***
25	0.4 ± 0.1	0.27 ± 0.1528	0.13 ± 0.2517
50	0.37 ± 0.2082	0.53 ± 0.3512	0.37 ± 0.0577
100	0.5 ± 0.3	0.83 ± 0.2517	0.5 ± 0.2
200	0.83 ± 0.2082	0.47 ± 0.1528	0.83 ± 0.5132
(+) Xà phòng công nghiệp	0.29 ± 0.2082	0.17 ± 0.2887	0.3 ± 0.7638
(-) Nước cất	**0**	**0**	**0**

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Thứ năm, ngày 25 tháng 6 năm 2020

BÁO CÁO KẾT QUẢ TỰ ĐÁNH GIÁ
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ SINH VIÊN 2020

I. Thông tin chung về đề tài:

1. Tên đề tài:

"Nghiên cứu cải thiện khả năng ra rễ và thích nghi ở giai đoạn vườn ươm của cây Artichoke (*Cynara* spp.) nuôi cấy *in vitro*"

2. Mục tiêu đề tài:

- Tạo được chồi *in vitro* có chất lượng tốt phục vụ cho quá trình cảm ứng tạo rễ *in vitro* cây Artichoke.

- Tìm được giá thể phù hợp cho quá trình ra rễ của các chồi Artichoke nuôi cấy *in vitro*.

- Bước đầu xây dựng quy trình nhân giống vô tính cây Artichoke ở quy mô thương mại.

3. Chủ nhiệm đề tài:

Sinh viên : Nguyễn Thị Như Mai MSSV: 1710791

4. Giáo viên hướng dẫn:

GS.TS. Dương Tấn Nhựt

5. Tổng kinh phí thực hiện:

5.000.000 triệu đồng (năm triệu đồng)

6. Thời gian thực hiện:

Bắt đầu: Tháng 1 năm 2019

Kết thúc: Tháng 7 năm 2020

7. Danh sách thành viên chính thực hiện đề tài nêu trên gồm:

STT	Họ và tên	Mã số SV	Lớp/Khoa
1	Hoàng Lê Lan Anh	1610568	CSK40/Sinh học
2	Hoàng Đắc Khải	1610640	CSK40/Sinh học
3	Nguyễn Thị Như Mai	1710791	CSK41/Sinh học
4	Nguyễn Như Minh Nguyệt	1710611	SHK41/Sinh học

II. Nội dung tự đánh giá về kết quả thực hiện đề tài:

1. Về sản phẩm khoa học:

1.1. Danh mục sản phẩm đã hoàn thành:

STT	Tên sản phẩm	Số lượng			Chất lượng		
		Xuất sắc	Đạt	Không đạt	Xuất sắc	Đạt	Không đạt
1	Bài báo số 1 (Bản thảo đã gởi đăng Tạp chí Công nghệ Sinh học, VAST)	X			X		
2	Bài báo số 2 (Bản thảo đã gởi đăng Tạp chí Công nghệ Sinh học, VAST)	X			X		
3	150 cây mô Artichoke cả 2 giống tím và xanh (vượt chỉ tiêu 100 cây)	X			X		

Minh chứng:

Tên bài báo số 1: Assessment of fungi and viruses in Artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Dalat (Lam Dong province)

Tên bài báo số 2: Cải thiện khả năng ra rễ và thích nghi ở giai đoạn vườn ươm của cây Artichoke (*Cynara* spp.) nuôi cấy *in vitro*

150 cây mô Artichoke bao gồm: 100 cây mô Artichoke giống tím và 50 cây mô Artichoke giống xanh trồng thử nghiệm tại hộ nông dân Trần Kim Phượng (Tự Tạo 3, Phước Thành, Trại Mát, Phường 11, Tp. Đà Lạt, Tỉnh Lâm Đồng), cây sinh trưởng và phát triển tốt và đang chuẩn bị ra hoa

1.2. Danh mục sản phẩm khoa học đã được ứng dụng:

STT	Tên sản phẩm	Thời gian ứng dụng	Cơ quan ứng dụng	Ghi chú
1	Bản thảo 1: tạo giống sạch bệnh	Tháng 5/2019	Viện nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên	
2	Bản thảo 2: Qui trình ra rễ cây Artichoke nuôi cấy *in vitro*	Tháng 5/2020	Viện nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên	
3	Cây con mô sạch bệnh	Đã thử nghiệm trồng từ tháng 11/2019	Hộ Nông dân tại Đà Lạt	

2. Về những đóng góp mới của đề tài:
- Tìm ra được môi trường cải thiện chất lượng chồi *in vitro* phục vụ quá trình cảm ứng tạo rễ cây Artichoke *in vitro*.
- Tìm ra giá thể phù hợp cho quá trình ra rễ của các chồi Artichoke nuôi cấy *in vitro*.
- Bước đầu xây dựng quy trình nhân giống vô tính cây Artichoke ở qui mô thương mại

3. Về hiệu quả của đề tài:
3.1. Hiệu quả kinh tế
Tạo ra cây con sạch bệnh với giá thành thích hợp có năng suất cao,

3.2. Hiệu quả xã hội
Chủ động được nguồn giống sản xuất tại chỗ, không còn phụ thuộc vào việc nhập giống từ nước ngoài, tạo điều kiện cho người nông dân phát triển cây trồng đặc sản tại địa phương, tăng thu nhập cho người nông dân, góp phần phát triển kinh tế xã hội.

III. Tự đánh giá, xếp loại kết quả thực hiện đề tài

1. Về tiến độ thực hiện: *(đánh dấu √ vào ô tương ứng*):

- *Nộp hồ sơ đúng hạn* ☐
- *Nộp chậm từ trên 30 ngày đến 06 tháng* ☐
- *Nộp hồ sơ chậm trên 06 tháng* ☐

2. Về kết quả thực hiện đề tài:

- *Xuất sắc* ☐
- *Đạt* ☐
- *Không đạt* ☐

Giải thích lý do:

Đã hoàn thành vượt mức các kết quả của đề cương của đề tài đăng ký (2 bản thảo bài báo và vượt 100 cây mô Artichoke).

Cam đoan nội dung của Báo cáo là trung thực; Chủ nhiệm và các thành viên tham gia thực hiện đề tài không sử dụng kết quả nghiên cứu của người khác trái với quy định của pháp luật.

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI **CHỦ TỊCH HĐ NGHIỆM THU**

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT
KHOA SINH HỌC
*****

THÔNG TIN VỀ SINH VIÊN CHỊU TRÁCH NHIỆM CHÍNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

I. SƠ LƯỢC VỀ SINH VIÊN:

Họ và tên: Nguyễn Thị Như Mai

Sinh ngày: 21/2/1999

Nơi sinh: Đà Lạt

Lớp: CSK41 Khóa: 41

Khoa: Sinh học

Địa chỉ liên hệ: 57/5b Yersin - Phường 9 - Đà Lạt - Lâm Đồng

Điện thoại: 0962226577 Email: 1710791dlu.edu.vn

II. QUÁ TRÌNH HỌC TẬP

**** Năm thứ 1:***

Ngành học: Công nghệ Sinh học Khoa: Sinh học

Kết quả xếp loại học tập: **Khá**

Sơ lược thành tích: - ***Đứng top 5 về thành tích học tập của lớp***

- Tích cực tham gia các hoạt động do Đoàn Hội tổ chức

**** Năm thứ 2:***

Ngành học: Công nghệ Sinh học Khoa: Sinh học

Kết quả xếp loại học tập: **Giỏi**

Sơ lược thành tích: - ***Đứng thứ nhất về thành tích học tập của lớp***

- Được nhận học bổng doanh nghiệp Hasfarm

**** Năm thứ 3:*** **Học kỳ 1**

Ngành học: Công nghệ Sinh học Khoa: Sinh học

Kết quả xếp loại học tập: **Xuất sắc**

Sơ lược thành tích: - ***Đứng thứ nhất về thành tích học tập của lớp***

- Được tuyên dương đạt thành tích cao trong học tập

Ngày 25 tháng 6 năm 2020

Xác nhận của Trường Đại học Đà Lạt *(ký tên và đóng dấu)*	Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài *(ký, họ và tên)*

MỞ ĐẦU

Artichoke (*Cynara scolymus* L.) thuộc họ Asteraceae là một loại cây thân thảo lâu năm (Bianco, 2000). Người ta thường sử dụng cây Artichoke như một loại dược phẩm vì nó có chứa hàm lượng cao các hợp chất phenolic, đặc biệt là cynarine (Pandino và cs., 2011); các hợp chất phenolic rất quan trọng cho cơ thể con người vì chúng có liên quan đến phòng chống ung thư, bệnh tim mạch, loãng xương, đái tháo đường và các bệnh thoái hóa thần kinh (Clifford, 2006). Artichoke được du nhập vào Việt Nam từ đầu thế kỷ XX và được trồng ở Sa Pa, Tam Đảo và nhiều nhất ở Đà Lạt (wikipedia). Cây Artichoke không chỉ là thương hiệu đặc sản mà còn là sản phẩm thế mạnh có hiệu quả kinh tế cao (bông Artichoke tươi lúc cao điểm có giá là 350.000 đồng/kg) ở Đà Lạt nói riêng và trên thế giới nói chung. Hiện nay, nhân giống cây Artichoke chủ yếu thông qua tách chồi và sử dụng lại gốc cây mẹ (Falco và cs., 2015); các phương pháp này đã dẫn đến sự lây nhiễm các nguồn bệnh từ cây mẹ, đặc biệt là các virus như: virus tiềm ẩn "S", virus Artichoke gây đốm vòng vàng, virus gây thoái hóa Artichoke và virus cynara được bắt gặp từ các mẫu bệnh cây Artichoke trên toàn thế giới (Minutillo và cs., 2012). Cây Artichoke nhiễm các loại virus này gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến cả chất lượng và sản lượng. Nhân giống *in vitro* cây Artichoke có ưu điểm tạo ra những cây con sạch bệnh, khỏe mạnh và chất lượng cao với quy mô thương mại; tuy nhiên, giai đoạn ra rễ *in vitro* cây Artichoke đang gặp nhiều khó khăn (Ercan và cs., 2016). Cho tới nay, một số nghiên cứu liên quan đến việc cải tiến điều kiện tiền ra rễ cây Artichoke (López-Pérez và Martínez, 2015; Ercan và cs., 2016). Các nghiên cứu trên đã cải thiện phần nào khả năng ra rễ của cây Artichoke thông qua nuôi cấy chồi các giống Artichoke khác nhau trong điều kiện tối, bên cạnh đó nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin lên khả năng ra rễ đã được các tác giả trên quan tâm. Tuy nhiên, tỷ lệ sống sót và thích nghi của chúng còn rất hạn chế (70 - 80%). Do đó, chúng em thực hiện đề tài: "Nghiên cứu cải thiện khả năng ra rễ và thích nghi ở giai đoạn vườn ươm của cây Artichoke (*Cynara* spp.) nuôi cấy *in vitro*" nhằm nâng cao tỷ lệ ra rễ của cây Artichoke nuôi cấy *in vitro* thông qua khảo sát chất lượng chồi và loại giá thể phù hợp, từ đó bước đầu đề xuất một quy trình nhân giống cây Artichoke có thể thực hiện được ở quy mô thương mại đáp ứng nhu cầu cung cấp cây giống Arichoke tại chỗ cho địa phương.

PHẦN 1:

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

GIỚI THIỆU CÂY ARTICHOKE

1.1.1. Phân loại thực vật

Giới : Plantae

Nghành : Magnoliophyta

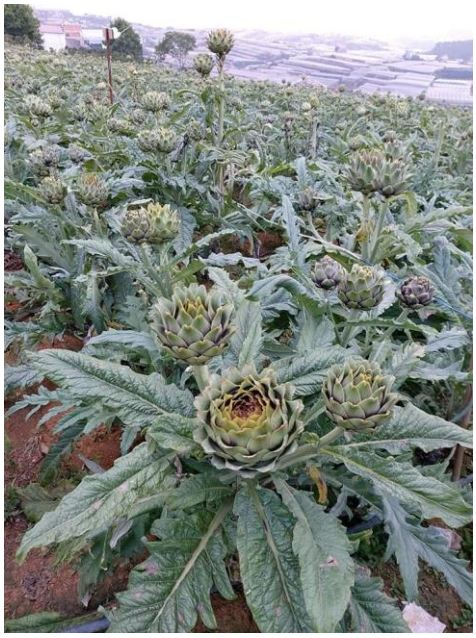
Lớp : Magnoliopsida

Bộ : Asterales

Họ : Asteraeae

Chi : *Cynara*

Loài : *C. scolymus* L.



Hình 1.1. Cây Artichoke tại Đà lạt.

Artichoke có tên tiếng Pháp là Artichaut, cao từ 1 – 1,5 m, thân cây có lông mềm. Lá to, dài, mọc so le, phiến lá ở gốc chia thùy. Cụm hoa hình đầu, gồm nhiều hoa hình ống màu lam tím đính trên đế hoa, xung quanh nhiều lá bắc. Cây ra hoa từ tháng 1 đến tháng 2 (Hình 1.1).

Dựa trên bộ phận thu hoạch từ cây Artichoke có thể chia thành 3 dạng chính với loại giống vô cùng đa dạng (Lisa, 2019):

Dạng chuyên hoa: Cây thấp, tán nhỏ, mật độ trồng dày, thời gian sinh trưởng ngắn. Mục đích chính là thu hoạch hoa có năng suất cao và chất lượng tốt.

Dạng chuyên lá: Cây cao, tán rộng, lá lớn thường chứa hoạt chất cynarin cao, mật độ trồng thưa, thời gian sinh trưởng dài. Mục đích chính là thu hoạch sản phẩm lá để đưa vào chế biến dược liệu.

Dạng trung gian giữa hoa và lá: Chiều cao và tán cây mức độ trung bình có thể trồng để sử dụng với hai mục đích là thu hoạch hoa và lá.

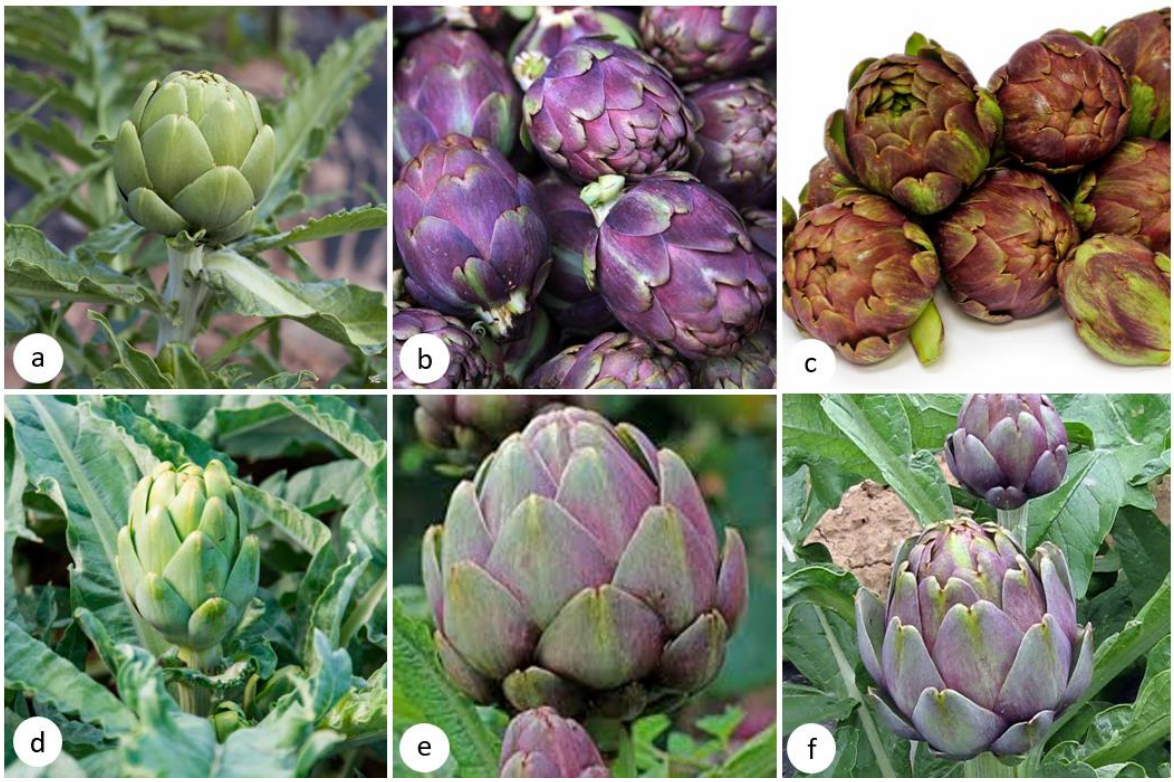
Dựa trên hình dáng của hoa Artichoke có chia thành loại hoa tròn (globe) và hoa dài (elongated); bên cạnh đó, mặc dù có hơn 1000 giống Artichoke khác nhau (bao gồm cả tròn và dài) nhưng có thể chia giống Artichoke theo màu sắc của cánh hoa là giống tím (violet) hoặc giống xanh (green) (Lisa, 2019). Một số giống Artichoke phổ biến trên thế giới được trình bày trong bảng 1.1 và hình 1.2.

Cây Artichoke có nguồn gốc từ vùng Địa Trung Hải, được trồng tại Pháp khoảng thế kỷ XV, di thực vào nước ta đầu thế kỷ XX được trồng phổ biến tại Sa Pa (tỉnh Lào Cai), Tam Đảo (tỉnh Vĩnh Phúc) và trồng nhiều nhất tại Đà Lạt (tỉnh Lâm Đồng) (Hình 1.2). Cây Artichoke là loại cây trồng thích hợp với thổ nhưỡng và khí hậu tại thành phố Đà Lạt. Trên độ cao 1200 m cây Artichoke trổ hoa, còn dưới 1200 m cây trưởng thành nhưng không trổ hoa (Nguyễn Thọ Biên, 2018).

Từ năm 1989 trở lại đây có nhiều giống Artichoke từ nước ngoài nhập vào Việt nam, có loại cho năng suất lá cao nhưng hoa lại nhỏ và ngược lại. Trước giải phóng năm 1975, người dân Đà Lạt trồng cây Artichoke chủ yếu để lấy hoa làm thực phẩm (được sử dụng như một loại rau). Thông thường hoa Artichoke (lá bắc và đế hoa) được hầm với thịt làm canh ăn. Sau ngày giải phóng, cây Artichoke được thu hoạch cả lá tươi bán cho các công ty dược phẩm trong và ngoài tỉnh để làm thuốc; ngoài ra lá, hoa, thân, rễ có thể được phơi hoặc sấy khô để chế biến làm trà túi lọc được xem là đặc sản thương hiệu của Đà Lạt không chỉ nổi tiếng trong và ngoài nước. Cây Artichoke có chứa hàm lượng cao các hợp chất phenolic đặc biệt là cynarine (Pandino và cs., 2011). Các hợp chất phenolic rất quan trọng cho cơ thể con người vì chúng có liên quan đến phòng chống ung thư, bệnh tim mạch, loãng xương, đái tháo đường và các bệnh thoái hóa thần kinh (Clifford, 2006). Tuy chất cynarine đã tổng hợp được nhưng người ta vẫn sử dụng chế phẩm từ cao lá Artichoke tươi. Hiện nay, cây Artichoke không chỉ là thương hiệu đặc sản mà còn là sản phẩm thế mạnh có hiệu quả kinh tế cao (giá bông Artichoke tươi lúc cao điểm có giá là 350.000 đồng/kg).

Bảng 1.1. Một số giống Artichoke được trồng phổ biến trên thế giới.

STT	Loại giống	Mô tả đặc điểm hình thái	Tham khảo
1	Green Globe	Đây là giống Artichoke tròn nguyên bản được trồng phổ biến nhất trên thế giới. Mỗi cây cho 3 - 4 bông, mỗi bông có đường kính 8 - 13 cm (Hình 1.2a)	Lauzer và cs., 1990
2	Purple Italian Globe	Giống như giống Green Globe và được đặc trưng bởi màu tím của lá. Giống này là loài cây dễ thích nghi hơn các giống còn lại, phù hợp ở khí hậu ôn đới hoặc á nhiệt đới (Hình 1.2b)	Negro và cs., 2012
3	Baby Anzio	Đây là giống Arichoke nhỏ nhất với đường kính hoa khi thu hoạch chỉ khoảng 5 cm. Bông giống Anzio có màu tím rất đặc trưng (Hình 1.2c)	El Sohaimy và cs., 2014
4	Imperial Star	Cây có thể được trồng và thu hoạch gối đầu quanh năm. Mỗi cây cho 6 – 8 bông, mỗi bông có đường kính 8 - 10 cm (Hình 1.2d)	Tivang và cs., 1996
5	Tempo (giống lai)	Hoa có lớp vỏ ngoài màu tím. Cây có 3 - 4 bông chính, mỗi bông có đường kính 10 - 13 cm (Hình 1.2e)	Lombardo và cs., 2012
6	Violetta	Là giống Artichoke truyền thống của đất nước Ý. Mỗi cây cho 6 - 8 bông, mỗi bông có đường kính khoảng 8 cm và dài 13 cm (Hình 1.2f)	Lombardo và cs., 2012



Hình 1.2. Một số giống Artichoke được trồng phổ biến trên thế giới (nguồn hình ảnh: Internet).
a: Green Globe
b: Purple Italian Globe
c: Baby Anzio
d: Imperial Star.
e: Tempo
f: Violetta

1.2. PHƯƠNG PHÁP NHÂN GIỐNG CÂY ARTICHOKE

1.2.1. Nhân giống bằng phương pháp truyền thống

Việc nhân giống truyền thống cây Artichoke gồm hai phương pháp chính đó là phương pháp trồng cây từ hạt (sinh sản hữu tính); hoặc trồng cây từ chồi bên (Cardarelli và cs., 2005), trồng lại gốc cây mẹ hoặc chồi ngủ được lưu trữ từ mùa vụ trước (Falco và cs., 2015) (đều thuộc sinh sản vô tính).

Những phương pháp truyền thống từ lâu đã được ứng dụng để nhân giống cây Artichoke trên toàn thế giới nói chung và tại Việt Nam nói riêng, bởi sự thuận lợi về nguồn giống có sẵn từ vụ trước. Tuy nhiên, phương pháp nhân giống hiện nay gặp phải rất nhiều khó khăn như giá thành của hạt giống Artichoke nhập ngoại rất cao (12.000 - 15.000 đồng/hạt), bởi đây là nguồn giống không sản xuất trong nước, do đó tất cả hạt giống đều nhập khẩu từ nước ngoài dẫn đến giá thành cây giống cao nâng chi phí sản phẩm cũng như không thể chủ động giải quyết đúng thời điểm và đủ số lượng cho nhu cầu cây giống Artichoke tại chỗ cho địa phương. Việc sử dụng các chồi ngủ hay chồi bên dẫn đến sự gia tăng nguy cơ lây nhiễm các nguồn bệnh từ cây mẹ, đặc biệt là các virus như virus tiềm ẩn "S", virus Artichoke gây đốm vòng vàng, virus gây thoái hóa Artichoke và virus cynara được bắt gặp từ các mẫu bệnh cây Artichoke trên toàn thế giới (Gallitelli và cs., 2012).

Những nhược điểm của phương pháp nhân giống truyền thống cây Artichoke đã dẫn đến sự suy giảm mạnh mẽ về sản lượng và chất lượng của đối tượng này (Gallitelli và cs., 2012). Do đó, yêu cầu cấp thiết đặt ra cần thay đổi phương pháp nhân giống hiệu quả nhằm phục vụ nhu cầu ngày càng mở rộng của ngành trồng cây Artichoke. Trong đó, phương pháp nuôi cấy mô thực vật được biết đến như một công cụ để tạo ra cây con sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền với số lượng lớn trong một thời gian ngắn (Acquadro và cs., 2010).

1.2.2. Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy in vitro

Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* hay vi nhân giống được biết đến là một phương pháp nhân giống vô tính trong điều kiện vô trùng có thể kiểm soát các yếu tố môi trường và CĐHSTTV nhằm điều khiển sự phát triển của thực vật theo mong muốn. Vi nhân giống đảm bảo sản xuất quy mô lớn các giống cây

thương mại với chất lượng cao, dễ dàng vận chuyển từ nước này sang nước khác (Vaast và cs., 1997).

Các giai đoạn vi nhân giống cây Artichoke tương tự như các đối tượng thực vật khác bao gồm, thiết lập nguồn mẫu nuôi cấy ban đầu (vào mẫu *in vitro*), nhân nhanh chồi, ra rễ và thích nghi trong điều kiện vườn ươm (Ancora và cs., 1981; Morone - Fortunato và cs., 2005; Pacifici và cs., 2007; Bedini và cs., 2012; Boullani và cs., 2012).

Hiện nay, giai đoạn ra rễ *in vitro* cây Artichoke đang gặp nhiều khó khăn; vì vậy, bước đầu đã có một số công bố liên quan đến việc cải tiến điều kiện tiền ra rễ cây Artichoke (López-Pérez và Martínez, 2015). Nghiên cứu trên đã cải thiện phần nào khả năng ra rễ của cây Artichoke thông qua nuôi cấy chồi các giống Artichoke khác nhau trong điều kiện tối, bên cạnh đó nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin lên khả năng ra rễ được các tác giả trên quan tâm. Kết quả thu được từ các nghiên cứu trên rất khả quan; tuy nhiên, tỷ lệ sống sót và thích nghi của trong điều kiện vườn ươm còn rất hạn chế. Những nghiên cứu trên chỉ có ý nghĩa tham khảo ở mức độ phòng thí nghiệm và chưa có khả năng ứng dụng thực tiễn. Do vậy, việc nghiên cứu nâng cao tỷ lệ ra rễ của cây giống *in vitro* thông qua khảo sát chất lượng chồi và giá thể là vấn đề cần quan tâm nhằm đưa ra một quy trình nhân giống cây Artichoke có thể thực hiện được ở quy mô thương mại.

1.3. GIAI ĐOẠN RA RỄ *IN VITRO*

1.3.1. Giới thiệu chung

Thành công của vi nhân giống phụ thuộc phần lớn vào sự hình thành rễ *in vitro* và sự thích nghi của cây ở điều kiện vườn ươm (Tesfa và cs., 2016). Các yếu tố của môi trường nuôi cấy như nồng độ chất khoáng, loại và nồng độ của chất điều hòa sinh trưởng, nồng độ sucrose, giá thể nuôi cấy, chất lượng chồi,… đều ảnh hưởng đáng kể đến quá trình ra rễ trong nuôi cấy *in vitro*.

Ra rễ *in vitro* là giai đoạn cây có những thay đổi rất lớn về cấu trúc của các mô lá như sự dày lên của lớp biểu bì và thành tế bào, các chức năng sinh lý của khí khổng được tăng cường; do đó, thúc đẩy quá trình thích nghi và tăng khả năng sống sót

ngoài vườn ươm của cây mô (Apòstolo và cs., 2005). Bên cạnh đó, sự hình thành rễ *in vitro* giúp cây tăng cường khả năng hút nước, chất dinh dưỡng, nâng cao hiệu suất trao đổi chất để sinh trưởng, phát triển ở giai đoạn *ex vitro*. Do đó, đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện để cải thiện khả năng ra rễ của chồi trong nuôi cấy *in vitro* như bổ sung vào môi trường nuôi cấy auxin nhân tạo, than hoạt tính, hoặc cyclodextrine vào môi trường nuôi cấy, điều chỉnh tỷ lệ đường trong giai đoạn ra rễ, thay thế giá thể (Comino, 2019).

1.3.2. Giai đoạn ra rễ in vitro cây Artichoke

Nhân giống *in vitro* cây Artichoke lần đầu tiên được thực hiện bởi De Leo và Greco (1976). Tuy nhiên, cho đến nay việc ứng dụng vi nhân giống trên đối tượng Artichoke còn gặp nhiều khó khăn; đặc biệt khả năng hình thành rễ và tỷ lệ tạo rễ *in vitro* còn thấp (Bảng 1.2) và đây là một trở ngại lớn cho mục đích mở rộng quy mô sản xuất. Do đó, đã có nhiều nghiên cứu nhằm cải thiện khả năng ra rễ *in vitro* cây Artichoke; tuy nhiên, hiệu quả ra rễ chỉ đạt khoảng 80% (El Boullani và cs., 2012) (Bảng 1.2).

Bảng 1.2. Một số nghiên cứu cải thiện khả năng ra rễ *in vitro* cây Artichoke.

STT	Loại giống	Yếu tố cải thiện khả năng ra rễ	Tỷ lệ ra rễ (%)	Tham khảo
1	*Cynara scolymus* L. cv. 'Green Globe'	NAA	65	(Lauzer và cs., 1990)
2	*C. scolymus* L.	IAA	60	(Iapichino, 1996)
3	*C. scolymus* L. cv. 'Tuscan Globe'	β-cyclodextrin + NAA	6 - 40	(Bedini và cs., 2012)
4	*C. scolymus* L.	GA_3 + than hoạt tính	37 - 63	(Ercan và cs., 2016)
5	*C. scolymus* L. cv. 'Bayrampaşa'	IAA+ than hoạt tính	11 - 30	(Ozsan và cs., 2019)

Một trong những nguyên nhân dẫn đến khả năng ra rễ thấp có thể là môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy chưa phù hợp. Bên cạnh đó, các nghiên cứu trên mới chỉ khảo sát khả năng ra rễ trên loại agar tạo gel phổ biến. Trong khi giá thể nuôi cấy là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả ra rễ *in vitro* của thực vật (Comino, 2019); tuy nhiên, các nghiên cứu ra rễ đối tượng Artichoke liên quan việc thay thế giá thể hoàn toàn chưa được quan tâm; do đó, trong nghiên cứu này, lần đầu tiên các loại giá thể khác nhau đã được sử dụng trong giai đoạn ra rễ *in vitro* cây Artichoke nhằm đánh giá ảnh hưởng của giá thể lên hiệu quả ra rễ đối tượng này.

1.4. VAI TRÒ CỦA AUXIN VÀ CYTOKININ TRONG VI NHÂN GIỐNG

1.4.1. Vai trò của cytokinin

Cytokinin là nhóm chất điều hòa sinh trưởng thực vật đóng vài trò rất quan trong trong giai đoạn nhân chồi của phần lớn tất cả các loài cây. Cytokinin được chia thành hai loại là cytokinin tự nhiên và cytokinin tổng hợp. Trong số các cytokinin tự nhiên, hai loại được sử dụng trong môi trường nuôi cấy mô thực vật là zeatin (được phát hiện đầu tiên trong hạt ngô) và 2-iP. Cytokinin tự nhiên là các dẫn xuất purine và việc sử dụng chúng không phổ biến vì cytokinin tự nhiên thường đắt tiền (đặc biệt là zeatin) và chất lượng không ổn định. Các cytokinin tổng hợp bao gồm KIN, BA, TDZ, CPPU; trong đó, BA được sử dụng phổ biến vì có hiệu quả cao trong sự cảm ứng tạo chồi ở nhiều loài thực vật, giá thành của BA thấp hơn đáng kể so với các cytokinin khác.

Cytokinin có tác dụng chủ yếu là thúc đẩy phân chia tế bào, thúc đẩy sự phát sinh hình thái chồi và phát sinh hình thái của mô nuôi cấy, tạo mô sẹo, kích thích phát sinh chồi bên trong điều kiện có ưu thế ngọn, làm chậm quá trình lão hóa, kích thích sự đóng mở khí khổng ở nhiều loài thực vật, thúc đẩy quá trình nguyên phân, tham gia điều hòa các phản ứng trong cây, làm tăng quá trình tổng hợp acid nucleic và protein,… Trong vi nhân giống cây Artichoke, BA, KIN và 2-iP là những loại cytokinin được sử dụng phổ biến nhất trong vi nhân giống cây Artichoke (El-Zeiny và cs., 2013; Catacora và cs., 2019) (Bảng 1.3).

Bảng 1.3. Một số nghiên cứu sử dụng cytokinin trong giai đoạn nhân nhanh chồi cây Artichoke nuôi cấy *in vitro*.

STT	Loại giống	Loại auxin	Số chồi/cụm	Tham khảo
1	*C. scolymus* L.	2-iP	5,3	Dawa và cs., 2012
2	*C. scolymus* L.	Kin	4,5	Ancora và cs., 1981
3	*Balanca de tudela*	Kin	5,8	López và cs., 2014
4	*Calico*	Kin	7,2	López và cs., 2014
5	*Salambo*	Kin	6,4	López và cs., 2014

Bên cạnh hiệu quả nhân chồi, chất lượng chồi được nhân nhanh cũng là vấn đề quan trọng trong vi nhân giống cây Artichoke bởi sự tồn dư cytokinin trong chồi có thể gây giảm hiệu quả ra rễ *in vitro*. Do đó, việc lựa chọn loại và nồng độ cytokinin phù hợp cho giai đoạn nhân chồi Artichoke có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng ra rễ *in vitro* đã được thực hiện trong nghiên cứu này trên hai giống Artichoke giống tím và giống xanh.

1.4.2. Vai trò của auxin

Auxin là một nhóm phytohormone liên quan đến nhiều quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật. Nhiều thập kỷ nghiên cứu đã chỉ ra rằng các auxin tự nhiên như IAA điều chỉnh sự phân chia tế bào, tăng trưởng tế bào, sinh tổng hợp ethylene, kích thích ra rễ, hình thành lá, gây ra hiện tượng ưu thế ngọn và sự biệt hóa của các mô mạch dẫn,... (Finet và Jaillais, 2012). NAA, IBA là những auxin nhân tạo. Các auxin này gây ra những đáp ứng sinh lý tương tự các auxin tự nhiên (Imin và cs., 2005). Trong các chức năng trên, auxin đóng vai trò trung tâm trong khởi phát của quá trình hình thành rễ bên. Bên cạnh đó, điều kiện ánh sáng cũng

ảnh hưởng gián tiếp đến sự đáp ứng của các vùng mô liên quan đến quá trình ra rễ (Reid và cs., 1991). Trong quá trình tạo rễ bất định, auxin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ cao hơn các giai đoạn khác của vi nhân giống như giai đoạn cảm ứng, nhân chồi (Klerk và cs., 1996). Trong quá trình kích thích rễ từ chồi nuôi cấy, hoạt động của auxin liên quan đến việc gắn vào protein thụ thể và kích hoạt sự tải tín hiệu liên quan đến điều hòa gen bằng cách phân giải protein của các chất điều hòa phiên mã (AUX/IAA) thông qua con đường ubiquitin-proteasome (Dharmasiri và Estelle, 2004).

Bảng 1.4. Một số nghiên cứu sử dụng auxin trong giai đoạn ra rễ cây Artichoke nuôi cấy *in vitro*.

STT	Loại giống	Loại cytokinin	Tỷ lệ ra rễ (%)	Tham khảo
1	*Cynara scolymus* L. cv. 'Green Globe'	NAA	65	(Lauzer và cs., 1990)
2	*C. scolymus* L.	IAA	60	(Iapichino, 1996)
3	*C. scolymus* L. cv. 'Tuscan Globe'	NAA	6 - 40	(Bedini và cs., 2012)
4	*C. scolymus* L. cv. 'Bayrampaşa'	IAA	11 - 30	(Ozsan và cs., 2019)

1.4.3. Sự kết hợp giữa cytokinin và auxin trong vi nhân giống

Cytokinin được tạo ra trong rễ, cũng có thể được tạo ở hạt và trái cây, cytokinin di chuyển từ rễ lên ngọn cây thông qua mạch xylem và thúc đẩy sự phát triển của chồi bên. Trong khi đó, auxin được vận chuyển xuống từ chồi đỉnh, lá non, bộ phận đang phát triển và có tác dụng kìm hãm sự phát triển chồi bên, hai loại chất điều hòa sinh trưởng thực vật này tạo ra sự cân bằng nội môi tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của thực vật. Khi nồng độ hoạt động của hai chất điều hòa sinh trưởng thực vật này được cân bằng sẽ kích thích sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo. Tỷ lệ auxin/cytokinin nhỏ hơn 1 sẽ tạo điều kiện tối ưu cho sự hình thành chồi; ngược lại, tỷ lệ auxin/cytokinin lớn hơn 1 sẽ tạo điều kiện tối ưu cho sự hình thành rễ.

Cytokinin và IAA là các hormone chủ chốt điều chỉnh sự phát triển của rễ, sự biệt hóa mô mạch và lực hấp dẫn của rễ; hai loại hormone này, cùng với ethylene, điều chỉnh sự khởi đầu của rễ bên (Aloni, 2006). Cytokinin và IAA có vai trò đối kháng trong sự phát triển của rễ; auxin thúc đẩy sự hình thành rễ bên trong khi cytokinin ở nồng độ cao sẽ ức chế sự hình thành rễ.

Harbaoui và cộng sự (1980) đã báo cáo hiệu quả nhân nhanh chồi cây Artichoke được cải thiện vượt trội trên môi trường MS có chứa KIN kết hợp với IAA và GA_3. Iapichino (1996) đã nghiên cứu ảnh hưởng của auxin đến sự tạo chồi cây Artichoke. Kết quả cho thấy tỷ lệ chồi bên cao nhất được tạo ra trên môi trường MS được bổ sung 0,1 mg/L NAA và 1,0 mg/L BA. Các cytokinin khác cũng được thử nghiệm (KIN, zeatin và 2-iP) và cho thấy hiệu quả nhân chồi kém hơn BA trong sự phát triển của chồi bên. zeatin cho hiệu quả nhân chồi kém hơn so với BA, nhưng chiều cao chồi không có sự khác biệt đáng kể. Vì vậy, BA có hiệu quả hơn KIN và 2-iP trong sự nhân chồi từ cây con *in vitro* của giống Artichoke xanh (Green Globe). Tuy nhiên, tỷ lệ hình thành rễ của các chồi này chưa cao, chỉ hơn 60% chồi tạo rễ sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường 1/2MS bổ sung 2 mg/L IAA và 70% cây con đã được trồng vào đất và tác giả cũng đề nghị có những nghiên cứu sâu hơn để cải thiện sự hình thành rễ ở Artichoke.

Tóm lại, cytokinin và auxin có tác dụng đối kháng trên nhiều khía cạnh của sự phát triển của cây (Laplaze và cs., 2007). Auxin có thể điều hòa trực tiếp quá

trình sinh tổng hợp cytokinin, trong khi cytokinin ít ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp auxin (Nordström và cs., 2004).

1.5. GIÁ THỂ TRONG VI NHÂN GIỐNG

1.5.1. Vai trò của giá thể trong vi nhân giống

Một số các nghiên cứu về nhân giống vô tính trên cây Artichoke đã được báo cáo; tuy nhiên, khả năng ứng dụng ở mức độ thương mại chưa thể thực hiện được vì khả năng ra rễ *in vitro* của đối tượng này chưa cao; có thể do môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy chưa thích hợp, giá thể chưa phù hợp,... Trong nghiên cứu này chúng tôi quan tâm đến ảnh hưởng của giá thể lên khả năng ra rễ *in vitro* cây Artichoke và đây có thể là một điều kiện chính ảnh hưởng đến quá trình ra rễ. Nếu tìm ra được giá thể phù hợp cho quá trình ra rễ cây Artichoke *in vitro* thì sẽ giải quyết vấn đề khó khăn nhất trong vi nhân giống đối tượng này và đây cũng là quan tâm lớn của các nhà nhân giống.

Hiện nay, giá thể thường được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật là agar một loại polysaccharide không phân nhánh thu được từ thành tế bào của một số loài tảo đỏ. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên giá thể agar được chia thành hai loại dựa trên sự khác nhau về độ tinh khiết. Cụm từ “agar nghiên cứu” được sử dụng để chỉ loại agar được sử dụng trong nghiên cứu vi nhân giống thực vật thường có độ tinh khiết cao; cụm từ “agar thương mại” được sử dụng để chỉ loại agar được sử dụng trong vi nhân giống ở quy mô sản xuất. Theo như hiểu biết của nhóm nghiên cứu, đây là báo cáo đầu tiên đánh giá ảnh hưởng của hai loại agar này lên hiệu quả ra rễ *in vitro* cây Artichoke.

1.5.2. Một số loại giá thể được sử dụng trong vi nhân giống

Mặc dù agar được sử dụng phổ biến, tuy nhiên khả năng hình thành rễ kém trên một số đối tượng cây đã được ghi nhận bởi giá thể agar có độ thoáng khí không cao, khả năng dẫn truyền dinh dưỡng cho chồi kém, các chất độc cho chồi tích tụ ngay tại vị trí cấy chồi. Để giải quyết các khó khăn trên, các giá thể thay thế agar như rockwool, vermiculite, perlite, than bùn, xơ dừa,… Các giá thể này cho thấy hiệu quả hình thành rễ được cải thiện đáng kể trên các đối tượng như cây Khoai lang

(Bressan và cs., 2002), cây Đu đủ (Sekeli và cs., 2013), cây Dâu tây (Wafaa và cs., 2017). Các giá thể mới có nguồn gốc từ tự nhiên, trơ về mặt hóa học, dễ sử dụng, có độ thoáng khí thích hợp, đảm bảo điều kiện tối ở vùng tiếp xúc giữa giá thể và phần đế của chồi nuôi cấy để tăng cường tích lũy auxin nội sinh và tránh sự phân hủy của auxin nhân tạo (Ray, 1958). Những giá thể chủ yếu được sử dụng trong thủy canh hay điều kiện *ex vitro* này sẽ được ứng dụng vào nhân giống *in vitro*, hứa hẹn là loại giá thể phù hợp cho sự tạo thành rễ, nâng cao khả năng thích nghi của cây khi đưa ra điều kiện vườn ươm, góp phần nâng cao hiệu quả nhân giống *in vitro*, tiết kiệm thời gian, chi phí, lao động và đặc biệt là nâng cao chất lượng cây giống, mang lại hiệu quả kinh tế cao (Bảng 1.5).

Bảng 1.5. Một số loại giá thể được sử dụng trong vi nhân giống.

STT	Giá thể	Nguồn gốc	Tính chất	Tham khảo
1	*Agar*	Chiết xuất từ Tảo đỏ (*Rhodophyceae*)	Agar chứa một lượng nhỏ các nguyên tố đa lượng và vi lượng, đặc biệt là canxi, natri, kali và phosphate, carbohydrat, amino acid và vitamin ảnh hưởng đến đặc tính thẩm thấu và dinh dưỡng của gel. Agar cũng chứa phenolic và có thể chứa chuỗi dài acid béo, ức chế sự phát triển của một số vi khuẩn. Tính tan: Agar không tan trong nước lạnh, tan nhẹ trong ethanolamin và tan tốt trong formamide. Agar	Araki và cs., 1956 Armisen và cs., 2009 Beruto và cs., 1995 Day và cs., 1942 Debergh và cs., 1983 Scherer và cs., 1987

			thu được từ kết tủa bằng cồn, ở trạng thái ẩm có thể tan tốt trong nước ở nhiệt độ 25ºC. Tạo gel: Gel agar tạo thành sau khi agar được đun nóng và làm lạnh. Dung dịch agar sẽ đông lại khi làm nguội đến 38ºC và nóng chảy khi nhiệt độ gần 85ºC. Gel agar có tính thuận nghịch nhiệt và đàn hồi. Khả năng tạo gel và độ bền gel phụ thuộc vào nồng độ agar và phân tử lượng trung bình của nó. Sự có mặt của ion sunfat làm cho gel bị mờ, đục.	
2	*Gelrite*	Tinh chiết từ vi khuẩn *Sphingomonas-elodea*	Gelrite có độ tinh khiết cao và có khả năng tạo ra gel cứng ở nồng độ thấp hơn nhiều so với agar hoặc agarose. Tuy nhiên, loại gel này có xu hướng bị lỏng sau một thời gian dài do sự thay đổi độ pH hoặc sự cạn kiệt các muối cần thiết cho các liên kết.	Arthur và cs., 2004 Moorhouse và cs., 1981 Pasqualetto và cs., 1986 Zimmerman và Cobb, 1989

3	*Perlite*	Perlite là một loại đá núi lửa vô định hình và chứa rất nhiều silic	Khi perlite được làm nóng đến nhiệt độ 870°C (1600°F), chúng sẽ trương nở ra với kích thước lớn hơn và tạo ra các bong bóng trong đá (thể nang). Màu sắc của đá perlite thô dao động từ xám nhạt đến đen bóng, còn màu sắc của perlite sau khi được nung dao động từ màu trắng tuyết đến xám trắng. Xốp và có thể giữ nước gấp 3 – 4 lần nên giúp thoát nước và thoáng khí tốt. Tuy nhiên perlite có chứa hàm lượng nhôm cao nên khi pH trong môi trường giảm, hàm lượng nhôm này sẽ giải phóng vào dung dịch, ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển của cây.	Manjit và Mridul, 1991 Olympius, 1992
4	*Vermiculite*	Vermiculite là một silicat nhôm – sắt - magiê tương tự mica, được tìm thấy ở các mỏ khác	Không có mùi, không bị phân hủy, không bị thối rữa, không hoạt động với kiềm và acid, có thể cách nhiệt và cách điện, không độc hại, thân thiện với	Barshad và Kishk, 1969 Bors và cs., 1997 Mekhamer

		nhau của thế giới trong đó có Australia, Brazil, Trung Quốc, Nga,..	môi trường, có khả năng trao đổi ion tốt. Có khả năng dãn nở khi gặp nhiệt độ cao.	và cs., 1999 North và Chandler, 1953
5	*Rockwool*	Rockwool được phát hiện đầu tiên tại núi lửa Mauna Loa, Hawaii vào năm 1850	Là vật liệu thiên nhiên, có khả năng tái dụng được, hoàn toàn an toàn với sức khỏe người sử dụng. Có tính hóa học ổn định, không bị ăn mòn bởi môi trường, không bắt cháy, không gây ra sự phát triển của nấm do bản chất là hợp chất vô cơ.	Blaabjerg, 1983 Dhawan, 2012 Olympios, 1992 Rankin và cs., 1994 Smith, 1987

PHẦN 2:

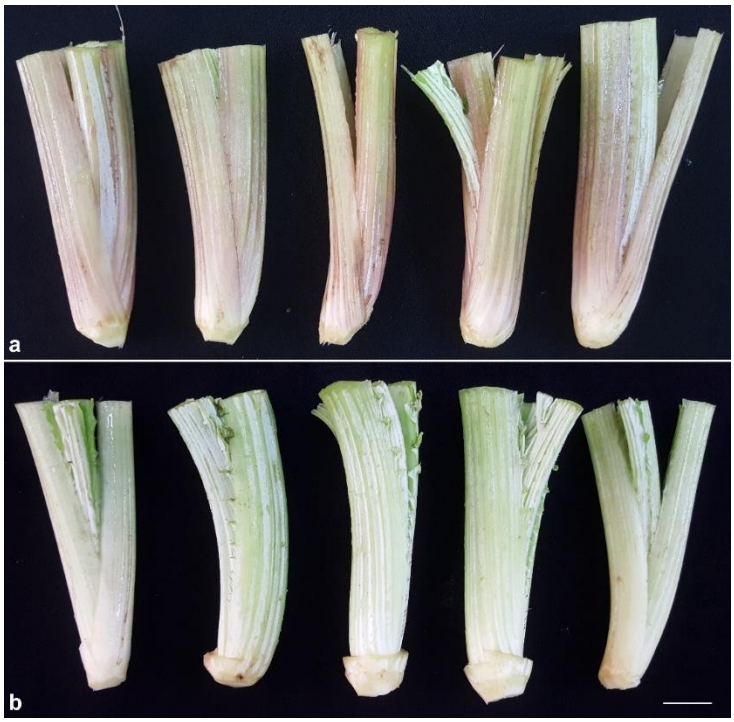
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. VẬT LIỆU

2.1.1. Nguồn mẫu thực vật

Nguồn mẫu nuôi cấy ban đầu

Chồi con cây Artichoke giống tím (Globe Violet anizo) và giống xanh (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori) 3 tháng tuổi, khỏe mạnh, không bị nhiễm sâu bệnh được thu nhận tại vườn của nông dân trồng Artichoke trên địa bàn thành phố Đà Lạt. Rửa sạch bằng nước máy và cắt ngắn khúc chồi (10 cm) trước khi đưa về phòng thí nghiệm (Hình 2.1).



Hình 2.1. Chồi ngủ cây Artichoke 3 tháng tuổi được sử dụng làm nguồn vật liệu nuôi cấy ban đầu. *Thanh bar = 2 cm*.
a: Giống Artichoke tím (Globe Violet anizo).
b: Giống Artichoke xanh (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori).

Quy trình khử trùng mẫu cấy gồm 3 bước:

Bước 1: Tách bỏ 2 – 3 lá và tiếp tục cắt ngắn phần chồi (có đường kính 1 cm, chiều dài 3 cm), rửa dưới vòi nước chảy trong 30 phút; sau đó ngâm trong dung dịch nước rửa chén Sunlight® loãng trong vòng 10 phút và rửa sạch lại bằng nước máy 4 - 5 lần.

Bước 2: Nguồn mẫu được cho vào bình tam giác chứa cồn 70º và lắc đều trong 30 giây, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần.

Bước 3: Các mẫu được khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% có bổ sung 2 - 3 giọt Tween 80 trong thời gian 6 phút; sau đó, mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần.

Cuối cùng, sử dụng dao cấy để loại bỏ các phần mô bị tổn thương và thu nhận các mẫu chồi đỉnh có đường kính khoảng 0,3 cm. Đây là vật liệu để sử dụng cho thí nghiệm.

Nguồn mẫu cho thí nghiệm nhân nhanh chồi

Sau 1 tháng khử trùng thành công thu được các chồi vô trùng có kích thước 1,0 – 1,5 cm được cắt bỏ lá để sử dụng làm vật liệu cho thí nghiệm nhân nhanh chồi.

Nguồn mẫu cho thí nghiệm ra rễ *in vitro*

Các chồi thu được sau giai đoạn nhân nhanh có kích thước ≥ 2 cm được cấy chuyền lên môi trường MS không bổ sung CĐHSTTV 10 ngày nhằm cải thiện chất lượng chồi nuôi cấy, các chồi này được cắt bỏ chỉ còn 2 - 3 lá được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy cho thí nghiệm ra rễ *in vitro*.

Nguồn mẫu cho thí nghiệm thích nghi ngoài vườn ươm

Các cây con thu được sau giai đoạn ra rễ *in vitro* được chuyển ra thuần dưỡng trong điều kiện vườn ươm.

2.1.2. Giá thể nuôi cấy in vitro

Các giá thể sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm agar thương mại (Công ty cổ phần rau quả Việt Xô, Hải Phòng, Việt Nam), agar nghiên cứu (Himedia - Ấn Độ), gelrite (Duchefa, Hà Lan), rockwool (RedFlag Produce, Inc., Hoa Kỳ), vermiculite (Đại Học Nông Lâm, Tp.HCM, Việt Nam) và perlite (Đại Học Nông Lâm, Tp.HCM, Việt Nam)

2.1.3. Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong nghiên cứu là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) bổ sung hoặc không bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (cytokinin và auxin) tùy vào mục đích thí nghiệm, pH được điều chỉnh về 5,8 và hấp tiệt trùng bằng nồi hấp ở 121°C, 1 atm trong vòng 20 phút.

Môi trường nhân chồi là môi trường MS có bổ sung BA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) hoặc KIN (0; 0,3; 0,5; 1,0 mg/L), 30 g/L sucrose và 8 g/L agar thương mại.

Môi trường cải thiện chất lượng chồi là môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar thương mại và không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

Môi trường ra rễ là môi trường MS có bổ sung NAA (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L) hoặc IBA (0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 mg/L), 30 g/L sucrose và 8 g/L agar thương mại.

2.1.4. Thiết bị và dụng cụ khác

Tủ cấy, thiết bị đo hàm lượng chlorophyll tổng cầm tay, còn gọi là máy SPAD Chlorophyll meter 502 (Minolta Corp Nhật Bản) với đơn vị đo là nmol/cm^2.

Dụng cụ: Kính hiển vi quang học, kính soi nổi, dao cấy, đĩa cấy, pank cấy, kéo, bình magenta 250 mL, túi nuôi cấy nylon 120 x 250 mm không thoáng khí đã chiếu xạ vô trùng, cốc đong 20 mL và 50 mL,...

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của BA hoặc KIN lên khả năng nhân nhanh chồi cây Artichoke giống tím và giống xanh nuôi cấy in vitro

Mục đích thí nghiệm: Thí nghiệm được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của BA hoặc KIN đến khả năng nhân nhanh chồi của cây Atichoke giống tím và giống xanh nuôi cấy *in vitro*, đồng thời chọn ra chồi có chất lượng tốt sử dụng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm ra rễ tiếp theo.

Tiến hành thí nghiệm: Sau 1 tháng vào mẫu, các chồi sẽ được cấy sang các bình thủy tinh 250 mL có chứa 40 mL môi trường MS có bổ sung BA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0

mg/L) hoặc KIN (0; 0,3; 0,5; 1,0 mg/L), 30 g/L sucrose và 8 g/L agar thương mại. Mật độ nuôi cấy 3 chồi/bình.

Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây (cm), số lá/cây, số chồi, khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), SPAD (nmol/cm^2). Kết quả được thu nhận sau 1 tháng nuôi cấy.

2.2.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của IBA hoặc NAA lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống tím và giống xanh nuôi cấy in vitro

Mục đích thí nghiệm: Thí nghiệm được tiến hành nhằm khảo khảo sát ảnh hưởng của IBA hoặc NAA đến khả năng ra rễ của cây Atichoke giống tím và giống xanh nuôi cấy *in vitro*.

Tiến hành thí nghiệm: Các chồi thu được sau giai đoạn nhân nhanh sẽ được cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng trong vòng 10 ngày nhằm cải thiện chất lượng chồi. Chồi đã cải thiện chất lượng có chiều cao khoảng 3,5 cm sẽ được cấy sang các bình thủy tinh 250 mL có chứa 40 mL môi trường MS có bổ sung NAA (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L) hoặc IBA (0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 mg/L), 30 g/L sucrose và 8 g/L agar thương mại. Mật độ nuôi cấy 3 cây/bình.

Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây (cm), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), số lá/cây, khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), SPAD (nmol/cm^2). Kết quả được thu nhận sau 1 tháng nuôi cấy.

2.2.1.3. Ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống tím và giống xanh nuôi cấy in vitro

Mục đích thí nghiệm: Thí nghiệm được tiến hành nhằm cải thiện tỷ lệ ra rễ của cây Atichoke giống tím và giống xanh trên giá thể agar thương mại, giá thể agar nghiên cứu, giá thể gelrite, giá thể vermiculite, giá thể perlite và giá thể rockwool.

Tiến hành thí nghiệm: Các chồi đã cải thiện chất lượng có chiều cao khoảng 3,5 cm sẽ được cấy sang các bình magenta có chứa 60 mL môi trường MS có bổ sung

auxin (loại và nồng độ auxin tốt nhất từ kết quả thí nghiệm 2), 30 g/L sucrose với giá thể được sử dụng là 8 g/L agar thương mại hoặc 8 g/L agar nghiên cứu hoặc 3 g/L gelrite hoặc 40 g/bình vermiculite hoặc 40 g/bình perlite hoặc 4 cục rockwool/bình. Mật độ nuôi cấy 4 chồi/bình magenta.

Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây (cm), số rễ /cây, chiều dài rễ (cm), số lá/cây, số chồi, khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), SPAD (nmol/cm^2). Kết quả được thu nhận sau 1 tháng nuôi cấy.

2.2.1.4. Đánh giá khả năng ra rễ của các chồi Artichoke giống tím và giống xanh trong túi nuôi cấy nylon sản xuất

Mục đích thí nghiệm: Thí nghiệm được tiến hành nhằm thử nghiệm khả năng ra rễ của cây Atichoke giống tím và giống xanh trong túi nylon nuôi cấy phục vụ cho sản xuất thương mại.

Tiến hành thí nghiệm: Các chồi được nuôi cấy trên môi trường có giá thể tốt nhất đã khảo sát từ thí nghiệm trên được đưa vào nuôi cấy trong túi nylon thương mại. Mật độ nuôi cấy 15 cây/túi.

Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây (cm), số rễ /cây, chiều dài rễ (cm), số lá/cây, số chồi, khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), SPAD (nmol/cm^2). Kết quả được thu nhận sau 1 tháng nuôi cấy.

2.2.1.5. Đánh giá khả năng sống sót và sinh trưởng của cây mô Artichoke giống tím và giống xanh ngoài vườn ươm

Mục đích thí nghiệm: Thí nghiệm được tiến hành nhằm đánh giá khả năng sống sót và sinh trưởng của cây mô Atichoke giống tím và giống xanh ở giai đoạn vườn ươm.

Tiến hành thí nghiệm: Cây mô Artichoke có rễ (1 - 3 rễ) được lấy ra khỏi túi nuôi cấy, rửa sạch nhẹ bằng nước máy và trồng trong ly nhựa thể tích 100 mL có đục lỗ với giá thể là xơ dừa phối trộn cát theo tỉ lệ 2:1, tưới nước 2 lần/ngày. Cây được

chuyển sang chậu lớn hơn sau 2 và 4 tháng. Sau 6 tháng cây chuyển cây ra trồng trên đồng ruộng.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ sống sót (%), chiều cao cây (cm), số lá/cây, số chồi, SPAD (nmol/cm^2). Kết quả được thu nhận sau 1, 3, 5 và 7 tháng nuôi trồng.

2.2.2. Phương pháp quan sát giải phẫu hình thái thực vật

Hình thái mẫu cấy được giải phẫu, nhuộm đơn và quan sát dưới kính hiển vi quang học (Peterson và cs., 2008) bao gồm các bước sau:

Bước 1: Các mẫu thực vật được cắt bằng tay thành các lát mỏng theo chiều ngang hoặc dọc (có chiều dày 30 - 40 µm) đi qua trục của mẫu cần quan sát.

Bước 2: Ngâm các mẫu đã cắt trong Javel 10% với thời gian 15 phút; rửa lại bằng nước cất.

Bước 3: Ngâm mẫu trong acetic acid 45% trong 15 phút để cố định mẫu, rửa lại bằng nước cất khoảng 6 lần.

Bước 4**:** Nhuộm mẫu bằng dung dịch nhuộm khoảng 5 phút; rửa lại mẫu với nước cất bằng bình phun nhỏ giọt cho đến khi nước trong đĩa petri ngâm mẫu không còn phẩm nhuộm (khoảng 2 phút).

Bước 5: Đặt mẫu trên lame kính có thêm 1 giọt nước hoặc glycerine và đậy lamel. Quan sát và ghi nhận kết quả dưới kính hiển vi quang học.

2.2.3. Điều kiện thí nghiệm in vitro và ex vitro

Điều kiện in vitro: Mẫu cấy được nuôi trong phòng nuôi cây với nhiệt độ 25 ± 2°C, độ ẩm trung bình 55 - 60%, đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với quang chu kỳ 16 giờ/ngày và cường độ chiếu sáng 40 - 45 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

Điều kiện ex vitro: Cây con được nuôi trồng trong nhà kính của phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên) với nhiệt độ 18 - 25°C, độ ẩm trung bình khoảng 70 - 75% với ánh sáng tự nhiên có che sáng 40% bằng lưới đen.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và lặp lại 3 lần (6 mẫu/lần). Số liệu thu nhận được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và phần mềm SPSS 16.0 với phép thử Duncan và phép thử LSD (mức ý nghĩa p = 0,05).

2.4. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM THỰC HIỆN NGHIÊN CỨU

2.4.1. Thời gian

Đề tài được thực hiện từ tháng 1 năm 2019 đến tháng 7 năm 2020.

2.4.2. Địa điểm

Các thí nghiệm nuôi cấy vô trùng được thực hiện tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường 7, Tp. Đà Lạt, Tỉnh Lâm Đồng).

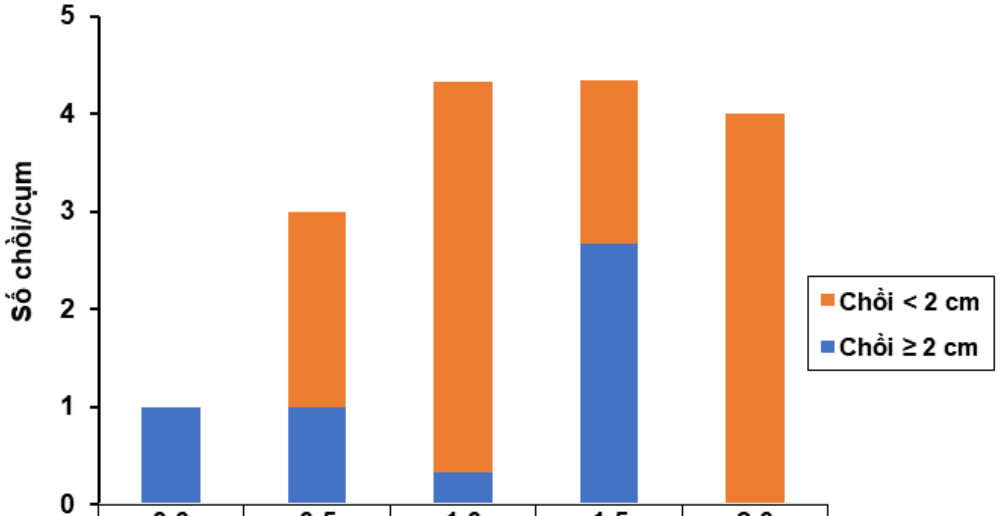
Thí nghiệm trồng cây trên đồng ruộng được thực hiện tại vườn của hộ gia đình cô Trần Kim Phượng chuyên canh trồng cây Artichoke (Tự Tạo 3, Phước Thành - Trại Mát, Phường 11, Tp. Đà Lạt, Tỉnh Lâm Đồng).

PHẦN 3:

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA BA VÀ KIN LÊN KHẢ NĂNG NHÂN NHANH CHỒI CÂY ARTICHOKE GIỐNG TÍM VÀ GIỐNG XANH NUÔI CẤY *IN VITRO*

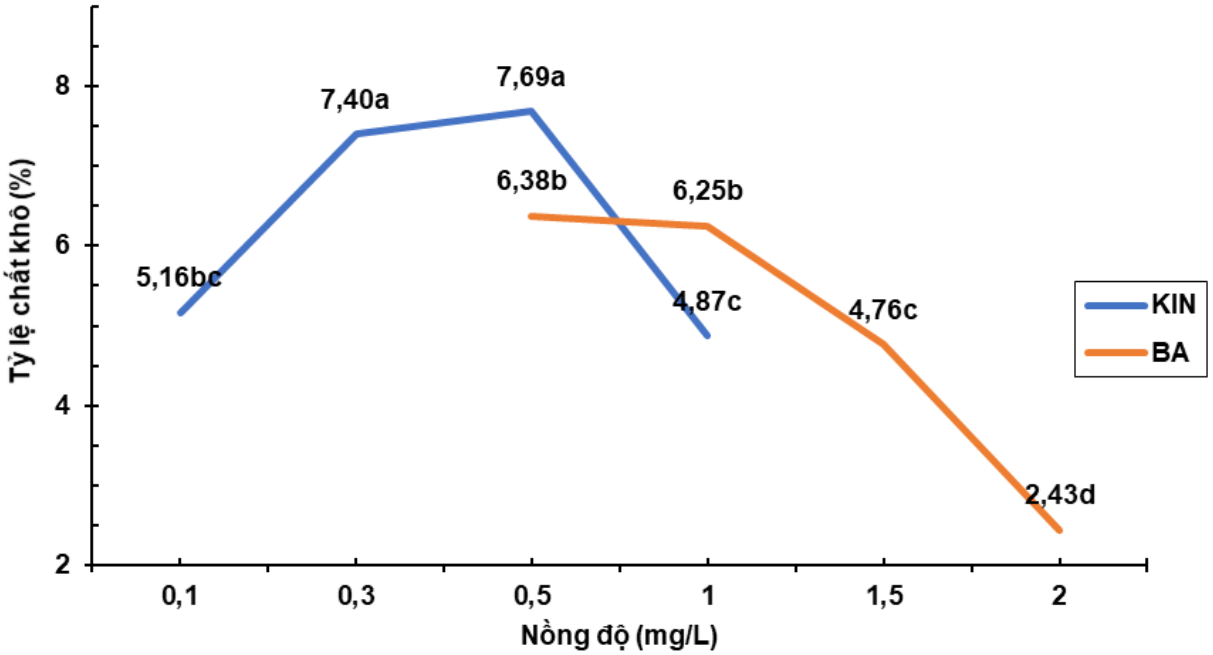
Sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh chồi bổ sung BA và KIN, hiệu quả nhân chồi cây Artichoke giống tím đã được ghi nhận và trình bày ở bảng 3.1, biểu đồ 3.1, 3.2 và hình 3.1.



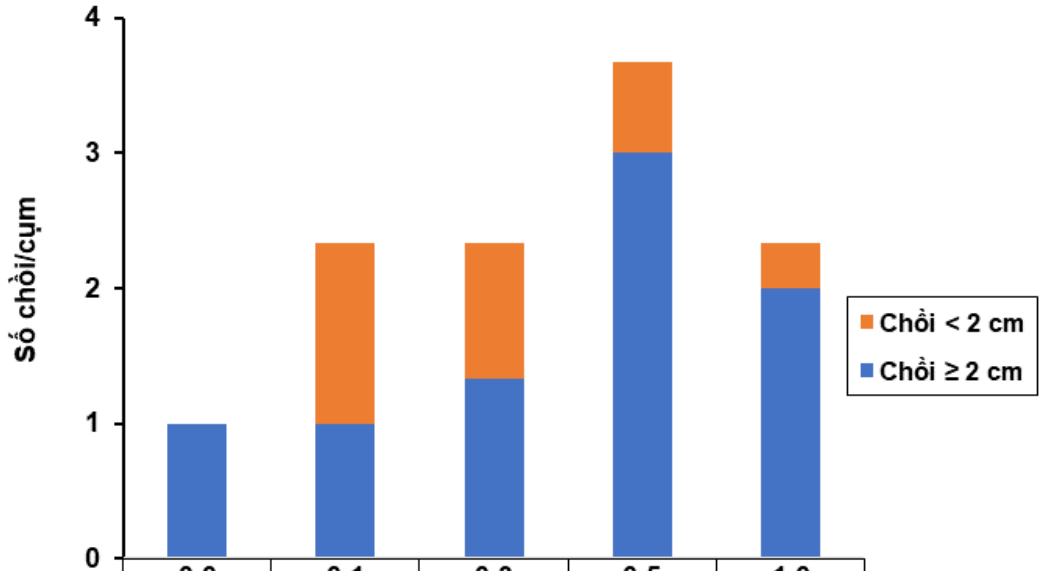
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Chồi < 2 cm	0,00	2,00	4,00	1,67	4,00
Chồi ≥ 2 cm	1,00	1,00	0,33	2,67	0,00

Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy.

Trên giống Artichoke tím, số lượng chồi thu được nhiều nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L BA (gấp 4,3 lần so với đối chứng). Tuy nhiên, môi trường nuôi cấy có chứa BA đã giảm đáng kể các chỉ tiêu về chất lượng chồi như chiều cao chồi (Biểu đồ 3.1), chiều dài lá, chiều rộng lá và tỷ lệ tích lũy chất khô của cụm chồi so với đối chứng (Bảng 3.1). Cụ thể, hơn 38% số chồi có chiều cao < 2 cm được ghi nhận trên môi trường chứa 1,5 mg/L BA và 100% trên môi trường chứa 2,0 mg/L BA. Hơn nữa, quan sát hình thái cho thấy, các chồi được nhân nhanh trong nghiệm thức 1,5 mg/L và 2,0 mg/L BA bị hiện tượng thủy tinh thể, đồng thời TLCK của cụm chồi chỉ đạt 4,76% và 2,43%; tương ứng (Biểu đồ 3.2). Mặc dù, môi trường bổ sung BA kích thích gia tăng đáng kể số lượng chồi nhưng lại làm giảm chất lượng chồi được nhân nhanh.



Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của BA và KIN lên khả năng tích lũy chất khô của cụm chồi cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy.



	0,0	0,1	0,3	0,5	1,0
Chồi < 2 cm	0,00	1,33	1,00	0,67	0,33
Chồi ≥ 2 cm	1,00	1,00	1,33	3,00	2,00

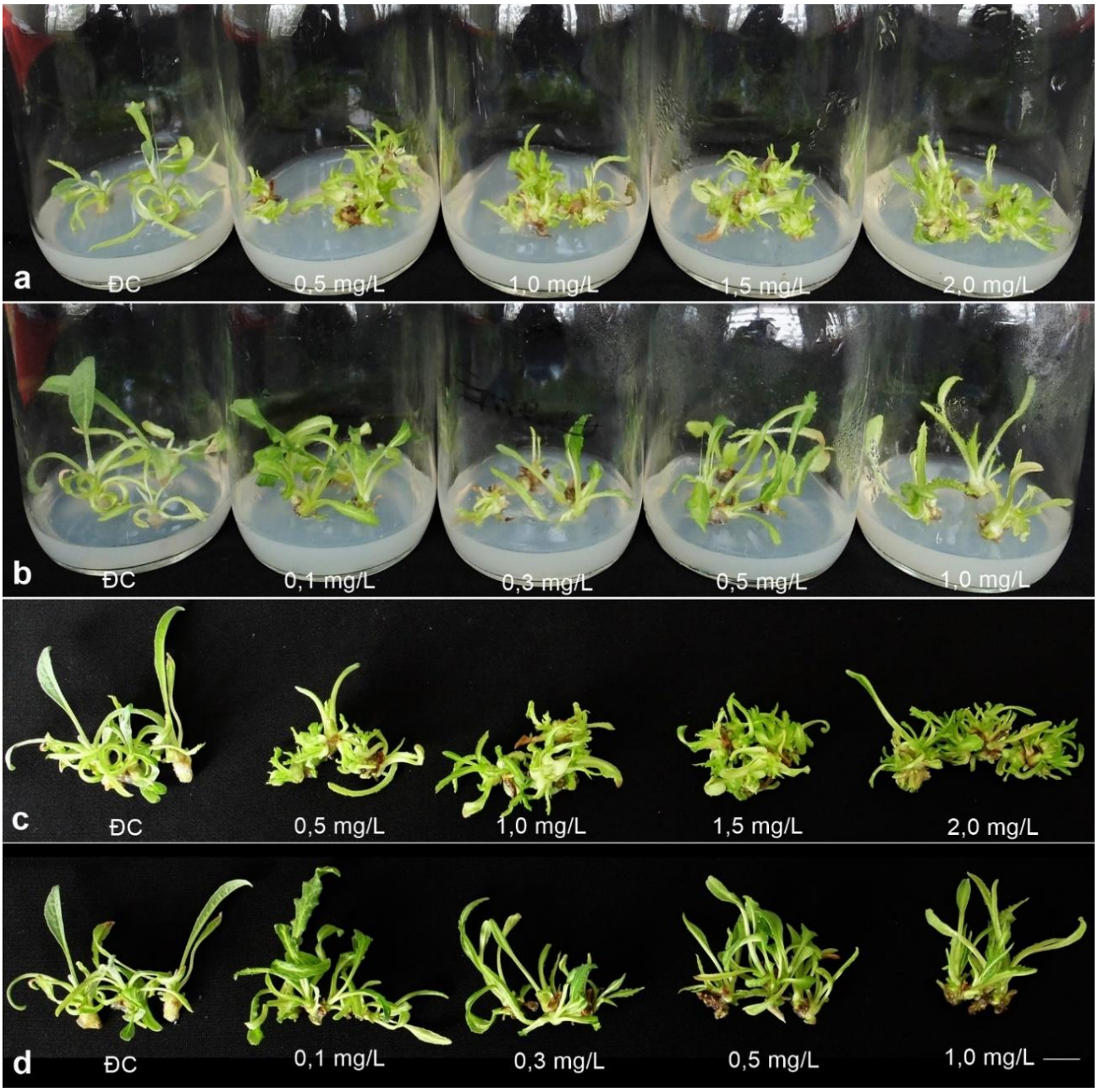
Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng của KIN lên khả năng nhân nhanh chồi cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy.

Trên môi trường bổ sung KIN, hiệu quả nhân chồi ở nghiệm thức 0,5 mg/L KIN (3,67 chồi) cao gấp 3,6 lần so với đối chứng, cũng như không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L BA (4,34 chồi). Quan sát hình thái cho thấy, chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung KIN, có kích thước đồng đều nhau, chồi to, khỏe và lá có màu xanh đậm (Hình 3.1). Đặc biệt, hơn 81% số chồi thu được trong nghiệm thức 0,5 mg/L KIN đạt kích thước ≥ 2 cm; điều này chứng tỏ KIN có ảnh hưởng tích cực đến chất lượng chồi. Ngoài ra, TLCK của các cụm chồi được nhân nhanh trên môi trường chứa KIN đều cao hơn đáng kể so với cả nghiệm thức đối chứng và so với nghiệm thức môi trường có bổ sung BA (Biểu đồ 3.2). Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng nồng độ KIN (1 mg/L) thì hiệu quả nhân chồi (Biểu đồ 3.3) và một số chỉ tiêu sinh trưởng giảm dần (Bảng 3.1). Kết quả này tương tự như một số nghiên cứu về vai trò của KIN trong việc thúc đẩy sự phát triển chồi trong giai đoạn nhân nhanh (Gomes và cs., 2010; Kaviani và cs., 2011).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của BA và KIN lên khả năng nhân nhanh chồi cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy.

Cyto	Nồng độ (mg/L)	Tổng số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Ghi chú
ĐC	0	1,00e*	3,97ab	3,35b	0,63b	0,45b	0,03b	Chồi nhỏ dài, lá to
KIN	0,1	2,33d	4,73a	4,01a	0,97a	0,48b	0,02c	Chồi nhỏ dài, lá xanh
	0,3	2,33d	2,43cd	1,81de	0,27cde	0,54ab	0,04a	Chồi không đồng đều, lá nhỏ
	0,5	**3,67b**	**4,23ab**	**3,63ab**	**0,67b**	**0,52ab**	**0,04a**	**Chồi đều, to khỏe, lá xanh**
	1,0	2,33d	3,17bc	2,50c	0,53bc	0,41b	0,02c	Chồi to dài, lá nhỏ
BA	0,5	3,00c	1,73d	1,10f	0,27cde	0,47b	0,03b	Chồi thấp, lá nhỏ
	1,0	4,33a	1,97cd	1,33ef	0,27cde	0,48b	0,03b	Chồi thấp, lá xoăn
	1,5	4,44a	2,53cd	1,88d	0,23de	0,63ab	0,03b	Chồi thấp, bị thủy tinh thể
	2,0	4,00ab	1,93cd	1,30ef	0,18e	0,82a	0,02c	Chồi thấp, bị thủy tinh thể

Ghi chú: **Những ký tự khác nhau (a, b, c…) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.*
(Cyto: Cytokinin).

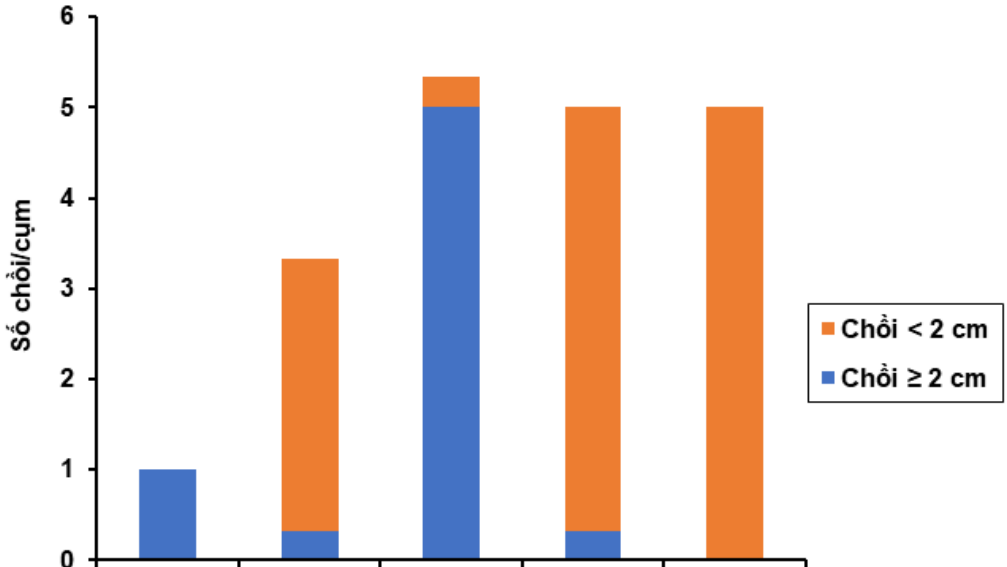


Hình 3.1. Ảnh hưởng của BA và KIN lên khả năng nhân chồi cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy. *Thanh bar = 1 mm*.

a, c: Trên môi trường bổ sung BA.

b, d: Trên môi trường bổ sung KIN.

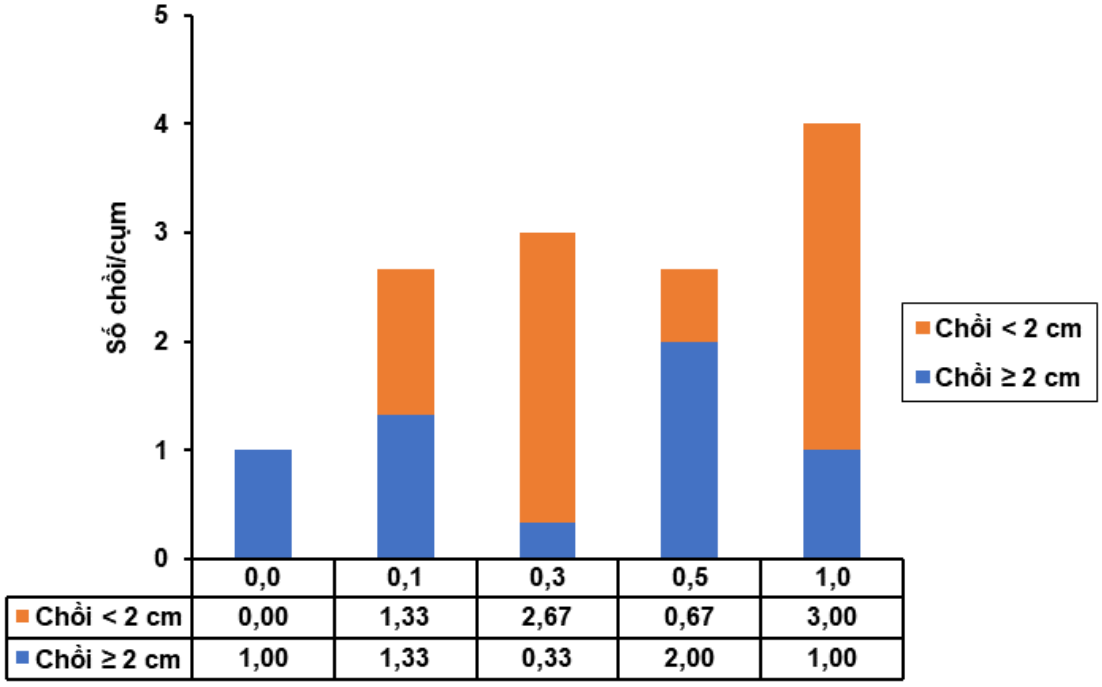
Đối với cây Artichoke giống xanh kết quả ghi nhận được cho thấy hiệu quả nhân chồi và chất lượng chồi có sự khác biệt đáng kể giữa nghiệm thức bổ sung BA và KIN với nhau cũng như khi so sánh với đối chứng (Biểu đồ 3.4, 3.5; Bảng 3.2 và Hình 3.2).



	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Chồi < 2 cm	0,00	3,00	0,33	4,67	5,00
Chồi ≥ 2 cm	1,00	0,33	5,00	0,33	0,00

Biểu đồ 3.4. Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy.

Trên môi trường bổ sung BA, số lượng chồi đạt cao nhất khi bổ sung 1,0 mg/L BA (gấp 5,33 lần so với đối chứng). Ngoài ra, các chồi Artichoke giống xanh nuôi cấy trên môi trường có chứa 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/L BA không có hiện tượng bị thủy tinh thể và các hình thái bất thường (Hình 3.2) gây giảm chất lượng của chồi được nhân nhanh; trong khi kết quả ngược lại đã được ghi nhận trên giống Artichoke tím; điều này chứng tỏ sự đáp ứng khác nhau của hai giống Artichoke trên cùng một loại môi trường nuôi cấy. Không chỉ gia tăng đáng kể hiệu quả nhân chồi, hình thái chồi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/L BA có kích thước đồng đều nhau, chồi to, khỏe (Hình 3.2); cụ thể, hơn 93% số chồi thu được trong nghiệm thức này có kích thước ≥ 2 cm (Biểu đồ 3.4).



	0,0	0,1	0,3	0,5	1,0
Chồi < 2 cm	0,00	1,33	2,67	0,67	3,00
Chồi ≥ 2 cm	1,00	1,33	0,33	2,00	1,00

Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng của KIN lên khả năng nhân nhanh chồi cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy.

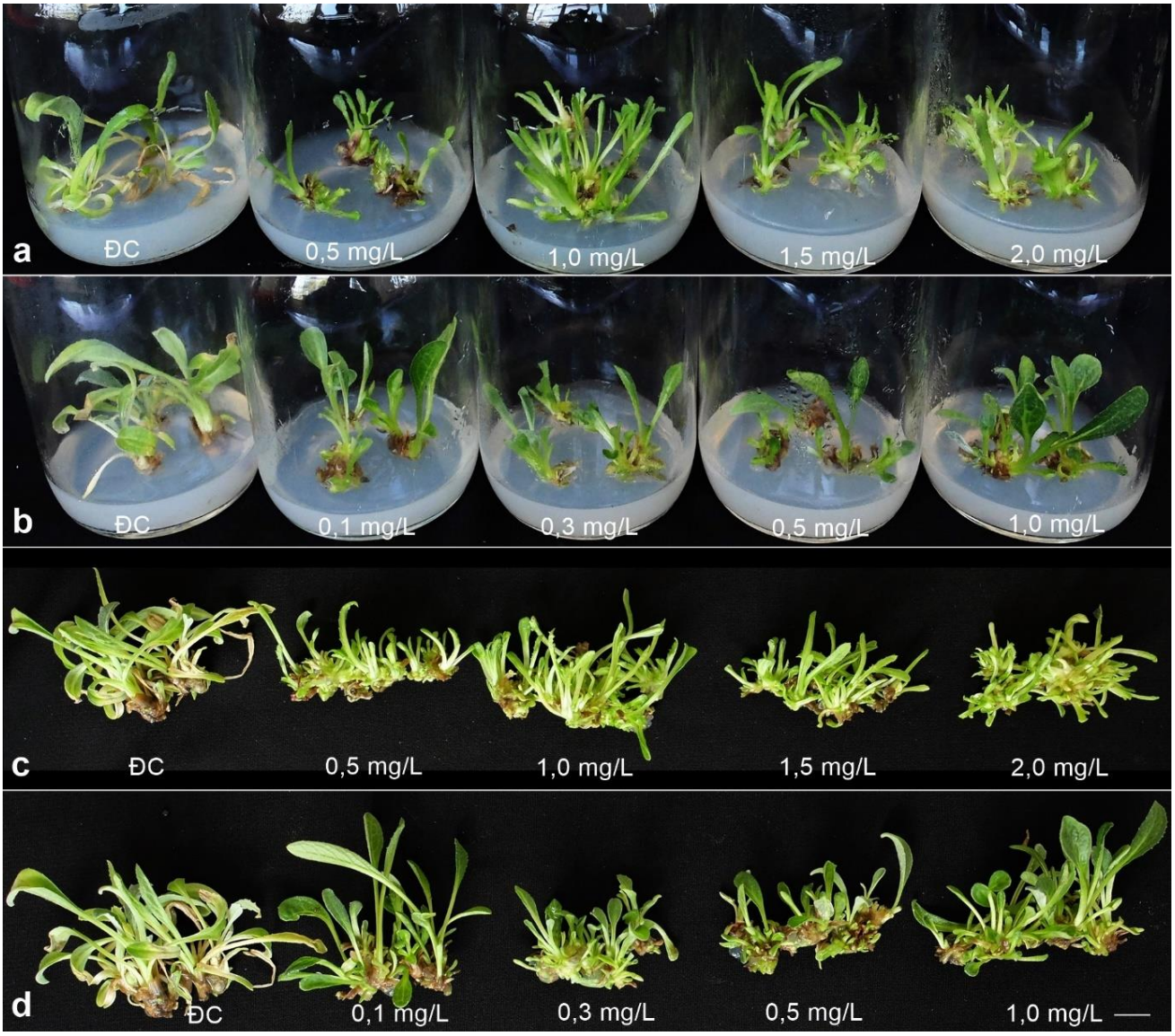
Trên môi trường bổ sung KIN, hiệu quả nhân chồi ở nồng độ 1,0 mg/L KIN (4,00 chồi) cao gấp 4,00 lần so với đối chứng (Biểu đồ 3.5); tuy nhiên, chỉ 25% số chồi của nghiệm thức này đạt chiều cao ≥ 2 cm, thấp hơn đáng kể so với nghiệm thức 0,5 mg/L KIN (74%). Trong khi hiệu quả nhân chồi thấp hơn ở các nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5 mg/L KIN (2,67; 3,00 và 2,67 chồi) cũng như không có sự khác biệt đáng kể giữa chúng (Bảng 3.2). Bên cạnh đó, hình thái chồi được nuôi cấy trên môi trường chứa KIN cũng thể hiện sự khác biệt đáng kể so với nghiệm thức bổ sung BA và đối chứng (Hình 3.2); chồi nhỏ, dài, lá to có màu xanh đậm.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BA hoặc KIN lên khả năng nhân nhanh chồi cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy.

Cyto	Nồng độ (mg/L)	Tổng số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Tỷ lệ chất khô (%)	Ghi chú
ĐC	0	1,00d*	4,70a	3,99a	0,57a	0,47bc	0,03abcd	6,38b	Chồi nhỏ dài, xuất hiện nhiều lá vàng
KIN	0,1	2,67cd	4,10ab	3,42b	0,53ab	0,67abc	0,05a	7,46a	Chồi nhỏ dài, lá xanh
	0,3	3,00bcd	2,90c	2,37d	0,41c	0,61abc	0,04abcd	6,55b	Chồi không đồng đều
	0,5	2,67cd	3,13bc	2,80c	0,43c	0,47bc	0,03cd	6,38b	Chồi không đồng đều
	1,0	4,00abc	3,60abc	2,76c	0,51b	0,64abc	0,03bcd	4,68cd	Chồi to dài, lá xanh
BA	0,5	3,33bcd	2,83c	2,11e	0,30d	0,78ab	0,04abc	5,12c	Chồi không đồng đều
	1,0	**5,33a**	**3,60abc**	**2,83c**	**0,42c**	**0,81a**	**0,05ab**	**6,17b**	**Chồi đều, to khỏe**
	1,5	5,00ab	3,43bc	2,79c	0,28d	0,48bc	0,03cd	6,25b	Chồi thấp, bị thủy tinh thể
	2,0	5,00ab	2,63c	2,74c	0,29d	0,42c	0,02d	4,76cd	Chồi thấp, lá nhỏ

Ghi chú: **Những ký tự khác nhau (a, b, c…) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.*

(Cyto: Cytokinin).



Hình 3.1. Ảnh hưởng của BA hoặc KIN lên khả năng nhân chồi cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy. *Thanh bar = 1 mm*.

a, c: Trên môi trường bổ sung BA.

b, d: Trên môi trường bổ sung KIN.

Cytokinin đóng vai trò rất trong sự phát triển của thực vật bởi sự thúc đẩy phân chia và mở rộng tế bào, kích thích sinh tổng hợp protein; do đó, cytokinin được sử dụng rộng rãi cho mục đích nhân nhanh chồi nâng cao hiệu quả vi nhân giống. Trong đó, BA và KIN là 2 loại cytokinin được sử dụng phổ biến nhất trong vi nhân giống cây Artichoke (El-Zeiny và cs., 2013; Catacora và cs., 2019). Trong nghiên cứu này, cả BA và KIN đều ảnh hưởng tích cực lên hiệu quả nhân nhanh chồi cây Artichoke. Tuy nhiên, BA kích thích tạo chồi Artichoke nhiều hơn so với môi trường bổ sung KIN; kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Brutti và cộng sự (2000); El-Zeiny và cộng sự (2013).

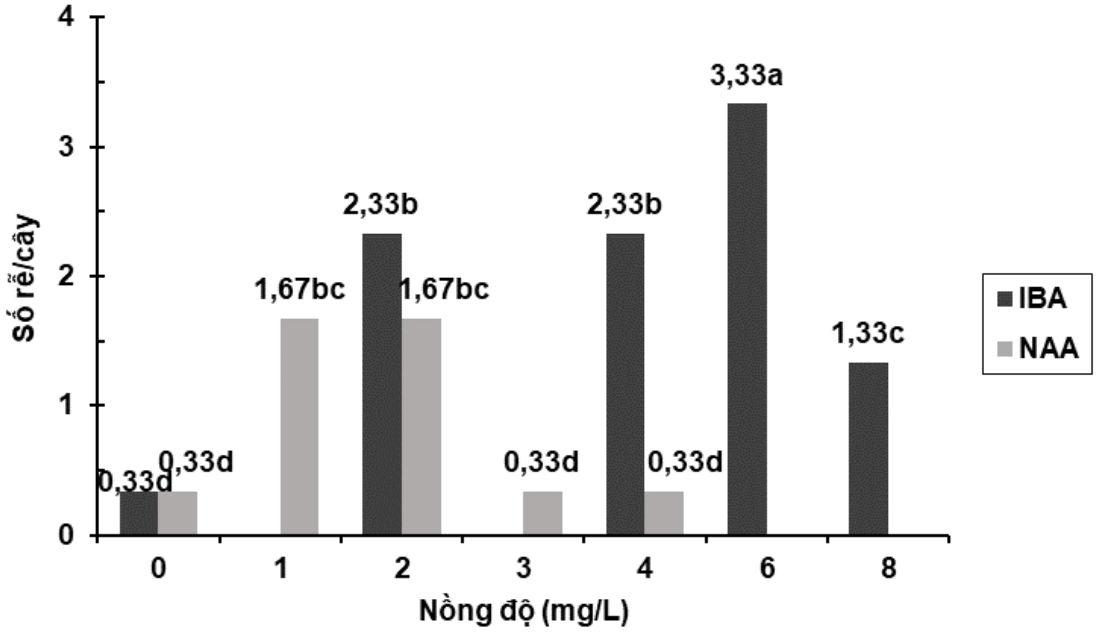
Đối với cây Artichoke giống tím, mặc dù BA kích thích gia tăng số lượng chồi; tuy nhiên, BA cũng là nguyên nhân chính gây hiện tượng thủy tinh thể làm giảm chất lượng chồi. Điều này chứng tỏ, BA không thích hợp cho giai đoạn nhân nhanh Artichoke giống tím. Cactacora và cộng sự (2019) đã báo cáo rằng, chồi của 3 giống Artichoke (L - 142, L - 70, L - 200) bị thủy tinh thể với tỷ lệ cao (66,7%; 50,0%; 33,3%, lần lượt) trên môi trường có bổ sung BA. Trong khi KIN không chỉ kích thích gia tăng số lượng mà còn cải thiện đáng kể chất lượng chồi. Đã có nhiều nghiên cứu trên các giống Artichoke khác nhau chỉ ra rằng KIN cải thiện đáng kể chất lượng chồi trong giai đoạn nhân nhanh (Tavazza và cs., 2004; Apóstolo và cs., 2005; Schneider, 2005; Bekheet, 2007). Do đó, các chồi Artichoke giống tím chất lượng nhân nhanh trên môi trường bổ sung 0,5 mg/L KIN được sử dụng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả ghi nhận được trên giống Artichoke xanh tương tự như giống tím khi cho hiệu quả nhân chồi tốt hơn trên môi trường chứa BA; mặt khác, BA cũng cải thiện đáng kể chất lượng chồi được nhân nhanh thể hiện qua các chỉ tiêu về sinh trưởng đã được ghi nhận. Do đó, các chồi Artichoke giống xanh thu được trên môi trường bổ sung 1,0 mg/L BA được sử dụng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả từ thí nghiệm này cho thấy, hiệu quả nhân chồi và chất lượng chồi cây Artichoke không chỉ phụ thuộc vào điều kiện môi trường nuôi cấy mà còn phụ thuộc vào loại giống (kiểu gen) (Bedini và cs., 2012; Iapichino, 2012; Catacora và cs., 2019).

3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA IBA HOẶC NAA LÊN KHẢ NĂNG RA RỄ CÂY ARTICHOKE GIỐNG TÍM VÀ GIỐNG XANH NUÔI CẤY *IN VITRO*

Sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường bổ sung IBA và NAA, hiệu quả ra rễ cây Artichoke giống tím đã được ghi nhận và trình bày ở bảng 3.3, biểu đồ 3.4, 3.2; hình 3.3.



Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng của IBA hoặc NAA lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy.

Trên môi trường bổ sung IBA, hiệu quả ra rễ ở nồng độ 6,0 mg/L IBA (3,33 rễ) cao gấp 10,09 lần so với đối chứng; trong khi hiệu quả ra rễ thấp hơn ở các nồng độ thấp hơn 2,0 và 4,0 mg/L IBA đều đạt 2,33 rễ; tuy nhiên, khi gia tăng nồng độ IBA lên 8 mg/L hiệu quả ra rễ đã giảm rõ rệt (1,33 rễ). Quan sát hình thái cho thấy, rễ được hình thành trên môi trường bổ sung 2 mg/L IBA có cấu trúc xốp rời, dễ gãy và bị hoại tử ngay trên môi trường nuôi cấy; trong khi hình thái rễ hoàn toàn bình thường trong môi trường bổ sung nồng độ IBA cao hơn (Hình 3.3). Đặc biệt, rễ to và dài khi được hình thành trên môi trường chứa 6,0 mg/L IBA đã được quan sát; cũng như chất lượng cây được cải thiện đáng kể thông qua các chỉ tiêu về chiều cao cây, chiều dài rễ, khối lượng

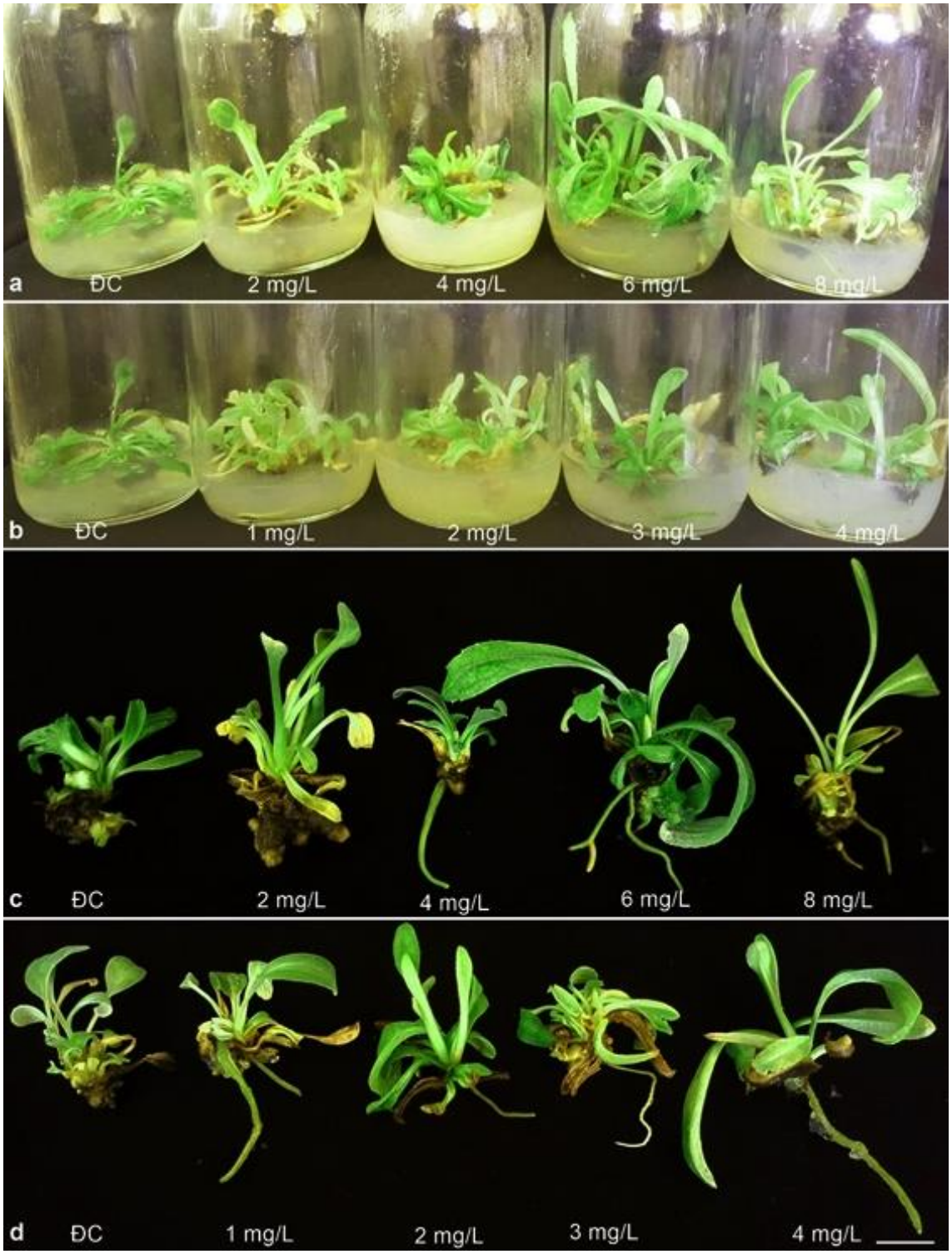
tươi và khối lượng khô khi so sánh với đối chứng và các nghiệm thức còn lại (Bảng 3.3).

Kết quả ghi nhận trên môi trường bổ sung NAA cho thấy, nồng độ 3,0 và 4,0 mg/L NAA đều không mang lại hiệu quả ra rễ Artichoke giống tím (0,33 rễ cả hai nồng độ); trong khi, ở nồng độ thấp hơn 1,0 và 2,0 mg/L NAA hiệu quả ra rễ chỉ cải thiện không đáng kể khi so sánh với đối chứng và nghiệm thức IBA (Bảng 3.3). Quan sát hình thái cho thấy, trên môi trường chứa 1,0 và 4,0 mg/L NAA rễ to và dài; tuy nhiên, cây yếu, mềm và lá úa vàng. Trong khi, trên môi trường chứa 2,0 và 3,0 mg/L NAA rễ mỏng, dài và dễ gãy cũng như các cây con này sẽ gặp khó khăn trong quá trình thích nghi và thuần dưỡng ngoài vườn ươm.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của IBA hoặc NAA lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy.

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	SPAD (nmol/cm²)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Ghi chú
ĐC	**0**	5,23bcd*	15,00d	0,18f	34,37ab	0,39c	0,03c	Cây nhỏ, rễ ít và ngắn, có phát sinh thêm chồi bên
IBA	**2,0**	4,90cd	60,00b	1,42e	35,33ab	0,44bc	0,04bc	Cây cao, có lá vàng, rễ ngắn, xốp hoại tử
	4,0	4,30d	58,33b	2,41c	37,23a	0,41bc	0,0bc	Cây thấp yếu, lá nhỏ, rễ to
	6,0	**6,77a**	75,00a	**2,53b**	**37,97a**	**0,58a**	**0,05a**	**Cây cao khỏe, lá xanh, rễ to dài**
	8,0	5,93ab	40,00c	2,11d	28,83c	0,47bc	0,04bc	Cây cao yếu, lá dài, rễ mỏng dài
NAA	**1,0**	5,33bc	60,00b	2,39c	31,60bc	0,41bc	0,03c	Cây nhỏ yếu, lá vàng úa, rễ to dài
	2,0	5,43bc	53,33b	2,12c	34,30ab	0,47bc	0,04bc	Cây cao khỏe, lá xanh, rễ mỏng dài
	3,0	5,87abc	56,67b	2,21c	36,07ab	0,49b	0,04ab	Cây thấp yếu, lá vàng, rễ mỏng dài
	4,0	6,73a	43,33c	3,15a	28,63c	0,57a	0,05a	Cây cao yếu, lá hơi ngả vàng, rễ to dài

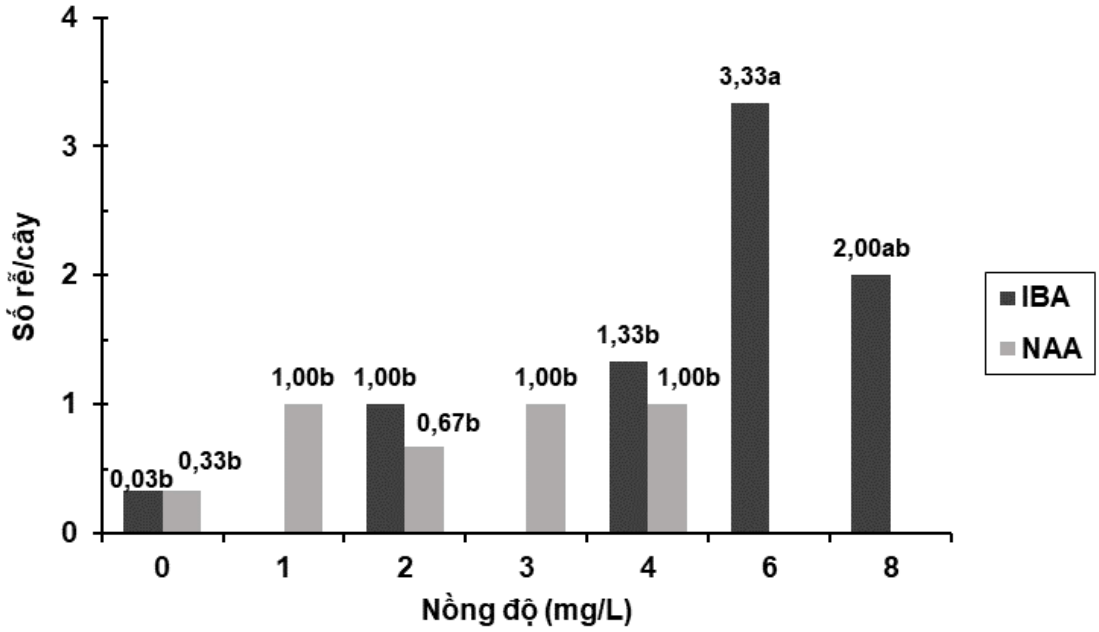
Ghi chú: **Những ký tự khác nhau (a, b, c…) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.*



Hình 3.3. Ảnh hưởng của IBA hoặc NAA lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy. *Thanh bar = 1 mm*.
a, c: Trên môi trường bổ sung BA.

b, d: Trên môi trường bổ sung Kin.

Đối với cây Artichoke giống xanh, kết quả ghi nhận được cho thấy nồng độ 1,0; 2,0; 3,0 và 4,0 mg/L NAA không hiệu quả trong việc kích thích ra rễ cây Artichoke giống xanh; trong khi ở nồng độ 6,0 mg/L IBA hiệu quả ra rễ và chất lượng cây con được cải thiện đáng kể so với đối chứng (Biểu đồ 3.5; Bảng 3.4; Hình 3.4).



Biểu đồ 3.7. Ảnh hưởng của IBA hoặc NAA lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy.

Trên môi trường bổ sung IBA, hiệu quả ra rễ ở nồng độ 6,0 mg/L IBA (3,33 rễ) cao gấp 10,09 lần so với đối chứng; kết quả này tương đồng với kết quả ghi nhận được trên giống tím trên cùng loại môi trường và thời gian nuôi cấy. Trong khi hiệu quả ra rễ thấp hơn ở các nồng độ thấp hơn 2,0 và 4,0 mg/L IBA (1,00 và 1,33 rễ; tương ứng). Khi gia tăng nồng độ IBA lên 8 mg/L hiệu quả ra rễ giảm chỉ còn 2,00 rễ. Quan sát hình thái cho thấy, rễ được hình thành trên môi trường bổ sung 2,0; 4,0; 8,0 mg/L IBA nhỏ mỏng và ngắn, dễ gãy. Ngược lại, rễ trên môi trường bổ sung 6,0 mg/L BA có hình thái to, dài chắc chắn dễ dàng thuần dưỡng ngoài vườn ươm (Hình 3.4).

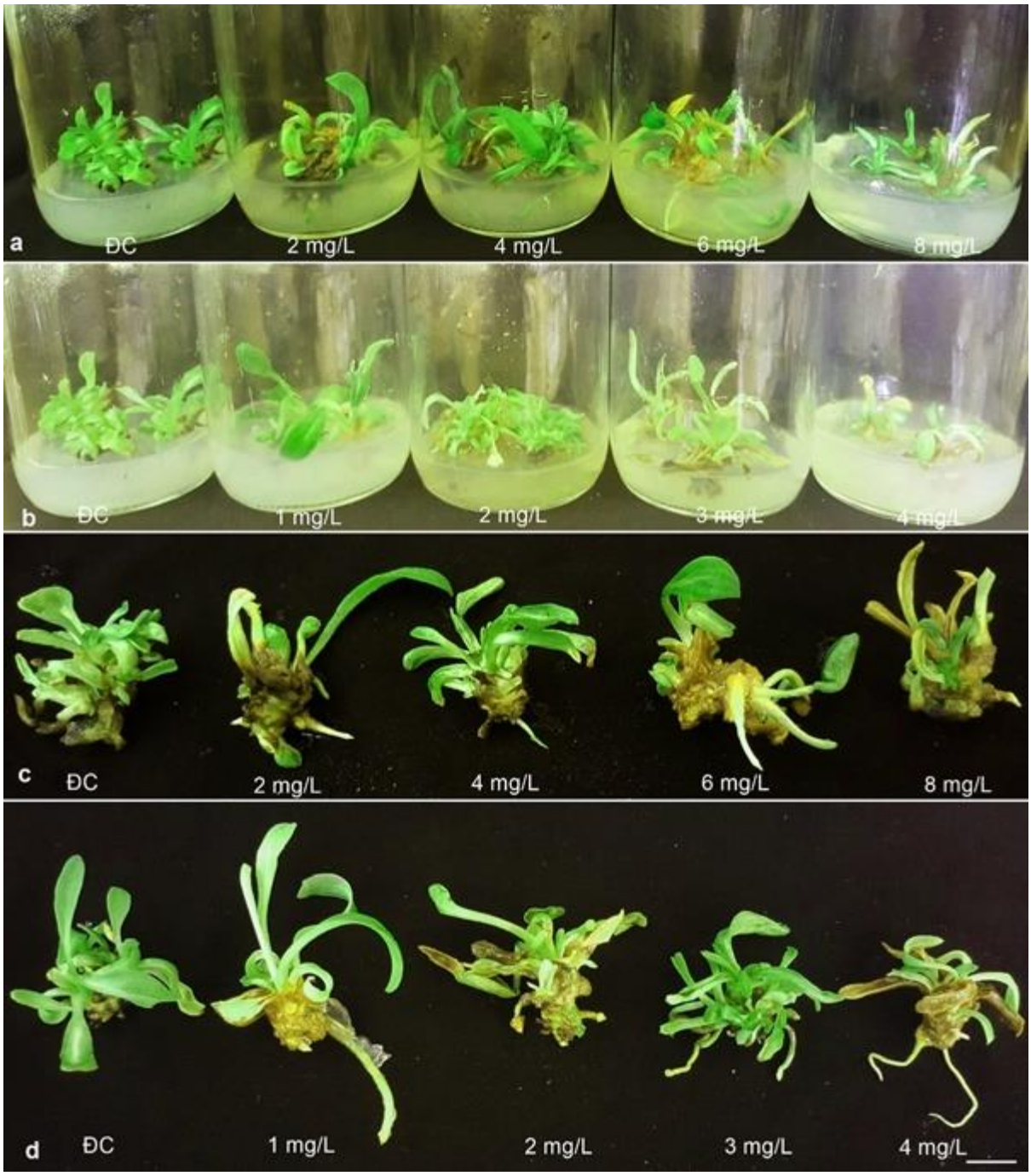
Trên môi trường bổ sung 1,0 mg/L NAA, rễ được hình thành có hình thái to dài, tuy nhiên, gốc cây có sự hình thành mô sẹo (Hình 3.4) điều này gây ảnh hưởng đến sự hấp thu dinh dưỡng của cây cũng như dễ gây thối và hoại tử khi đưa cây ra trồng ở vườn

ươm. Trong khi ở các nồng độ cao hơn 2,0; 3,0 và 4,0 mg/L NAA rễ được hình thành với hình thái tương đồng nhau, rễ nhỏ và mỏng giòn, dễ gãy; hơn nữa các cây con được ra rễ trên môi trường chứa NAA có chiều cao cây, hàm lượng diệp lục thấp hơn so với đối chứng và nghiệm thức IBA cũng đã được ghi nhận (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của IBA hoặc NAA lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy.

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	SPAD (nmol/cm^2)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Ghi chú
ĐC	**0**	5,40bc*	16,67e	0,20b	25,80b	0,42ab	0,04ab	Cây nhỏ, rễ ít và ngắn, có phát sinh thêm chồi bên
IBA	**2,0**	5,33bc	36,67d	0,77ab	34,17a	0,41abc	0,034abc	Cây cao yếu, hơi vàng úa, rễ mỏng ngắn
	4,0	5,60ab	41,67bc	0,87ab	34,60a	0,50a	0,05a	Cây cao khỏe, lá xanh, rễ mỏng nhỏ
	6,0	**5,70ab**	51,67a	**2,33a**	**36,77a**	**0,49a**	**0,05a**	**Cây cao khỏe, lá xanh, rễ to dài**
	8,0	5,97a	43,33b	0,27b	23,07b	0,32bc	0,03c	Cây thấp yếu, lá vàng úa, rễ mỏng ngắn
NAA	**1,0**	5,10cd	38,33cd	0,40b	34,90a	0,48a	0,04ab	Cây thấp, lá xanh, rễ to dài, có hình thành mô sẹo ở gốc
	2,0	4,85d	36,67d	1,50ab	22,33b	0,31c	0,03bc	Cây cao yếu, lá vàng úa, rễ mỏng nhỏ
	3,0	4,77d	38,33cd	1,00b	23,23b	0,48a	0,04ab	Cây thấp yếu, lá xanh, rễ mỏng nhỏ dài
	4,0	4,73d	38,33cd	1,43ab	21,33b	0,30c	0,03bc	Cây thấp yếu, lá vàng úa, rễ nhỏ dài

Ghi chú: **Những ký tự khác nhau (a, b, c…) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy P ≤ 0,05 trong phép thử Duncan.*



Hình 3.4. Ảnh hưởng của IBA hoặc NAA lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy. *Thanh bar = 1 mm*.
a, c: Trên môi trường bổ sung BA.
b, d: Trên môi trường bổ sung Kin.

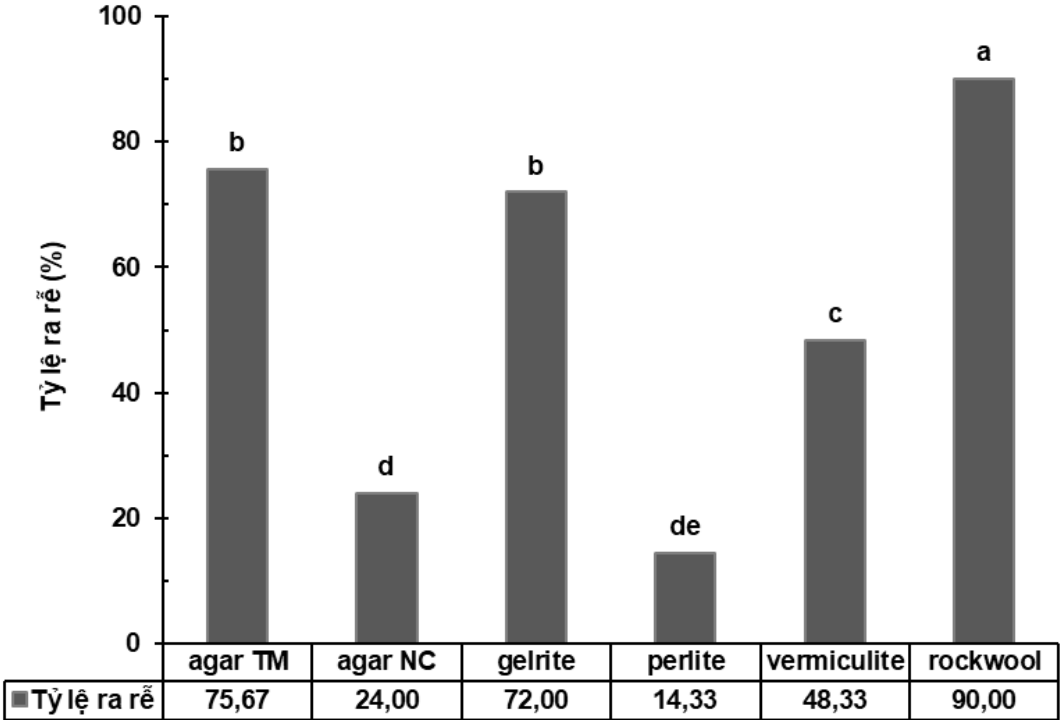
Hiệu quả ra rễ *in vitro* của thực vật phụ thuộc vào kiểu gen và tình trạng sinh lý của mẫu cấy (Martins và Pedrotti, 2001) cũng như, nguồn auxin ngoại sinh đóng vai trò rất quan trọng trong việc nâng cao hiệu quả ra rễ. Trong vi nhân giống Artichoke NAA và IBA là những loại auxin chính được sử dụng phổ biến cho sự hình thành rễ (Ancora và cs., 1981; Ercan và cs., 2016).

Kết quả từ thí nghiệm này cho thấy, số rễ đạt cao nhất khi bổ sung 6,0 mg/L IBA trên cả hai giống Artichoke tím và giống xanh. Tuy nhiên, tỷ lệ ra rễ có sự khác biệt giữa hai giống khoảng 70% - 75% (giống tím) và tỷ lệ thấp hơn khoảng 47% - 52% (giống xanh). Bên cạnh hiệu quả ra rễ, nghiệm thức 6,0 mg/L IBA cũng cải thiện đáng kể chất lượng cây con với sự sinh trưởng cân đối giữa phần chồi và rễ; hơn nữa, rễ được hình thành to khỏe và dài góp phần nâng cao khả năng sống sót, thích nghi ở vườn ươm của cây mô.

Nhiều giống Artichoke đã được nghiên cứu cho tỷ lệ ra rễ tốt trên môi trường bổ sung IBA hơn các loại auxin khác như giống camus de bretagne (30%) (Moncousin, 1980); giống sakiz (33%) và bayrampaşa (16,6%) (Ancora và cs., 1981); giống herious (hơn 90%) (El-Zeiny và cs., 2013); giống blanca de tudela (73,3%), giống calico (80%) và giống Salambo (93,3%) (Lopez-Perez và Martinez, 2015); giống sakiz (63,35%) và bayrampaşa (36,6%) (Ercan và cs., 2016). Tuy nhiên, các nghiên cứu đối tượng cây Artichoke trước đây chủ yếu sử dụng giá thể agar (không phân biệt thương mại hoặc nghiên cứu) trong giai đoạn ra rễ *in vitro* cây Artichoke với kết quả thu được chưa thực sự hiệu quả. Do đó, thí nghiệm tiếp theo đã được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên hiệu quả ra rễ cây Artichoke giống tím và giống xanh. Mặt khác, vấn đề nghiên cứu thay thế giá thể trong giai đoạn ra rễ *in vitro* cây Artichoke hoàn toàn chưa được biết đến trước đây.

3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC LOẠI GIÁ THỂ KHÁC NHAU LÊN KHẢ NĂNG RA RỄ CÂY ARTICHOKE GIỐNG TÍM VÀ GIỐNG XANH NUÔI CẤY *IN VITRO*

Sau 30 ngày nuôi cấy trên các loại giá thể khác nhau, khả năng ra rễ cây Artichoke giống tím đã được ghi nhận và trình bày ở bảng 3.5, biểu đồ 3.6; hình 3.5 và giống xanh được trình bày ở bảng 3.6, biểu đồ 3.7; hình 3.6.



Biểu đồ 3.8. Ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên khả ra rễ cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy.

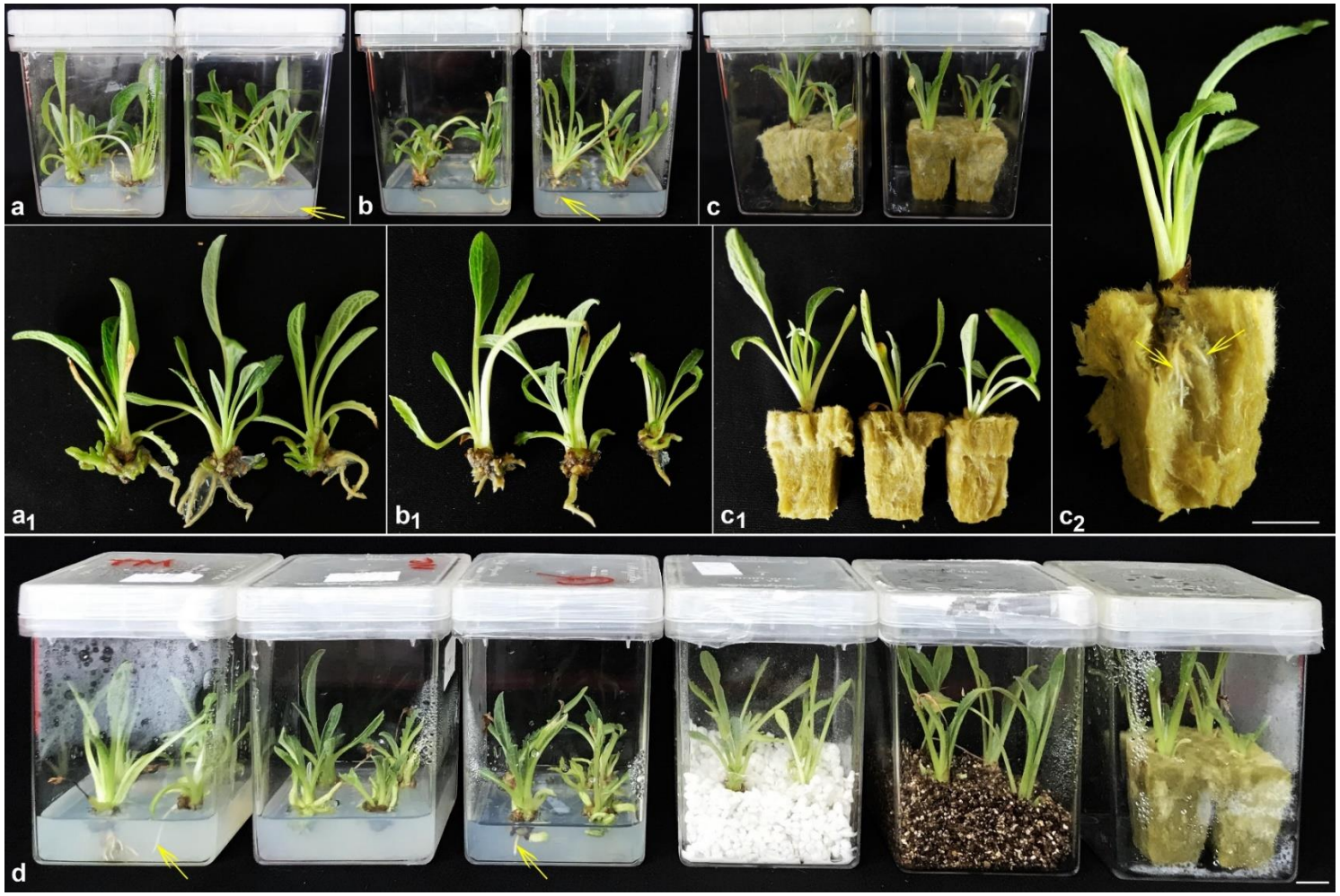
Đối với giống tím, tỷ lệ ra rễ và số rễ/cây đã được cải thiện đáng kể khi sử dụng giá thể rockwool (90,00%; 5,00 rễ) thay thế cho giá thể agar thương mại (75,67%; 3,67 rễ). Tuy nhiên, trên giá thể rockwool, một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây như chiều cao cây, chiều dài lá, chiều rộng lá, khối lượng tươi cây đều giảm đáng kể so với cây trên giá thể agar thương mại (Bảng 3.5). Bên cạnh đó, hình thái rễ hoàn toàn khác nhau trên hai loại giá thể này cũng đã được quan sát (Hình 3.5); hình thái rễ dài, mỏng và nhiều lông hút đã được ghi nhận trên giá thể rocwool; trong khi rễ được hình thành trên giá thể agar dài, to và chắc khỏe. Tuy nhiên, tất cả cây mô Artichoke có rễ đều cho tỷ lệ sống sót rất cao khi chuyển sang điều kiện thuần dưỡng ngoài vườn ươm.

Hiệu quả ra rễ cây Artichoke giống tím trên giá thể gelrite (72,00%; 3,67 rễ) không có sự khác biệt đáng kể so với hiệu quả được ghi nhận trên giá thể agar thương mại; tuy nhiên, gelrite đã hạn chế đáng kể chỉ tiêu về chiều dài rễ (1,77 cm) và khối lượng tươi cây (0,72 g) so với nghiệm thức agar thương mại (3,53 cm; 0,91 g). Bên cạnh đó, hiệu quả ra rễ đã giảm đáng kể trên giá thể agar nghiên cứu, giá thể perlite và giá thể vermiculite cũng đã được ghi nhận (Biểu đồ 3.6; Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy.

Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Số lá mới/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	SPAD (nmol/cm²)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Ghi chú
Agar tm	6,17a	3,67b	3,53a	3,00a	5,33a	1,03a	33,53ab	0,91a	0,08a	Rễ dài, to và chắc khỏe
Agar nc	3,10b	0,33d	0,23e	2,00b	2,20c	0,27c	34,53ab	0,47c	0,03c	Rễ ngắn, nhỏ và mềm
Gelrite	5,17ab	3,67b	1,77c	2,67a	5,17ab	0,73ab	36,33ab	0,72b	0,06abc	Rễ ngắn, nhỏ và có phát sinh thêm rễ thứ cấp
Perlite	3,20b	0,67d	0,33e	1,33c	3,50bc	0,40bc	23,93c	0,57c	0,04bc	Rễ ngắn, nhỏ và giòn dễ gãy
Vermiculite	6,33a	1,33c	1,10d	2,33ab	5,33ab	0,87a	38,87a	0,85b	0,07ab	Rễ dài, to và chắc khỏe
Rockwool	**3,83b**	**5,00a**	**3,03b**	**2,67a**	**3,73bc**	**0,29c**	**33,56ab**	**0,44c**	**0,07ab**	**Rễ dài, nhỏ và nhiều lông hút**

Ghi chú: **Những ký tự khác nhau (a, b, c…) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.*
(Agar tm: Agar thương mại; Agar nc: Agar nghiên cứu).



Hình 3.5. Ảnh hưởng của các loại giá thể lên khả năng ra rễ của các các chồi cây Artichoke giống tím sau 30 ngày nuôi cấy. *Thanh bar = 1 mm.*

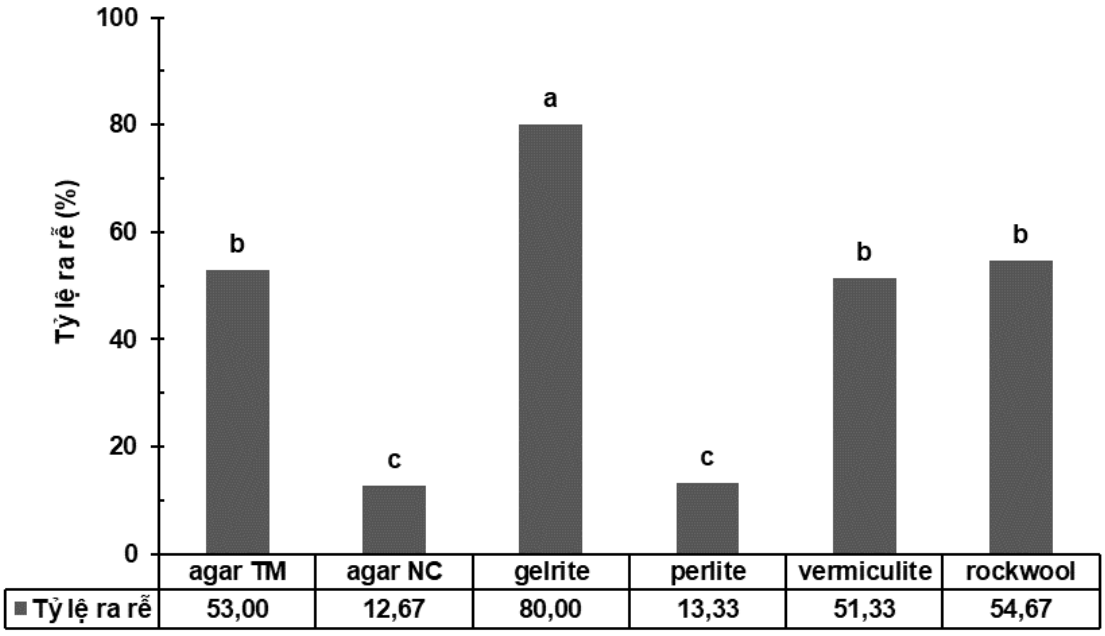
a, a_1: Trên giá thể agar thương mại (*rễ - mũi tên*).

b, b_1: Trên giá thể gelrite.

c, c_1, c_2: Trên giá thể rockwool.

d: Trên giá thể agar thương mại, agar nghiên cứu, gelrite, perlite, vermiculite, rockwool (*từ trái sang phải*).

Đối với giống xanh, hiệu quả ra rễ tốt nhất được ghi nhận trên giá thể gelrite với số rễ/cây (5,00 rễ) và tỷ lệ ra rễ (80,00%) cao gấp 1,36 lần và 1,51 lần so với nghiệm thức agar thương mại (Biểu đồ 3.7; Bảng 3.6). Đặc biệt, cây trên giá thể gelrite có các chỉ tiêu về sinh trưởng như chiều cao cây, chiều dài rễ, số lá mới, chiều dài lá, chiều rộng lá, SPAD, khối lượng tươi và khối lượng khô đều không có sự khác biệt đáng kể so với cây trong nghiệm thức giá thể agar thương mại (Bảng 3.6). Kết quả này chứng tỏ, giá thể đóng vai trò rất quan trọng trong việc cải thiện khả năng ra rễ trên một số giống đối tượng cây Artichoke. Quan sát hình thái cho thấy, trên giá thể gelrite rễ nhỏ và dài; có phát sinh thêm các rễ phụ với tần số ít (dữ liệu không thể hiện), trong khi trên các giá thể khác, không ghi nhận có sự phân nhánh rễ phụ.



Biểu đồ 3.9. Ảnh hưởng của Ki và Ba lên khả năng nhân nhanh chồi cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy.

Trên giá thể vermiculite và rockwool, tỷ lệ ra rễ và số rễ/cây không có sự khác biệt đáng kể so với cây trên giá thể agar (Biểu đồ 3.7; Bảng 3.6). Bên cạnh đó, các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây trong nghiệm thức agar thương mại, vermiculite và rockwool như chiều cao cây, chiều dài rễ, số lá mới, khối lượng tươi và khối lượng khô không có

sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê (Bảng 3.6). Hiệu quả ra rễ cây Artichoke giống xanh đã giảm đáng kể trên giá thể agar nghiên cứu và giá thể perlite (Biểu đồ 3.7; Bảng 3.6); kết quả tương tự đã được ghi nhận trên giống Artichoke tím. Do đó, giá thể agar nghiên cứu và giá thể perlite không phù hợp trong giai đoạn ra rễ *in vitro* cây Artichoke giống tím và giống xanh.

Ra rễ *in vitro* là yêu cầu bắt buộc trong vi nhân giống cây Artichoke, bởi cây mô Artichoke chỉ có khả năng sống sót trong điều kiện vườn ươm khi đã có rễ. Tuy nhiên, hiệu quả ra rễ của các giống cây Artichoke hoàn toàn khác nhau (Lopez-Perez và Martinez, 2015); do đó, đã có nhiều nghiên cứu cải thiện khả năng ra rễ thông qua việc bổ sung các loại và nồng độ auxin khác nhau (Morzadec và cs., 1997; Lopez-Perez và Martinez, 2015). Morzadec và cộng sự (1997) đã báo cáo nhiều giống cây Artichoke khó hình thành rễ ngay cả khi có bổ sung auxin trong môi trường nuôi cấy. Bên cạnh yếu tố hormone (auxin), giá thể nuôi cấy là một trong những yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả ra rễ *in vitro* của thực vật (Newell, 2006). Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy hiệu quả ra rễ của cây Artichoke giống tím đạt cao nhất trên giá thể rockwool. Có thể giải thích do cấu trúc xốp của giá thể rockwool đã cung cấp nhiều oxy hơn cho sự phát triển hệ thống rễ.

Nhiều nghiên cứu có sẵn chỉ ra rằng giá thể agar ngăn cản sự tiếp xúc của rễ với oxy dẫn đến giảm hiệu quả ra rễ (Newell, 2006; Labrousse và cs., 2012; Barpete và cs., 2014; Wafaa và cs., 2017). Tuy nhiên, hiệu quả ra rễ của cả giống Artichoke tím và giống xanh đều cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa nghiệm thức giá thể agar thương mại và giá thể agar nghiên cứu; điều này chứng tỏ oxy không phải là yếu tố duy nhất ảnh hưởng đến hiệu quả ra rễ cây Artichoke giống tím và giống xanh. Một yếu tố khác có thể liên quan được đề cập là mức độ truyền suốt ánh sáng của giá thể; bởi đối với cây Artichoke giống xanh, giá thể gelrite cho hiệu quả ra rễ tốt nhất cũng như, gelrite là loại giá thể có độ truyền suốt ánh sáng tốt hơn so với các giá thể khác. Trong khi rễ là cơ quan thường phát triển trong môi trường tối. Gelrite được biết đến như một loại giá thể cải thiện đáng kể hiệu quả ra rễ trên một số đối tượng như cây Bạch đàn (MacRae

và cs., 1990), cây Khoai tây (Veramendi và cs., 1997), cây Mâm xôi đen (Tsao và cs., 2002), cây Chuối (Nandhakumar và cs., 2017), cây Cọ dầu (Palanyandy và cs., 2020) và cây Hạt phỉ lai (Nicholson và cs., 2020). Bên cạnh đó, gelrite là loại giá thể phổ biến được bán rộng rãi với giá thành ở mức trung bình có thể sử dụng được khi mở rộng quy mô sản xuất. Do đó, nghiên cứu này đề xuất việc sử dụng giá thể gelrite cho mục đích ra rễ cây Artichoke giống xanh.

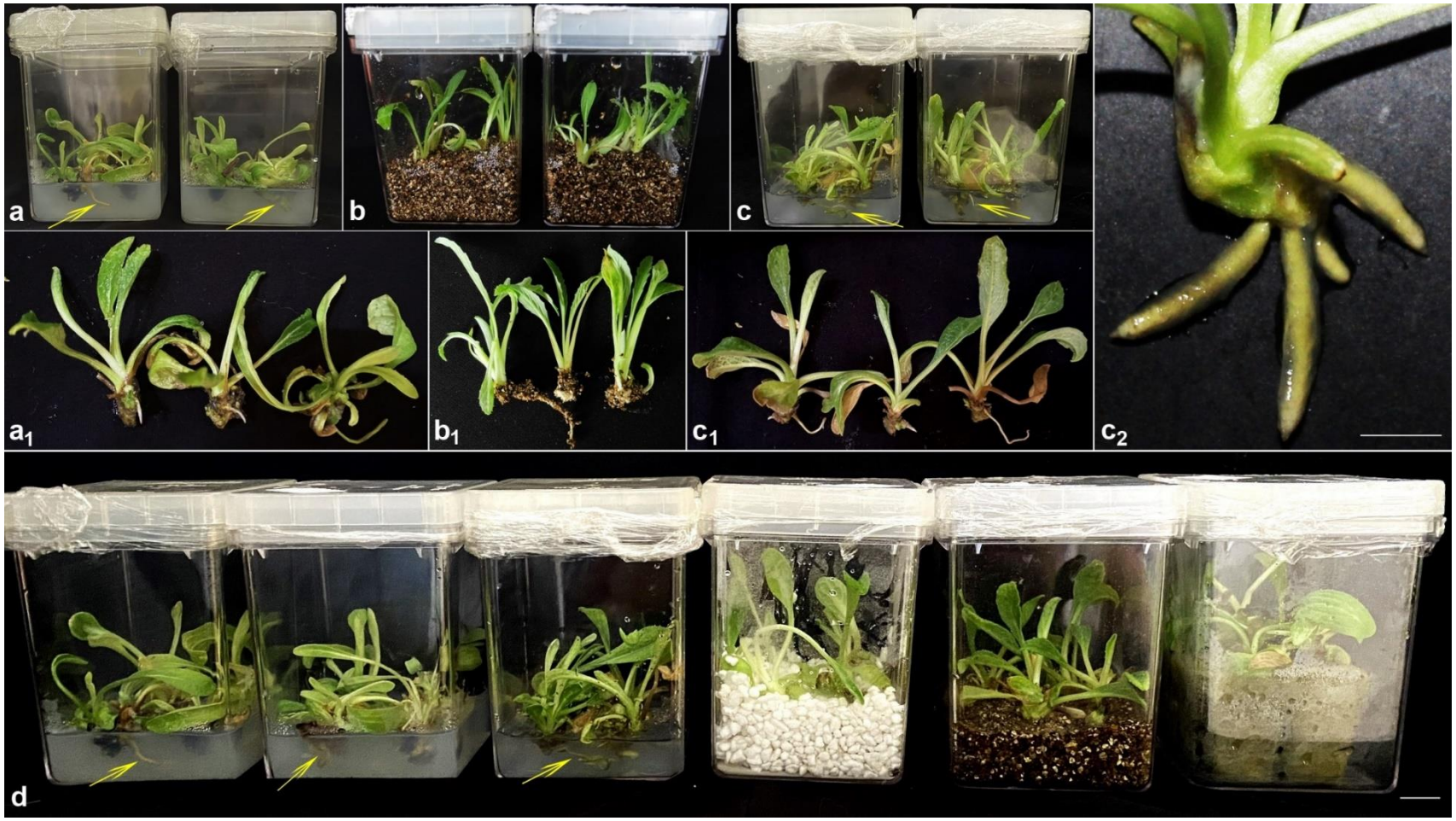
Ngoài hiệu quả ra rễ đạt được, giá thành của các loại giá thể cũng là quan tâm hàng đầu của các nhà nhân giống. Giá thể rockwool từ lâu đã được sử dụng thay thế cho giá thể agar nhằm cải thiện hiệu quả ra rễ *in vitro* trên nhiều đối tượng như cây *Liquidambar styraciflua* L. (Lin và cs., 1995), cây Chuối và cây hoa Lan ý (Nhut và cs., 2001a,b); cây Bạch đàn (Nhut và cs., 2002; Glocke và cs., 2006); cây Dâu tây (Nhut và cs., 2003); cây hoa Đào (Yuan và cs., 2004). Trên thực tế, việc sử dụng rockwool trong vi nhân giống ở quy mô sản xuất là một vấn đề cần được xem xét, bởi rockwool có giá thành đắt hơn các loại giá thể khác thường được sử dụng trong nuôi cấy mô dẫn đến giá thành cây giống sản phẩm tăng cao. Mặt khác, hiệu quả ra rễ cây Artichoke giống tím trên giá thể rockwool không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với giá thể agar thương mại Do đó, nghiên cứu này đề xuất việc sử dụng giá thể agar thương mại cho mục đích ra rễ cây Artichoke giống tím, cũng như hiệu quả ra rễ của giống này trên giá thể agar thương mại rockwool là tốt nhất đã được thử nghiệm.

Giá thể vermiculite cho hiệu quả ra rễ thấp (tỷ lệ ra rễ ≤ 50%) trên cây Artichoke giống tím, kết quả này tương tự như nghiên cứu của Keatmetha và Suksa-ard (2004) trên cây Hồng môn. Trong khi giá thể vermiculite cho hiệu quả ra rễ trung bình (tỷ lệ ra rễ ≥ 50%) trên cây Artichoke giống xanh, kết quả ghi nhận được tương tự trên cây Đu đủ (Sekeli và cs., 2013). Kết quả này thể hiện rõ rệt sự đáp ứng không giống nhau trên cùng loại giá thể, điều kiện và thời gian nuôi cấy bên cạnh sự khác biệt về hiệu quả ra rễ giữa hai giống Artichoke được thử nghiệm.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên khả năng ra rễ cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy.

Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Số lá mới/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	SPAD (nmol/cm^2)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Ghi chú
Agar tm	5,33a*	3,67b	1,87a	3,33a	5,17a	0,87ab	33,67a	0,84a	0,07a	Rễ dài, to và chắc khỏe
Agar nc	4,67ab	0,67c	0,13b	2,67b	4,63ab	0,73b	28,20ab	0,54c	0,04b	Rễ ngắn, nhỏ và mềm
Gelrite	**4,33b**	**5,00a**	**1,10ab**	**3,33a**	**4,37ab**	**0,94a**	**32,67a**	**0,81a**	**0,07a**	**Rễ dài, nhỏ và có phát sinh thêm rễ thứ cấp**
Perlite	4,67a	0,33c	0,10b	2,33ab	4,83a	0,95a	29,57ab	0,55c	0,04b	Rễ ngắn, nhỏ và giòn dễ gãy
Vermiculite	4,67a	3,97b	1,77a	2,67b	4,83a	0,91a	34,43a	0,70ab	0,07a	Rễ dài, to và chắc khỏe
Rockwool	5,00a	3,63bc	1,10ab	1,67c	4,20b	0,92a	33,67a	0,66bc	0,06ab	Rễ dài, nhỏ và nhiều lông hút

Ghi chú: **Những ký tự khác nhau (a, b, c…) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.*
(Agar tm: Agar thương mại; Agar nc: Agar nghiên cứu)



Hình 3.6. Ảnh hưởng của các loại giá thể lên khả năng ra rễ của các các chồi cây Artichoke giống xanh sau 30 ngày nuôi cấy. *Thanh bar = 1 mm.*

a, a_1: Trên giá thể agar thương mại (*rễ - mũi tên*).

b, b_1: Trên giá thể vermiculite.

c, c_1, c_2: Trên giá thể gelrite.

d: Trên giá thể agar thương mại, agar nghiên cứu, gelrite, perlite, vermiculite, rockwool (*từ trái sang phải*).

3.4. KHẢ NĂNG RA RỄ CỦA CÁC CHỒI ARTICHOKE GIỐNG TÍM VÀ GIỐNG XANH TRONG TÚI NUÔI CẤY NYLON SẢN XUẤT

Sau 30 ngày nuôi cấy thử nghiệm trong túi nylon, hiệu quả ra rễ của cây Artichoke giống tím trên giá thể agar thương mại và cây Artichoke giống xanh trên giá thể gelrite đã được ghi nhận và trình bày ở bảng 3.7, hình 3.7.

Bảng 3.7. Khả năng ra rễ của các chồi Artichoke giống tím và giống xanh trong túi nylon sau 30 ngày nuôi cấy.

Giống	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	SPAD (ng/cm^2)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
Tím	7,77a	81,33a	3,33a	4,37a	27,20a	0,98a	0,08a
Xanh	4,97b	77,00b	3,67a	3,67b	25,87a	0,88b	0,07b

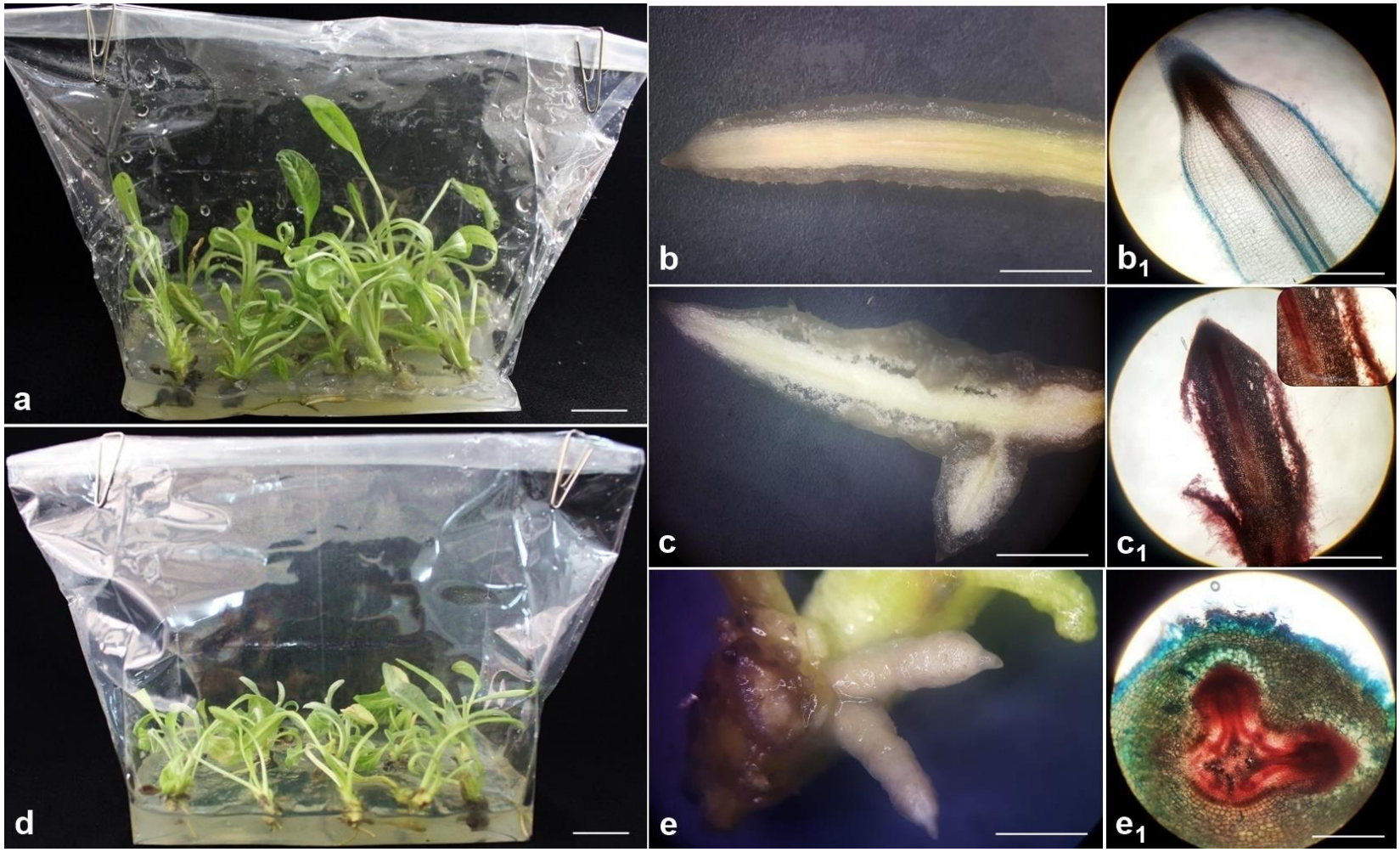
Ghi chú: **Những ký tự khác nhau (a, b, c…) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.*

Kết quả cho thấy, hiệu quả ra rễ của hai giống Artichoke giống tím và xanh đều không có sự thay đổi đáng kể khi được nuôi cấy trong túi nylon; cụ thể, tỷ lệ ra rễ, số rễ/cây của giống tím đạt lần lượt 81,33%, 3,33 rễ và giống xanh lần lượt là 77,00%, 3,67 rễ. Tuy nhiên, bên cạnh hình thái rễ phát triển bình thường (Hình 3.7b, b1), hình thái bất thường phồng đầu rễ cũng đã được ghi nhận trên giống tím. Sự trương phồng của đầu rễ làm thay đổi cấu trúc mô phần chóp rễ (Hình 3.7c), hình thái giải phẫu cho thấy phần cấu trúc mô dưới biểu bì tơi xốp và rời rạc (Hình 3.7c1) gây bong tróc tế bào biểu bì đầu rễ tạo sự tổn thương vùng rễ dễ gây chết cho cây con bởi sự xâm nhập của nấm bệnh và vi khuẩn qua vết thương trong điều kiện thuần dưỡng ngoài vườn ươm.

Hiện tượng phồng rễ biểu hiện cho sự thiếu hụt oxy trong túi nuôi cấy (stress lưu thông khí). Mức oxy giảm trong giá thể có mối liên quan với tỷ lệ ra rễ kém, giảm chiều dài rễ cũng như ảnh hưởng đến hô hấp của rễ (Keatmetha và Suksa-Ard, 2004 và Labrousse và cs., 2012) dẫn đến sự thích nghi kém của cây khi chuyển ra vườn ươm (Labrousse và cs., 2012 và Barpete và cs., 2014). Có nhiều nguyên nhân dẫn đến stress lưu thông khí; trong đó nguyên nhân chính được biết đến là mật độ nuôi cấy. Do đó,

cần có những khảo sát liên quan đến mật độ nuôi cấy cây Artichoke trước khi áp dụng vào quy mô sản xuất, bởi trong công tác vi nhân giống mật độ nuôi cấy không chỉ ảnh hưởng trực tiếp lên chất lượng cây nuôi cấy mà còn liên quan đến vấn đề tiết kiệm và tận dụng tối ưu môi trường nuôi cấy.

Trên cây Artichoke giống xanh, không ghi nhận bất kỳ hình thái rễ bất thường nào; mặt khác, đã có sự phát triển thêm các rễ phụ (Hình 3.7e), kết quả tương tự khi nuôi cấy trong bình magenta đã được khảo sát trước đó. Quan sát hình thái giải phẫu lát cắt ngang của rễ cho thấy sự phát sinh thêm các rễ bên từ mô mạch dẫn của rễ chính (Hình 3.7 e1).



Hình 3.7. Khả năng ra rễ của các chồi Artichoke giống tím và giống xanh trong túi nuôi cấy nylon sản xuất. ***Thanh bar = 1 mm***.
a: Cây Artichoke giống tím trên giá thể agar thương mại.
b, b_1: Chóp rễ cây Artichoke giống tím bình thường (*mặt cắt dọc rễ*).
c, c_1: Cấu trúc xốp bất thường của chóp rễ cây Artichoke giống tím được nuôi cấy trong túi nuôi cấy nylon sản xuất (*mặt cắt dọc rễ*).
d: Cây Artichoke giống xanh trên giá thể agar thương mại.

e, e$_1$: Rễ cây Artichoke giống xanh và sự phát sinh rễ thứ cấp (*mặt cắt ngang rễ*).

3.5. KHẢ NĂNG SỐNG SÓT VÀ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY MÔ ARTICHOKE GIỐNG TÍM VÀ GIỐNG XANH NGOÀI VƯỜN ƯƠM

Kết quả cho thấy, cây Artichoke *in vitro* có rễ dễ dàng thích nghi khi chuyển ra vườn ươm và tỷ lệ sống sót gần như tuyệt đối. Cụ thể, tỉ lệ sống sót của cây mô Artichoke giống tím và giống xanh lần lượt đạt 95,00% và 88,00% trong cùng một điều kiện nuôi trồng. Trong 1 – 2 tháng đầu tiên, cây Artichoke cả hai giống đều phát triển tán lá theo hướng xung quanh ; tuy nhiên, lá răng cưa (lá thật) bắt đầu xuất hiện ở cây giống xanh bắt chỉ sau 2 tháng được trồng; trong khi xuất hiện muộn hơn trên giống tím (Hình 3.8).

Cây con được chuyển ra khỏi nhà kính và chăm sóc và theo dõi trong các tháng tiếp theo, quan sát cho thấy cây Artichoke mô có sinh trưởng tốt và không kèm theo các bất thường nào về hình thái. Cây con cả hai giống nhanh chóng phát triển và chỉ tồn tại 100% dạng lá thật khi bước sang tháng thứ 3 (Hình 3.8c, f). Sau 5 tháng trồng, cây Artichoke giống tím đã xuất hiện thêm nhiều chồi con xung quanh gốc cây mẹ ban đầu; trong khi giống xanh không đẻ thêm chồi con (Hình 3.9). Tiếp đó, cây được chuyển ra trồng trực tiếp ngay trên đồng ruộng và thu nhận các chỉ tiêu về sinh trưởng so sánh với cây Artichoke được nhân giống từ chồi ngủ (nhân giống truyền thống). Sau 7 tháng trồng, cây giống tím phát triển thêm nhiều chồi con xung quanh gốc cây mẹ góp phần nâng cao hệ số nhân giống (Hình 3.9).

Bảng 3.8. Khả năng sống sót và sinh trưởng của cây Artichoke giống tím và giống xanh có nguồn gốc nuôi cấy mô trong điều kiện ngoài vườn ươm.

Thời gian (tháng)	chiều cao cây (cm)		Số lá răng cưa		SPAD (ng/cm^2)		Ghi chú	
	tím	xanh	tím	xanh	tím	xanh	tím	xanh
1	7,94±0,15	8,96±0,09	1,80±0,20	2,80±0,20	30,58±0,75	28,78±0,31	-	Xuất hiện lá răng cưa
3	23,84±0,63	25,1±0,38	2,60±0,24	3,60±0,24	37,50±0,86	37,42±0,82	Tán lá cây đứng	Tán lá cây đứng
5	110,18±1,21	117,32±0,50	5,80±0,20	6,00±0,32	44,76±0,71	39,64±0,65	Phát triển thêm các chồi con	-
7	121,4±1,05	129,96±0,48	15,20±0,37	14,2±0,20	47,16±0,40	49,86±0,52	Phát triển thêm các chồi con	-

Ghi chú: **Những ký tự khác nhau (a, b, c…) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy P ≤ 0,05 trong phép thử Duncan.*
(-) không ghi nhận khác biệt.



Hình 3.8. Cây Artichoke giống tím và giống xanh được trồng trong điều kiện vườn ươm.

a, d: Cây Artichoke mô giống tím và xanh trước khi được trồng ra vườn ươm (tương ứng).

b, e: Cây Artichoke giống tím và xanh được trồng ra vườn ươm sau 2 tháng (tương ứng).

c, f: Cây Artichoke giống tím và xanh được trồng ra vườn ươm sau 3 tháng (tương ứng).

g: Cây Artichoke giống tím và xanh được trồng ra vườn ươm sau 5 tháng (tương ứng).

h: Cây Artichoke giống tím phát triển các chồi bên sau 5 tháng trồng trong vườn ươm.

i: Cây Artichoke giống tím phát triển các chồi bên sau 5 tháng trồng trong vườn ươm.



Hình 3.9. Cây mô Artichoke giống tím và giống xanh được trồng thử nghiệm trên đồng ruộng.
a, c: Nhóm tác giả thăm và chăm sóc vườn cây Artichoke mô giống tím và xanh (tương ứng).
b: Sự phát triển thêm nhiều chồi con xung quanh gốc cây Artichoke giống tím.
c: Gốc cây Artichoke giống xanh.

Cải thiện tỷ lệ sống sót của cây mô ở giai đoạn vườn ươm góp phần nâng cao hiệu quả vi nhân giống và giảm giá thành cây giống (Chandra và cs., 2010). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ ra rễ *in vitro* và tỷ lệ sống sót ngoài vườn ươm của giống tím lần lượt là 75,67% và 95,00%; trong khi giống xanh là 80,00% và 88,00%, tương ứng. Tất cả các cây con đã hình thành rễ ở giai đoạn *in vitro* của hai giống khi chuyển ra vườn ươm có khả năng thích nghi tốt hơn (đạt tỷ lệ sống sót 100 %) so với những chồi chưa hình thành rễ *in vitro* đã được quan sát, kết quả tương tự đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Ozsan và cộng sự (2019). Khả năng sống sót trong điều kiện *ex vitro* của cây Artichoke giống tím và giống xanh khác nhau có thể giải thích bởi sự khác biệt về hình thái rễ và chất lượng cây con *in vitro* giữa các giống Artichoke (Rossi và De Paoli 1992; Bedini và cs., 2012; López-Pérez và Martínez 2015). Bedini và cộng sự (2012) ghi nhận trong giai đoạn thích nghi, tỷ lệ sống sót có sự khác biệt lớn giữa bốn giống Artichoke gồm violetto di toscana (90%), terom (100%), chiusure (65%) và empolese (75%).

Ozsan và cộng sự (2019) đã báo cáo rằng cây Artichoke có nguồn gốc nuôi cấy mô cho sự phát triển tốt hơn và có khả năng cho sản lượng bông thu hoạch cao hơn 31% so với cây nhân giống theo phương pháp truyền thống. Do đó, thành công trong việc nâng cao tỉ lệ sống sót cao của các cây con khi chuyển sang điều kiện vườn ươm không chỉ mang lại ý nghĩa ứng dụng thực tiễn trong vi nhân giống, mà còn cho thấy tầm quan trọng của việc cải thiện hiệu quả ra rễ các chồi Artichoke *in vitro* trước đó đối với giai đoạn này. Mặt khác, hiệu quả ra rễ *in vitro* liên quan đến chất lượng chồi và loại giá thể phù hợp đã được thử nghiệm và ứng dụng thành công trong nghiên cứu này trên hai giống Artichoke tím và giống xanh.

PHẦN 4:

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Nhân nhanh và cải thiện chất lượng chồi cây Artichoke

Giống tím: Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L KIN, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar (3,67 chồi/cụm; trong đó, trên 80% số chồi ≥ 2 cm).

Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar với 5,33 chồi/cụm (khoảng 94% ≥ 2 cm).

Cải thiện khả năng ra rễ *in vitro* và thích nghi ngoài vườn ươm của cây Artichoke

Giống tím: Giá thể agar thương mại gia tăng tỷ lệ ra rễ (75,67%) trên môi trường MS bổ sung 6,0 mg/L IBA, 30 g/L sucrose cũng như tỷ lệ sống sót đạt 95,00% khi chuyển ra vườn ươm.

Giống xanh: Giá thể gelrite gia tăng tỷ lệ ra rễ (80,00%) trên môi trường MS bổ sung 6,0 mg/L IBA, 30 g/L sucrose cũng như tỷ lệ sống sót đạt 88,00% trong điều kiện vườn ươm.

Trồng thử nghiệm cây mô Artichoke trên đồng ruộng

Cây Artichoke giống tím và giống xanh có nguồn gốc từ nuôi cấy mô có sinh trưởng và phát triển tốt khi được trồng thử nghiệm trên đồng ruộng.

4.2. KIẾN NGHỊ

Tiếp tục theo dõi sinh trưởng và phát triển của Cây Artichoke giống tím và giống xanh có nguồn gốc từ nuôi cấy mô đến giai đoạn ra hoa.

Tiếp tục nghiên cứu mở rộng quy mô áp dụng vào sản xuất thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Aasim, M., Day, S., Rezaei, F., Hajyzadeh, M. (2013). Multiple shoot regeneration of plumular apices of Chickpea. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *37*(1), 33-39.

[2] Acquadro, A., Papanice, M. A., Lanteri, S., Bottalico, G., Portis, E., Campanale, A., Gallitelli, D. (2010). Production and fingerprinting of virus-free clones in a reflowering Globe Artichoke. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *100*(3), 329-337.

[3] Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., Ullrich, C. I. (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, *97*(5), 883-893.

[4] Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., Ullrich, C. I. (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, *97*(5), 883-893.

[5] Alphonse, M., Badawi, M. A., Abd-Elal, T. M. (2002). Preliminary studies on the evaluation of some clones and cultivars of Artichoke. *Egyptian Journal of Horticulture*, *29*(2), 317-332.

[6] Ancora, G., Belli-Donini, M. L., Cuozzo, L. (1981). Globe Artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Scientia Horticulturae*, *14*(3), 207-213.

[7] Apóstolo, N. M., Brutti, C. B., Llorente, B. E. (2005). Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, *41*(3), 307-313.

[8] Apóstolo, N. M., Brutti, C. B., Llorente, B. E. (2005). Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, *41*(3), 307-313.

[9] Apóstolo, N. M., Brutti, C. B., Llorente, B. E. (2005). Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 41*(3), 307-313.

[10] Arab, M. M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S., Ghojah, S. M. (2014). Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G × N15 (hybrid of *almond* × *peach*) vegetative rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *12*(2), 81-87.

[11] Araki, C., Arai, K. (1956). Studies on the chemical constitution of agar-agar. XVIII. Isolation of a new crystalline disaccharide by enzymatic hydrolysis of agar-agar. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, *29*(3), 339-345.

[12] Armisen, R., Gaiatas, F. (2009). Agar. In: Phillips, G. O., Williams, P. A. (Eds), *Handbook of Hydrocolloids*. Woodhead Publishing, United Kingdom, pp. 82-107.

[13] Armisen, R., Galatas, F. (1987). Production, properties and uses of agar. In: McHugh, D. J. (Ed), *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds.* FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, *288*, pp. 1-57.

[14] Arthur, G. D., Stirk, W. A., van Staden, J., Thomas, T. H. (2004). Screening of aqueous extracts from gelling agents (agar and gelrite) for root - stimulating activity. *South African Journal of Botany*, *70*(4), 595-601.

[15] Barpete, S., Khawar, K. M., Özcan, S. (2014). Differential competence for *in vitro* adventitious rooting of Grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *119*(1), 39-50.

[16] Barshad, I., Kishk, F. M. (1969). Chemical composition of soil vermiculite clays as related to their genesis. *Contributions to Mineralogy and Petrology*, *24*(2), 136-155.

[17] Bedini, L., Lucchesini, M., Bertozzi, F., Graifenberg, A. (2012). Plant tissue cultures from four Tuscan Globe Artichoke cultivars. *Open Life Sciences*, *7*(4), 680-689.

[18] Bekheet, S. A. (2007). *In vitro* preservation of Globe Artichoke germplasm. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, *17*(1), 1-9.

[19] Benoit, H., Ducreux, G., 1981. Étude de quelques aspects de la multiplication végétative *in vitro* de l'Artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Agronomie*, *1*, 225-230.

[20] Beruto, D., Beruto, M., Ciccarelli, C., Debergh, P. (1995). Matric potential evaluations and measurements for gelled substrates. *Physiologia Plantarum*, *94*(1), 151-157.

[21] Bianco, P., Robey, P. G. (2000). Marrow stromal stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *105*(12), 1663-1668.

[22] Bigot, C., Foury, C., Casenave, M., Delacroix, E., Delage, C., Godin, B., Lebœuf, J. (1984). Multiplication *in vitro* d'Artichaut (*Cynara scolymus* L.) à partir de semences: comparaison au champ de quelques clones à la lignée dont ils sont issus. *Agronomic*, *4*(8), 669-710.

[23] Blaabjerg, J. (1982). Physical and chemical compositions of the inactive growing medium grodan and its fields of application and extension. In: Röber R. (Ed), *Nutrient Film Technique and Substrates, XXI IHC*. Federal Republic of Germany, Germany, *133*, pp. 59-65.

[24] Bors, J., Gorny, A., Dultz, S. (1997). Iodide, caesium and strontium adsorption by organophilic vermiculite. *Clay minerals*, *32*(1), 21-28.

[25] Boullani, R. E., Elmoslih, A., Finti, A. E., Mousadik, A. E., Serghini, M. A. (2012). Improved *in vitro* micropropagation of Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). *European Journal of Scientific Research*, *80*:430-436.

[26] Brutti, C., Apostolo, N. M., Ferrarotti, S. A., Llorente, B. E., Krymkiewicz, N. (2000). Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. *Scientia Horticulturae*, *83*(1), 1-10.

[27] Buah, J. N., Kawamitsu, Y., Sato, S., Murayama, S. (1999). Effects of different types and concentrations of gelling agents on the physical and chemical

properties of media and the growth of Banana (*Musa* spp.) *in vitro*. *Plant Production Science*, *2*(2), 138-145.

[28] Cardarelli, M., Rouphael, Y., Saccardo, F., Colla, G. (2005). An innovative vegetative propagation system for large - scale production of Globe Artichoke transplants. Part I. Propagation system setup. *Horticultural Technology*, *15*(4), 812-816.

[29] Catacora, E., Olivera, J., Ramos, Z., Alve, Z., Pinedo, R. (2019). Micropropagation of clonal lines of thorny Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Peruvian Journal of Agronomy*, *3*(1), 29-38.

[30] Clifford, M.N., Brown, J.E. (2006). Dietary flavonoids and health – broadening the perspective. In: Andersen, O., Markham, K.R. (Eds), Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 320- 370.

[31] Comino, C., Moglia, A., Repetto, A., Tavazza, R. (2019). Globe Artichoke tissue culture and its biotechnological application. In: Portis, E., Acquadro, A., Lanteri, S. (Eds), *the Globe Artichoke Genome.* Springer, Switzerland, pp. 41-64.

[32] Conner, A. J., Thomas, M. B. (1982). Re-establishing plantlets from tissue culture: a review. *The International Plant Propagators' Society Combined Proceedings*, pp. 342-357.

[33] Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, *32*(9), 1199-1205.

[34] Dawa, K., El-Saady, W., El-Denary, M. (2018). *In vitro* micropropagation of Globe Artichoke plant (*Cynara scolymus* L.): 1-effect of sodium hypochlorite concentrations, cytokinins and subcultures number on shoots multiplication rate, 11(4), 11-17.

[35] Day, D. (1942). Thiamin content of agar. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, *69*(1), 11-20.

[36] de Falco, B., Incerti, G., Amato, M., Lanzotti, V. (2015). Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, *14*(6), 993-1018.

[37] De Leo, P., Greco, B. (1976). A new technique for propagation of Artichoke: *in vitro* culture of apical meristems. *Proceeding II Internation Congress Artichoke, Medica*, Italy, pp. 657-665.

[38] Debergh, P. C. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, *59*(2), 270-276.

[39] Dharmasiri, N., Estelle, M. (2004). Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in Plant Science, 9*(6), 302-308.

[40] El Sohaimy, S. A. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial potential of Artichoke. *The Open Nutraceuticals Journal*, *7*(1), 12-17.

[41] El-Zeiny, O. A. H., El-Behairy, U. A., Zocchi, G., Rashwan, M. M. (2013). Commercial production of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) *in vitro*. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, *91*(3), 933-1007.

[42] Ercan, N. (2016). Effects of various growth regulators on *in vitro* rooting of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology* A, *6*, 335-340.

[43] Figueroa Olin, S. (2019). Biología y determinación de *Copitarsia* sp. plaga del cultivo de la alcachofa (*Cynara scolymus* L.) bajo condiciones de laboratorio-Arequipa. Undergraduated Thesis, Spain, 71p.

[44] Finet, C., Jaillais, Y. (2012). Auxology: when auxin meets plant evo-devo. *Developmental Biology, 369*(1), 19-31.

[45] Fortunato, I. M., Ruta, C., Castrignano, A., Saccardo, F. (2005). The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated Artichokes. *Scientia Horticulturae*, *106*(4), 472-483.

[46] Fortunato, I. M., Ruta, C., Castrignano, A., Saccardo, F. (2005). The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes. *Scientia Horticulturae, 106*(4), 472-483.

[47] Gallitelli, D., Mascia, T., Martelli, G. P. (2012). Viruses in Artichoke. *In Advances in Virus Research, 84*, 289-324. Academic Press.

[48] Glocke, P., Delaporte, K., Collins, G., Sedgley, M. (2006). Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* × *Eucalyptus stricklandii* cv.'urrbrae gem'. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 42*(2), 139-143.

[49] Gomes, F., Simões, M., Lopes, M. L., Canhoto, J. M. (2010). Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree). *New Biotechnology, 27*(6), 882-892.

[50] Grout, B. W., Aston, M. J. (1978). Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Horticultural Research, 17*(2), 65-71.

[51] Haissig, B. E. (1974). Influences of auxins and auxin synergists on adventitious root primordium initiation and development. *New Zealand Journal of Science, 4*(2), 311-23.

[52] Harbaoui, Y. (1980). Multiplication *in vitro* de clones selectionees d'Artichaut (*cynara scolymus* L.).

[53] Harbaoui, Y., Debergh, P. (1980). Multiplication *in vitro* de clones sélectonnées d'artichaut
(*Cynara scolymus* L.). In: C, Doré. (Ed), *Application de la Colture in vitro a L'amélioration des Plantes Potagéres*. Eucarpia, France, pp. 1-7.

[54] Hase, A. (1987). Changes in respiratory metabolism during callus growth and adventitious root formation in Jerusalem Artichoke tuber tissues. *Plant and Cell Physiology, 28*(5), 833-841.

[55] Hazarika, B. N. (2003). Acclimatization of tissue - cultured plants. *Current Science,* 1704-1712.

[56] Iapichino, G. (2012). Micropropagation of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). In: Lambardi M., Ozudogru, E. A., Jain, S., M. (Eds), *Protocols for Micropropagation of Selected Economically – Important Horticultural Plants*. Humana Press, United States, pp. 369-380.

[57] Iapichino, G. (2012). Micropropagation of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. scolymus). In: Iapichino, G. (Ed), *Protocols for Micropropagation of Selected Economically - Important Horticultural Plants*. Humana Press, United States, pp. 369-380.

[58] Imin, N., Nizamidin, M., Wu, T., Rolfe, B. G. (2007). Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *Journal of experimental botany*, *58*(3), 439-451.

[59] Jay - Allemand, C., Capelli, P., Cornu, D. (1992). Root development of *in vitro* hybrid Walnut microcuttings in a vermiculite - containing gelrite medium. *Scientia Horticulturae*, *51*(3-4), 335-342.

[60] Kaviani, B., Hesar, A. A., Kharabian-Masouleh, A. (2011). *In vitro* propagation of *Matthiola incana* (Brassicaceae) - an ornamental plant. *Plant Omics Journal*, *4*(7), 435-440.

[61] Keatmetha, W., Suksa - ard, P. (2004). Effects of rooting substrates on *in vitro* rooting of *Anthurium andraeanum* L. cv. Avanti. *Walailak Journal of Science and Technology*, *1*(2), 49-55.

[62] Klerk, G., Marinova, S., Rouf, S., Brugge, J. (1996, June). Salicylic acid affects rooting of Apple microcuttings by enhancement of oxidation of auxin. In III International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding 447, pp. 247-250.

[63] Konstantatos, G., Howard, I., Fischer, A., Hoogland, S., Clifford, J., Klem, E., Sargent, E. H. (2006). Ultrasensitive solution - cast quantum dot photodetectors. *Nature*, *442*(7099), 180-183.

[64] Kreen, S., Svensson, M., Rumpunen, K. (2002). Rooting of Clematis microshoots and stem cuttings in different substrates. *Scientia Horticulturae, 96*(1-4), 351-357.

[65] Kurata K. (1995) Image analysis for embryogenesis. In: Aitken – Christie, J., Kozai, T., Smith, M. A. L. (Eds), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Springer, The Netherlands, pp. 165-186.

[66] Labrousse, P., Delmail, D., Decou, R., Carlué, M., Lhernould, S., Krausz, P. (2012). Nemesia root hair response to paper pulp substrate for micropropagation. *The Scientific World Journal, 2012,* 1-7.

[67] Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V; Parizot, B; Herrena-Rodroguez, M, B; Offringa, R; Gramha, N., Doumas, P; Friml, J; Bogusz, D; Beeckman, T; Bennett, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell, 19*(12), 3889-3900.

[68] Lauzer, D., Vieth, J. (1990). Micropropagation of seed - derived plants of *Cynara scolymus* L., cv. 'Green Globe'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21*(3), 237-244.

[69] Lauzer, D., Vieth, J. (1990). Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L., cv. 'Green Globe'. *Plant cell, tissue and organ culture, 21*(3), 237-244.

[70] Lebedev, V., Arkaev, M., Dremova, M., Pozdniakov, I., Shestibratov, K. (2019). Effects of growth regulators and gelling agents on *ex vitro* rooting of Raspberry. *Plants, 8*(1), 3-10.

[71] Lin, X., Bergmann, B. A., Stomp, A. M. (1995). Effect of medium physical support, shoot length and genotype on *in vitro* rooting and plantlet morphology of Sweetgum. *Journal of Environmental Horticulture, 13*(3), 117-121.

[72] Lombardo, S., Pandino, G., Ierna, A., Mauromicale, G. (2012). Variation of polyphenols in a germplasm collection of Globe Artichoke. *Food Research International*, *46*(2), 544-551.

[73] López-Pérez, A. J., Martínez, J. A. (2015). *In vitro* root induction improvement by culture in darkness for different Globe Artichoke cultivars. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 51*(2), 160-165.

[74] Lovell, P. H., Illsley, A. N. N., Moore, K. G. (1972). The effects of light intensity and sucrose on root formation, photosynthetic ability, and senescence in detached cotyledons of *Sinapis alba* L. and *Raphanus sativus* L. *Annals of Botany*, *36*(1), 123-134.

[75] Lucchesini, M., Mensuali-Sodi, A., Massai, R., Gucci, R. (2001). Development of autotrophy and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration. *Biologia Plantarum*, *44*(2), 167-174.

[76] MacRae, R. J., Hill, S. B., Mehuys, G. R., Henning, J. (1990). Farm - scale agronomic and economic conversion from conventional to sustainable agriculture. *In Advances in Agronomy*, *43*, 155-198.

[77] Martins, L., Pedrotti, E. L. (2001). Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dos porta-enxertos de macieira M7, M9 e Marubakaido. *The Revista Brasileira de Fruticultura*, *23*(1), 11-16.

[78] Mazri, M. A. (2015). Role of cytokinins and physical state of the culture medium to improve *in vitro* shoot multiplication, rooting and acclimatization of Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Boufeggous. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *24*(3), 268-275.

[79] Mekhamer, W. K., Assaad, F. F. (1999). Thermodynamics of Sr - Mg vermiculite exchange and the effect of PVA on Mg release. *Thermochimica Acta*, *334*(1), 33-38.

[80] Minutillo, S. A., Mascia, T., Gallitelli, D. (2012). A DNA probe mix for the multiplex detection of ten Artichoke viruses. *European Journal of Plant Pathology*, *134*(3), 459-465.

[81] Moncousin, C., (1980). Multiplication végétative accélérée de *Cynara scolymus* L. I. Résultats préliminaires. *Revue Horticole Suisse, 53,* 149-154.

[82] Moorhouse, R., Colegrove, G. T., Sandford, P. A., Baird, J. K., Kang, K. S. (1981). PS-60: a new gel - forming polysaccharide, In: Brant, D. A. (Ed), *Solution Properties of Polysaccharides*. ACS Symposium Series, United States, *150*(9), 111-124.

[83] Morone-Fortunato, I. (2007). La propagazione del carciofo: vivaismo e innovazione tecnologica. *Italus Hortus*, *14*, 47-57.

[84] Morzadec, J. M., Hourmant, A. (1997). *In vitro* rooting improvement of Globe Artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA_3. *Scientia Horticulturae, 72*(1), 59-62.

[85] Nandhakumar, N., Soorianathasundaram, K., Sudhakar, D., Kumar, K. K. (2017). Genetic fidelity analysis in the micropropagated Banana derived from immature primordial male flower bud. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(4), 1759-1769.

[86] Negro, D., Montesano, V., Grieco, S., Crupi, P., Sarli, G., De Lisi, A., Sonnante, G. (2012). Polyphenol compounds in Artichoke plant tissues and varieties. *Journal of Food Science*, *77*(2), C244-C252.

[87] Newell, C. J. (2006). *In vitro soil-less (IVS) rooting medium*. Doctoral Dissertation, Murdoch University, Australia, 207p.

[88] Nicholson, J., Shukla, M. R., Saxena, P. K. (2020). *In vitro* rooting of hybrid Hazelnuts (Corylus avellana × Corylus americana) in a temporary immersion system. *Botanique*, *999*, 1-10.

[89] Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K., Sandberg, G. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in

Arabidopsis thaliana: a factor of potential importance for auxin - cytokinin regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(21), 8039-8044.

[90] Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Murakami, A., Murakami, K., Tanaka, M. (2002). Sugar-free micropropagation of Eucalyptus citriodora using light - emitting diodes (LEDs) and film - rockwool culture system. *Environment Control in Biology*, *40*(2), 147-155.

[91] Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Okamoto, K., Tanaka, M. (2003). Responses of Strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light - emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *73*(1), 43-52.

[92] Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Tanaka, M. (2001). Artificial light source using light - emitting diodes (LEDs) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets. International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Part 1, Australia, *692*, 137-142.

[93] Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Tanaka, M. (2001). Efficiency of a novel culture system by using light - emitting diode (LED) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated Banana plantlets. III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants, Portugal, *616*, 121-127.

[94] Olympios, C. M. (1992). Soilless media under protected cultivation rockwool, peat, perlite and other substrates. In: Abou-Hadid, A. F., Smith, A. R. (Eds), *Symposium on Soil and Soilless Media under Protected Cultivation in Mild Winter Climates*. International Society for Horticultural Science, Egypt, *323*, pp. 215-234.

[95] Ozel, C. A., Khawar, K. M., Arslan, O. (2008). A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on *in vitro* shoot regeneration and rooting of variety

Samsun of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Scientia Horticulturae*, *117*(2), 174-181.

[96] Ozsan, T., Onus, A. N. (2019) A protocol on *in vitro* rooting of 'Bayrampaşa' Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Mediterranean Agricultural Sciences*, *32*(2), 129-134.

[97] Pacifici, S., Lucchesini, M., Curadi, M., Graifenberg, A. (2007). Influence of medium composition and vessel ventilation during the micropropagation stages of *Cynara scolymus* L. cv. Grato 1. *Advances in Horticultural Science*, *21*(2) 83-88.

[98] Palanyandy, S. R., Gantait, S., Sinniah, U. R. (2020). Effects of some gelling agents and their concentrations on conversion of oil Palm polyembryoids into plantlets. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *18*(1), 5-9.

[99] Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G. (2011). Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*, *126*(2), 417-422.

[100] Papacchioli, V., Ancora, G., Tavazza, R. (2003). An improved medium for *in vitro* propagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) cv. In: Sanz Villar F.J. (Ed), *V International Congress on Artichoke 660*. International Society for Horticultural Science, Egypt, pp. 91-97.

[101] Pasqualetto, P. L., Zimmerman, R. H., Fordham, I. (1986). Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of Galä apple *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *111*(6), 976-980.

[102] Quambusch, M., Pscherer, G. S., Winkelmann, T., Bartsch, M. T. (2017). Improved *in vitro* rooting of *Prunus avium* microshoots using a dark treatment and an auxin pulse. *Scientia Horticulturae*, *220*, 52-56.

[103] Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., Bautista-Aguilar, J. R. (2017). The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech*, *19*(3), 331-336.

[104] Rankin, L., Paulitz, T. C. (1994). Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of pythium root rot of greenhouse Cucumbers in hydroponic culture. *Plant Disease, 78*(5), 447-451.

[105] Reid, J. B., Petrie, R. A. (1991). Effects of soil aeration on root demography in Kiwifruit. *New Zealand journal of crop and horticultural science, 19*(4), 423-432.

[106] Rossi, V., De Paoli, G. (1992). Micropropagation of Artichoke (*Cynara scolymus*). In: Bajaj, Y. P. S. (Ed), *High - Tech and Micropropagation III*. Springer, Germany, pp. 118-134.

[107] Santos-Serejo, J. A., Junghans, T. G., Soares, T. L., Silva, K. M. (2006). Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: Souza, A. S., Junghans, T. G. (Eds), *Introdução à Micropropagação de Plantas*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Portugal, pp. 80-98.

[108] Scherer, P. A., Müller, E., Lippert, H., Wolff, G. (1987). Multielement analysis of agar and gelrite impurities investigated by inductively coupled plasma emission spectrometry as well as physical properties of tissue culture media prepared with agar or the gellan gum gelrite. In: von Henting, W. U., Grüber, G. (Eds), *International Symposium on Propagation of Ornamental Plants*. International Society for Horticultural Science, Germany, *226*, pp. 655-658.

[109] Schneider, F. (2005). *Effect of different cultural conditions on micropropagation of Rose* (*Rosa* sp.) *and Globe Artichoke* (*Cynara scolymus* L.) Doctoral Dissertation, Technische Universität München, Germany, 130 p.

[110] Sekeli, R., Abdullah, J. O., Namasivayam, P., Muda, P., Abu, B. U. K. (2013). Better rooting procedures to enhance survival rate of field grown Malaysian Eksotika Papaya transformed with 1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid oxidase gene. *African Journal Biotechnology, 8*(2), 120-125.

[111] Singh, M., Garg, M. (1991). Perlite - based building materials - a review of current applications. *Construction and Building Materials, 5*(2), 75-81.

[112] Smith, J. A., Henry, D. A., Bourgault, A. M., Bryan, L., Harding, G. J., Hoban, D. J., Turgeon, P. (1987). Comparison of agar disk diffusion, microdilution broth, and agar dilution for testing antimicrobial susceptibility of coagulase - negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, *25*(9), 1741-1746.

[113] Sriskandarajah, S., Skirvin, R. M., Abu-Qaoud, H., Korban, S. S. (1990). Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three Apple scion cultivars *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, *65*(2), 113-121.

[114] Tavazza, R., Papacchioli, V., Ancora, G. (2004). An improved medium for *in vitro* propagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Cv. "spinoso sardo". *Acta Horticulturae*, *660*, 91-97

[115] Tesfa, M., Admassu, B., Bantte, K. (2016). *In vitro* rooting and acclimatization of micropropagated elite Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes - N52 and N53. *Journal of Tissue Science and Engineering*, *7*(1), 1-6.

[116] Tivang, J., Skroch, P. W., Nienhuis, J., De Vos, N. (1996). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among and within Artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and breeding populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *121*(5), 783-788.

[117] Tsao, C. W. V., Reed, B. M. (2002). Gelling agents, silver nitrate and sequestrene iron influence adventitious shoot and callus formation from Rubus leaves. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, *38*(1), 29-32.

[118] Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G. J., Roberts, A., George, E. F. (2008). The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: George, E. F., Hall, M. A., de Klerk, G. J. (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, The Netherlands, pp. 115-173.

[119] Thwe, A. A., Kim, H. H., Kim, H. H., Park, S. U. (2015). Enhancement of *in vitro* rooting by gelling agents and activated charcoal in *Rehmannia glutinosa* L. *Online Journal of Biological Sciences*, *15*(2), 49.

[120] Vaast, P., Zasoski, R. J., Bledsoe, C. S. (1997). Effects of vesicular - arbuscular mycorrhizal inoculation at different soil P availabilities on growth and nutrient uptake of in vitro propagated Coffee (*Coffea arabica* L.) plants. *Mycorrhiza*, *6*(6), 493-497.

[121] van Gelderen, K., Kang, C., Pierik, R. (2018). Light signaling, root development, and plasticity. *Plant Physiology*, 176(2), 1049-1060.

[122] Veramendi, J., Navarro, L. (1997). Influence of explant sources of adult Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. *Journal of Horticultural Science*, *72*(5), 665-671.

[123] Wafaa, A. F., Wahdan, H. M. (2017). Influence of substrates on *in vitro* rooting and acclimatization of micropropagated Strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.). *Middle East Journal*, *6*(3), 682-691.

[124] Yuan, X., Peng, X., Li, Q., Zhang, K. (2004). Research on tissue culture rooting of *Prunus avium* L. *Journal of Northwest Science - Technology University of Agriculture and Forestry, 32*(4), 71-73.

[125] Zimmerman, T. W., Cobb, B. G. (1989). Vitrification and soluble carbohydrate levels in Petunia leaves as influenced by media gelrite and sucrose concentrations. *Plant Cell Reports*, *8*(6), 358-360.

[126] Ziv, M. (1986). *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: Lyndsey, A., Withers, Alderson, P.G. (Eds), Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications. Butterworth - Heinemann, United Kingdom, pp.187-196.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA THỨC ĂN LÊN SỰ SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ KHẢ NĂNG SINH SẢN CỦA LOÀI BỌ RÙA *MENOCHILUS SEXMACULATUS* TẠI ĐÀ LẠT

Thuộc nhóm ngành khoa học: Khoa học Tự nhiên

Lâm Đồng, tháng 06/2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA THỨC ĂN LÊN SỰ SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ KHẢ NĂNG SINH SẢN CỦA LOÀI BỌ RÙA *MENOCHILUS SEXMACULATUS* TẠI ĐÀ LẠT

Thuộc nhóm ngành khoa học: Khoa học Tự nhiên

Sinh viên thực hiện: Nguyễn Thị Thu Huế Nam, Nữ: Nữ

Dân tộc: Kinh

Lớp, khoa: CSK40, khoa Sinh học Năm thứ: 4 /Số năm đào tạo: 4

Ngành học: Công nghệ sinh học

Người hướng dẫn: Th.S Nguyễn Thanh Thủy Tiên

Lâm Đồng, tháng 06/2020

LỜI CẢM ƠN

Với tình cảm chân thành và lòng biết ơn sâu sắc, chúng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới:

Ban lãnh đạo nhà trường đã tạo điều kiện để chúng tôi có thể thực hiện niềm yêu thích và đam mê của mình.

Ban chủ nhiệm khoa Sinh học cùng quý thầy cô đã động viên, khích lệ chúng tôi trong suốt quá trình hoàn tiện đề tài.

Thạc sỹ Nguyễn Thanh Thủy Tiên đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt cho chúng tôi những kiến thức và kinh nghiệm quý báu, giúp đỡ và động viên chúng tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

Cảm ơn gia đình và bạn bè luôn chia sẻ, giúp đỡ và tạo nhiều điều kiện thuận lợi để chúng tôi hoàn thành đề tài.

MỤC LỤC

LỜI MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1 – TỔNG QUAN TÀI LIỆU 2
1.1. Côn trùng thiên địch và các phương thức ứng dụng 2
1.1.1. Giới thiệu về côn trùng thiên địch 2
1.1.2. Các phương thức ứng dụng côn trùng thiên địch 2
1.2. Vài nét vè bọ rùa thiên địch 3
1.2.1. Vị trí và hệ thống phân loại 4
1.2.2. Đặc tính sinh vật học của bọ rùa 5
1.2.3. Bọ rùa có ích và triển vọng của việc sử dụng chúng trong biện pháp đấu tranh sinh học 6
1.3. Khái quát về bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 9
1.3.1. Sơ lược về bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 9
1.3.2. Đặc điểm hình thái của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 9
1.4. Thức ăn sử dụng trong nhân nuôi bọ rùa thiên địch 12
1.4.1. Ảnh hưởng của thức ăn đến bọ rùa thiên địch 12
1.4.2. Thức ăn tự nhiên rệp Aphid 12
1.4.3. Thức ăn nhân tạo 13
CHƯƠNG 2 – ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 15
2.1. Đối tượng nghiên cứu 15
2.2. Thời gian, địa điểm nghiên cứu 15
2.3. Nội dung nghiên cứu 15
2.4. Phương pháp nghiên cứu 15
2.4.1. Nhân nuôi rệp Aphid trong phòng thí nghiệm. 15
2.4.2. Thu mẫu bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*. 16
2.4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn tự nhiên lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*. 16
2.4.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn nhân tạo lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus.* 17
2.4.5. Làm tiêu bản 18
2.4.6. Xử lý thống kê 19
CHƯƠNG 3 – KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 20
3.1. Ảnh hưởng của thức ăn tự nhiên là rệp aphid đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 20
3.1.1. Thời gian phát triển các pha của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 20

3.1.2. Khả năng ăn mồi của ấu trùng và trưởng thành bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* trong phòng thí nghiệm 21
3.1.3. Khả năng sinh sản 22
3.2. Ảnh hưởng của thức ăn nhân tạo đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 24
3.2.1. Khả năng sống sót của pha ấu trùng và tuổi thọ pha trưởng thành khi nhân nuôi bằng các loại thức ăn nhân tạo lên loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 24
3.1.2. So sánh ảnh hưởng của thức ăn nhân tạo (công thức 1) và thức ăn tự nhiên đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* . 26
KẾT LUẬN 29
KIẾN NGHỊ 30
TÀI LIỆU THAM KHẢO 31

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1 Thời gian phát triển các pha của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*.....21

Bảng 3.2 Khả năng ăn mồi của pha ấu trùng và trưởng thành 22

Bảng 3.3 Khả năng sinh sản của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 24

Bảng 3.4 Ảnh hưởng của các loại thức ăn nhân tạo lên khả năng sống sót của pha ấu trùng và tuổi thọ pha trưởng thành của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*.....25

Bảng 3.5 Ảnh hưởng của Công thức 1 và thức ăn tự nhiên lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 27

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1 Các pha phát triển của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 11

Hình 1.2 Các pha phát triển của rệp Aphid 13

Hình 2.1 Nhân nuôi rệp trên cây đậu đen tại phòng thí nghiệm..... 16

Hình 2.2 Rệp Aphid trên cây nhũ cúc (*Sonchus oleracae*) 17

Hình 2.3 Ghép cặp nhân nuôi trong ly nhựa 18

Hình 2.4 Bố trí thí nghiệm nhân nuôi bằng thức ăn nhân tạo

bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 19

Hình 2.5 Tiêu bản pha trưởng thành bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* 20

LỜI MỞ ĐẦU

Việt Nam là nước có nền nông nghiệp phát triển, quy mô trồng trọt ngày càng được mở rộng song cùng với đó là việc các loài côn trùng gây hại gia tăng với mật độ cao. Đặc biệt các loài côn trùng gây hại như rệp muội, bọ phấn, rệp sáp,… phát triển nhanh và gây hại trên cây ăn trái, hoa, cây rau,… Để đảm bảo năng suất và chất lượng của nông sản thì việc thực hiện các biện pháp phòng trừ sâu bệnh hại là việc rất cần thiết.

Hiện nay, trong sản xuất nông nghiệp ở Việt Nam, biện pháp phòng trừ sâu hại đang được nông dân sử dụng rộng rãi là biện pháp hóa học mà chủ yếu là các loại thuốc bảo vệ thực vật. Việc lạm dụng quá mức thuốc bảo vệ thực vật như hiện nay khiến sản phẩm rau củ, quả không đảm bảo an toàn cho sức khỏe của cả người tiêu dùng và người sản xuất, cùng với đó dư lượng thuốc trừ sâu còn tồn đọng trên đồng ruộng sẽ tác động ngược lại gây ô nhiễm môi trường sống của các loài sinh vật khác, làm suy giảm tính đa dạng của hệ sinh thái, gây tổn hại đến quần thể thiên địch, đó cũng là nguyên nhân gây ra tính kháng thuốc của dịch hại. Vì vậy, để sản xuất nông sản an toàn, một trong những biện pháp được ưu tiên áp dụng là sử dụng biện pháp đấu tranh sinh học bằng cách sử dụng các loài thiên địch của sâu hại. Trong đó, bọ rùa là một loài thiên địch quan trọng trong việc tiêu diệt các loài rệp gây hại.

Việc nhân nuôi phóng thả bọ rùa cũng góp phần rất lớn trong việc bảo tồn và gia tăng số lượng bọ rùa ngoài tự nhiên. Để làm được điều đó việc nghiên cứu ảnh hưởng của các loại thức ăn là quan trọng, ngoài thức ăn tự nhiên là nguồn thức ăn ưa thích thì cần tìm ra nguồn thức ăn thay thế hoặc thức ăn nhân tạo để có thể nhân nuôi trong các điều kiện bất lợi mà không ảnh hưởng đến sức sống và sinh sản của bọ rùa.

Đà Lạt là vùng phát triển mạnh về các loại nông sản do đó cũng không tránh khỏi việc bị côn trùng gây hại. Sử dụng côn trùng thiên địch trong phòng trừ sâu hại là biện pháp sinh học đang được quan tâm và ngày càng phát triển trong tương lai. Chính vì vậy nhóm chúng tôi thực hiện đề tài **"Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* tại Đà Lạt"** nhằm tạo tiền đề cho sản xuất và ứng dụng bọ rùa thiên địch trong phòng trừ sâu hại tại địa phương.

CHƯƠNG 1 – TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÔN TRÙNG THIÊN ĐỊCH VÀ CÁC PHƯƠNG THỨC ỨNG DỤNG

1.1.1. Giới thiệu về côn trùng thiên địch

Giới động vật được chia làm 2 nhóm chính là động vật không xương sống và động vật có xương sống. Côn trùng thuộc nhóm động vật không xương sống. Chúng có họ hàng rất gần với các loài như Giáp xác (tôm, cua,…), Hình nhện (nhện, bọ cạp,…), Nhiều chân (rết, cuốn chiếu,…), kế đó là thân mềm (sên), xa hơn nữa các nhóm giun (giun đốt, giun dẹp,…) (Nguyễn, 2009).

Côn trùng thiên địch bao gồm Côn trùng ăn thịt và Côn trùng ký sinh. Côn trùng ăn thịt có kiểu miệng nhai hoặc chích hút, tự tìm kiếm và sắn bắt con mồi làm thức ăn, giết chết con mồi trong một thời gian ngắn, để hoàn thành phát dục mỗi cá thể cần tiêu diệt nhiều con mồi. Côn trùng ăn thịt bao gồm: Họ Hành trùng (Carabidae), Kiến, Bọ ngựa, Họ Hổ trùng (Cicindellidae), Họ Bọ rùa (Coccinellidae), Họ Bọ xít ăn sâu (Reduviidae) (Lê, 2012). Côn trùng ký sinh đẻ trứng gần sâu hại hoặc vào cơ thể sâu hại. Thuộc nhóm này gồm các Bộ: cánh cứng (Coleoptera), cánh màng (Hymenoptera), hai cánh (Diptera), cánh vẩy (Lepidoptera), cánh chiếm (Stresiptera) (Trần, 2008).

Côn trùng có vai trò quan trọng đối với sự tồn tại của hệ sinh thái với vai trò là sinh vật tiêu thụ, sinh vật ăn thịt, chúng góp phần cho sự ổn định, cân bằng của hệ sinh thái. Côn trùng cũng là động vật có ích nó cung cấp một số sản phẩm từ côn trùng như mật (ong mật, kiến mật,…), tơ (tằm lá dâu, tằm lá sắn,…), cánh kiến đỏ, côn trùng thiên địch,… Ngoài ra côn trùng còn góp phần trong lĩnh vực y học như: nọc ong (Peptid-401, Apamin, Mellitin) làm tăng khả năng miễn dịch, kháng khuẩn. Ruồi được sử dụng để chữa các vết thương hoại tử (Nguyễn, 2009).

1.1.2. Các phương thức ứng dụng côn trùng thiên địch

1.1.2.1. Nhập nội thiên địch và thuần hóa

Nhiều loài sâu hại không gây hại ở quê hương của chúng do bị kiềm hãm bởi các kẻ thù tự nhiên của chúng, nhưng khi được đưa đến nơi khác thì trở nên nguy hiểm do chúng phát triển với mật số cao vì không có thiên địch. Trong trường hợp này cần nhập nội thiên địch để kiểm soát chúng.

Đối tượng thiên địch lựa chọn để nhập nội phải là những loài có khả năng diệt sâu hại cao đã được gây nuôi ở các nước khác. Thiên địch nhập nội này phải được thuần hóa trong một thời gian, tạo điều kiện cho chúng quen với khí hậu trong nước để sử dụng có hiệu quả và ngăn chặn những ảnh hưởng tiêu cực của thiên địch tới hệ sinh thái.

1.1.2.2. Nhân nuôi và phóng thả thiên địch

Trong phương thức này, người ta tiến hành nhân nuôi thiên địch lên thành số lượng lớn, phóng thả chúng vào những nơi cần thiết bởi trong tự nhiên. Mật độ thiên địch thường không đủ lớn để có thể khống chế có hiệu quả các loài sâu, rệp hại vì vậy cần gây nuôi thiên địch để làm tăng số lượng thiên địch vào những lúc cần thiết và dễ dàng sử dụng làm cho biện pháp sinh học ngày càng được chấp nhận do hiệu quả mang lại cao.

Việc nhân nuôi thiên địch thông qua các bước:

- Bước 1: Nuôi thiên địch bằng ký chủ tự nhiên, tuy nhiên một số loại không thể nhân nuôi như vậy do tốn kém chi phí hay có nguy cơ nhiễm bệnh từ tự nhiên do vậy cần nghiên cứu xác đinh các ký chủ thay thế trong môi trường nhân tạo.
- Bước 2: Chuyển nuôi thiên địch bằng ký chủ chính sang môi trường nhân tạo, nếu nghiên cứu thành công giá thành sẽ rất rẻ. Tuy vậy cần lưu ý rằng có khá nhiều vấn đề nảy sinh khi nuôi nhân tạo như sức sống, sức ăn và sức săn mồi…

Sau khi nhân nuôi, cần chọn pha phóng thả thích hợp, thời điểm và phương pháp phóng thả thích hợp nhất. Tùy từng loài thiên địch có nhiều phương pháp phóng thả khác nhau:

- Thả trực tiếp nhộng và trứng trên lá, trên cây chủ hoặc dính lên giấy và đặt lên cây chủ.
- Đóng vào hộp sau đó thả trên đồng ruộng.
- Đóng vào hộp các pha phát triển di động đối với thiên địch bắt mồi hoặc ký sinh rồi rắc trên cây.
- Đưa cả cây hoặc chậu " sản xuất thiên địch" vào ruộng, khi thiên địch khai thác hết vật môi trên cây này hoặc khi mật độ cúng quá cao chúng sẽ tự động chuyển sang các cây khác trên ruộng.

1.2. VÀI NÉT VỀ BỌ RÙA THIÊN ĐỊCH

1.2.1. Vị trí và hệ thống phân loại

Ngành chân khớp (Arthopoda)

Lớp côn trùng (Insecta)

Bộ cánh cứng (Coleoptera)

Họ bọ rùa (Coccinellidae)

Họ Coccinelidae có một lịch sử phát triển khá lâu dài. Di tích hóa thạch đầu tiên về bọ rùa được phát hiện trong các địa tầng thuộc Jura ở Anh là những dạng nhỏ hình bầu dục thuộc giống *Coccinellophane* (Liu, 1965; Iablokoff – Khnzorian, 1976). Tiếp đó dần dần phát hiện những dạng cổ sinh khác thuộc giống *Adolia* trong hóa thạch từ giữa các thế Oligocen và Miocen ở Đức. Đại diện của các giống *Coccinella*, *Anatic* và *Sospita* được mô tả từ Oligocen hạ và Hổ phách (Liu, 1965; Iablokoff – Khnzorian, 1976) giống Scymnus từ Hổ phách ban tích (Klebs, 1910).

Các nhà côn trùng học cũng đã chứng minh được rõ ràng họ Coccinelidae gần với các họ Endo-mychidae, Corylophidae, Cerylonidae, Discolomidae. Các họ này đều thuộc liên họ Cucujoidea, phân bộ Clavicornia (Crowson, 19955, Iablokoff – Khnzorian, 1976).

Hệ thống phân loại: Redtenbacher (1843) là người đầu tiên phân chia các nhóm bọ rùa theo đặc điểm sinh học, bao gồm: bọ rùa ăn rệp, bọ rùa ăn thực vật. Hệ thống phân nhóm của Mulsant (1846, 1850) đã đặt nền móng cho việc nghiên cứu hệ thống phân loại và quan hệ phát sinh giữa các nhóm trong họ Bọ rùa. Năm 1874, Crotch đưa ra đề nghị mới về hệ thống phân loại bọ rùa trong công trình tập hợp có kiểm tra về phân loại học. Năm 1899 Casey đã công bố hệ thống phân loại mới, đến năm 1931-1932 Korschefsky sắp xếp lại các hệ thống phân loại và được xem là hệ thống phân loại chuẩn. Đến năm 1976 Iablo-koff-Khnzorian trong nghiên cứu về loại bọ rùa ở Liên Xô đã xem xét phát sinh chủng loại của Coccinellidae, và phát triển hệ thống phân loại lên thành nhiều phân họ, đó là hệ thống Sasaji (1968) (trích trong Hoàng, 1982).

Tại Việt Nam, hiện nay sắp xếp thứ hạng trong phân loại bọ rùa cũng được thực hiện theo hệ thống Sasaji (1968), gồm có: 162 loài, thuộc 5 phân họ, 55 giống. Trong đó có 52 giống với 162 loài ăn rệp, bét và các sinh vật nhỏ hại thực vật (Hà & Nguyễn, 2004).

1.2.2. Đặc tính sinh vật học của bọ rùa

- Tính ăn của bọ rùa

Bọ rùa có thể chia ra làm hai họ phụ lớn là họ phụ ăn thực vật (Epilachninae), chiếm khoảng 18%, còn lại là họ phụ bọ rùa bắt mồi chiếm 82% (Trần, 2008). Trong họ phụ bọ rùa bắt mồi, phổ thức ăn có sự khác nhau giữa các loài, bao gồm: nấm, rệp sáp, rệp sáp bông, nhện đỏ, rận cây, mật hoa….

Số lượng con mồi tiêu thụ trong vòng một ngày đối với các loài khác nhau thì khác nhau. Ước tính, một con bọ rùa trưởng thành có thể ăn đến 60 con rệp muội/ngày và trong suốt giai đoạn ấu trùng, có thể ăn từ 200-300 con rệp muội. Trong một ngày một đêm, một con bọ rùa *Serangium parsecetosum* có thể tiêu diệt gần 150 trứng và ấu trùng rệp cánh trắng hại cam *Dialeurodes citri*; sâu non tuổi lớn của bọ rùa *Cryptolaemus montrouzieri* trong một ngày ăn hết 200-300 con rệp non, 60 rệp cái trưởng thành; đối với loài bọ rùa 7 chấm (*Coccinalla septempunctata*), một sâu non cần ít nhất 400 con rệp ống, có sâu non ăn hết tới 3.100 con rệp; loài bọ rùa 13 chấm (*Harmonia sp.)* một đời ăn hết 32.000 con rệp; bọ rùa 2 chấm đỏ (*Lemnia biplagiata*) một đời ăn hết 4.000 đến 5.000 con rệp (Nguyễn, 2019).

- Sinh sản ở bọ rùa

Ngay từ khi vũ hóa, bọ rùa trưởng thành đã có khả năng giao phối. Số lượng trứng do một con cái đẻ thường rất sai khác ở các loài khác nhau: Ở *Macronaemia hauseri* là 43, *Oenopia sauzeti* – 133, *Menochilus sexmaculatus* – 149, *Coelophora biplagiata* – 170. Số lượng trứng trong từng nhóm cũng không đồng nhất.

- Bọ rùa phát triển khá nhanh, nhịp điệu của chu kì sống phụ thuộc nhiều vào điều kiện môi trường.

Bọ rùa *Rodolia cardinalis* cần 16 ngày để hoàn thành một lứa trong tháng 7 (nhiệt độ khoảng 28^0C), nhưng 78 – 86 ngày trong tháng 1 (nhiệt độ khoảng 13^0C). Vòng đời ngắn nhất là 12 ngày, trung bình là 20 – 30 ngày và dài nhất là 205 ngày (Nguyễn, 2019). Ở Nam Trung Quốc, bọ rùa *Leis axyridi*s phát triển nhanh nhất trong điều kiện nóng ẩm là 9 ngày và phát triển chậm nhất trong điều kiện mát lạnh là 21 ngày (Hoàng, 1982).

- Hiện tượng ăn thịt lẫn nhau

Hiện tượng này phổ biến ở bọ rùa khi thức ăn trở nên khan hiếm. Không chỉ con trưởng thành mà cả ấu trùng cũng ăn trứng và ấu trùng cùng loài. Thường ấu trùng và

bọ trưởng thành mới nở còn mềm yếu là đối tượng bị sát hại. Xu hướng ăn thịt lẫn nhau cũng nhận thấy ở nhóm ăn thực vật. Đối với sự tồn tại của loài, hiện tượng này có một ý nghĩa sinh học quan trọng. Con trưởng thành và ấu trùng có thể sống sót trong hoàn cảnh thức ăn quá nghèo, và do đó có thể duy trì sự tồn tại của loài (Hoàng, 1982).

- Các mối quan hệ khác loài của bọ rùa

Bọ rùa có quan hệ với nhiều nhân tố, trong đó, thiên địch của bọ rùa gồm các loài ăn thịt và kí sinh. Chim có thể ăn bọ rùa, các loài côn trùng thiên địch của bọ rùa là bọ ngựa, kiến, bọ xít, chuồn cỏ, ruồi ăn rệp…. Thiên địch kí sinh ở bọ rùa bao gồm cả tuyến trùng và vi sinh vật khác; tuy nhiên, vi khuẩn không ảnh hưởng đến bọ rùa (Trần, 2008, tr. 61).

Theo nghiên cứu của Mc Indoo (1916) chỉ ra rằng "Bọ rùa trưởng thành và cả ấu trùng của nhiều loài tự vệ bằng những giọt dịch vàng tiết ra từ khớp đầu gối. Chất tiết đó xua đuổi kẻ thù bằng mùi hắc, sự bốc hơi nhanh và vị đắng của nó. Những đặc tính ấy có lẽ là do chất cantharidin gây ra" (trích trong Hoàng, 1982, tr. 36).

1.2.3. Bọ rùa có ích và triển vọng của việc sử dụng chúng trong biện pháp đấu tranh sinh học

Khoảng 1/3 số loài bọ rùa ăn rệp ống (Aphidina), 1/3 số loài khác ăn rệp sáp (Coccina), 1/3 còn lại ăn thịt các loài động vật khác hay thực vật…(Hoàng, 1982).

Bọ rùa ăn thịt có vai trò quan trọng việc tiêu diệt côn trùng hại thực vật. "Theo De Bach (1968) thì trong số 114 trường hợp thành công mỹ mãn trong việc sử dụng biện pháp đấu tranh sinh học đã có đến 21 trường hợp là hoàn toàn sử dụng bọ rùa" (Hoàng, 1982, tr.48).

Năm 1888, hơn 500 bọ rùa đỏ *Rodolia cardinalis* được nhà khoa học người Đức gửi từ châu Úc sang California (Mỹ) đã phát huy tác dụng trong việc phòng trừ rệp sáp bông *Icerya purchase* Mask hại cam chanh, chỉ trong vòng 3 năm đã cứu được nghề trồng cam chanh tại đây.

Bắt đầu từ những năm 40 của thế kỷ XX, trên thế giới, việc nghiên cứu bọ rùa được tiến hành khẩn trương và toàn diện, nhằm nghiên cứu vận dụng bọ rùa vào đấu tranh sinh học bảo vệ cây trồng (Puttarudriah a. Channa Basavanna, 1952, 1953, 1956, 1962; Clausen, 1956, 1959; Smirnoff, 1957; Iperti, 1969, 1971; Gaprindashvili, 1975…)

Các nhà sinh học Liên Xô đã sử dụng thành công loài bọ rùa Ấn Độ *Serangium parcesetosum* trong việc phòng trừ rệp cánh trắng hại cam *Dialeneurodes citri* ở miền Nam Liên Xô. Bọ rùa 11 chấm (*Semiadalia 11-notata*) và bọ rùa 8 chấm (*Brumus oclosignatus*) trừ rệp muội hại bông. Bọ rùa nhỏ (*Stethorus punctillum*) để phòng trừ và tiêu diệt bét đỏ hại cây gỗ lớn trong rừng và cánh đồng bông ở Nam Ukrain, bọ rùa 7 chấm (*Coccinella septempuncatata*), bọ rùa 2 chấm (*Adalia bipunctara)* và bọ rùa sặc sỡ (*Adolia variegata*), bọ rùa 14 chấm (*Harmonia-14punctata*), bọ rùa mập (*Harmonia conglobata*) phòng trừ rệp củ cải đường *Aphis fabae*…(Hoàng, 1982). Khả năng ăn mồi của bọ rùa rất lớn trong một đêm, một con bọ rùa có thể tiêu diệt gần 150 trứng và ấu trùng rệp cánh trắng hại cam **(**Trần, Hoàng & Mai, 2002), bọ rùa 7 chấm (*Coccinella septempuncatata*) một con sâu non ăn ít nhất 400 con rệp ống, có sâu non ăn hết tới 3.100 rệp (Hoàng, 1982). Loài bọ rùa 13 chấm, một đời ăn hết 32.000 con rệp, bọ rùa 2 chấm đỏ một đời ăn hết 4.000-5.000 con rệp (Hà & Nguyễn, 2004).

Từ trước đến nay, người ta thường nhập nội các loài bọ rùa nói riêng và các loài thiên địch nói chung để sử dụng trong đấu tranh sinh học, mà ít chú ý tới vai trò của hệ côn trùng thiên địch ở địa phương. Hiện nay xu hướng kết hợp giữa các loài nhập nội và loài địa phương trong phòng trừ tổng hợp sâu hại đang rất được quan tâm (Hoàng, 1982).

Ở Việt Nam bao gồm các loài bọ rùa ăn nấm hại thực vật, loài ăn rệp, bét và những sinh vật nhỏ khác hại thực vật. Triển vọng sử dụng bọ rùa trong đấu tranh sinh học bảo vệ cây trồng ở Việt Nam rất lớn. Điều kiện thiên nhiên nhiệt đới, phạm vi đất đai rộng lớn như Việt Nam có rất nhiều loài bọ rùa có ích đồng thời phát triển, hầu như phát triển quanh năm (Hoàng, 1982).

Năm 2007, khi nghiên cứu về rệp sáp giả dứa *Dysmicoccus brevipescockerall* một loài sâu hại chính trên cây mãng cầu xiêm *Annonamuricata L.* tại huyện Bình Chánh Thành phố Hồ Chí Minh.

Nhóm nghiên cứu của các tác giả: Vũ Thị Nga, Nguyễn Thị Chắt, Phạm Văn Lầm đã kết hợp điều tra tần suất bắt gặp của bọ rùa hai chấm vàng S.*sbipuncatus* (thiên địch phổ biến của rệp sáp giả dứa) và khả năng hạn chế số lượng rệp sáp của loài bọ rùa này. Cho thấy, sau 3 ngày phóng thả bọ rùa, tỷ lệ rệp sáp giảm tới 95.77% (Lê, 2012). Nghiên cứu trồng các vành đai điền thanh, sau một tháng rệp *Aphis glycinea* xuất hiện, thu hút các loài bọ rùa vằn *Coccinella trasversaiis*, bọ rùa sáu vệt đen *Menochilus*

sexmaculatus, bọ rùa Nhật Bản *Propylea japonica*. Những loài bọ rùa này thường nấp trong các bãi cỏ hoang, ruộng cỏ, ruộng khoai lang. Ấu trùng tuổi một, hai, ba, bốn, đều sống lẫn với chủng quần rệp đậu. Ấu trùng và con trưởng thành đều rất phàm ăn, ấu trùng tuổi một còn ăn cả những con rệp đậu cái lớn hơn. Mỗi ngày ấu trùng tuổi bốn ăn 15 – 48 rệp (Hoàng, 1982). Tác dụng tích cực trong bảo vệ cây trồng của nhiều giống, nhiều loài trong số loài này đã được phát hiện và tận dụng ở nhiều nước như Ấn Độ, Liên Xô, Nhật Bản, …

1.3. KHÁI QUÁT VỀ BỌ RÙA *MENOCHILUS SEXMACULATUS*

1.3.1. Sơ lược về bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

Họ bọ rùa Coccinellidae là loài côn trùng có lợi vì khả năng săn mồi của chúng. Việc sử dụng bọ rùa thiên địch được coi là sự thay thế có hiệu quả về mặt kinh tế và thân thiện với môi trường hơn là sử dụng thuốc trừ sâu nguy hiểm. Vì vậy nhóm côn trùng này đang rất được quan tâm đến ứng dụng trong thực tiễn và nghiên cứu khoa học. Phần lớn các loài bọ rùa có khả năng săn mồi ở cả giai đoạn ấu trùng và trưởng thành (Shanmugapriya, Muralidharan & Karthick, 2017).

Menochilus sexmaculatus (Fabricius) thuộc phân họ Coccinellinae, tộc Coccinellini (Leach, 1815), giống *Menochilus* (Timberlake, 1943); là một trong những loài bọ rùa có khả năng săn mồi tốt, thức ăn chính của nó là rệp. Phạm vi phân bố của loài bọ rùa này rộng rãi ở khắp nơi trên thế giới như Ấn Độ, Iran, Úc và các khu vực khác của khu vực phương Đông (Agarwala và Bardhanroy, 1997). Các ưu điểm quan trọng của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* là sự phân bố địa lý, phạm vi vật chủ và môi trường sống rộng, khả năng chịu đựng một số loại thuốc trừ sâu, khả năng tìm kiếm thức ăn tốt, ấu trùng phàm ăn và dễ nuôi trong phòng thí nghiệm (Venkatesan et al, 2006) (trích trong Shanmugapriya, Muralidharan & Karthick, 2017).

Bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* là một loài rất phổ biến ở nhiều sinh cảnh của Việt Nam, chúng xuất hiện khắp đất nước từ Bắc tới Nam. Nhiều khi ta có thể bắt gặp chúng với một số lượng khá lớn trên những cánh đồng đậu, khoai lang, ruộng điền thanh, vườn ươm xoan, khi trên đó có phát triển nhiều bét hoặc rệp cây là thức ăn ưa thích của chúng (Hoàng, 1982).

1.3.2. Đặc điểm hình thái của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

Bọ rùa là côn trùng biến thái hoàn toàn. Chu kỳ sống trải qua 4 giai đoạn: trứng, ấu trùng, nhộng và trưởng thành (thành trùng).

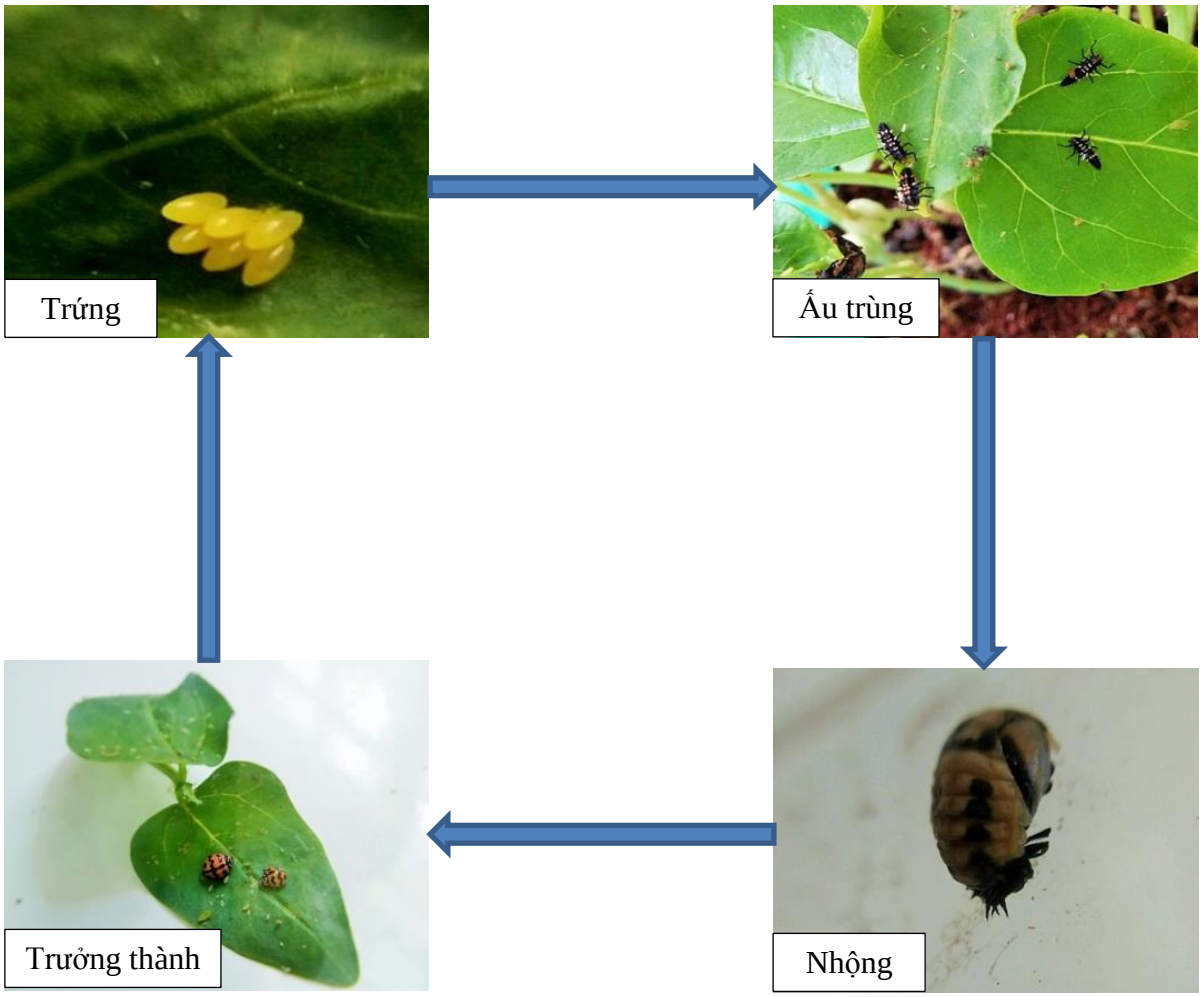
Trứng bọ rùa có hình bầu dục, thường có màu vàng nhạt cho đến vàng cam. Màu sắc của trứng thường thay đổi theo độ "chín" của trứng và chế độ dinh dưỡng. Trứng già chuyển sang màu xám, rồi sẫm. Kiểu đẻ trứng cũng tùy theo thời điểm, đẻ từng chiếc, từng cụm, lộ ra hay ẩn kín trong vật thể (Hoàng, 1983).

Ấu trùng ngay khi mới nở chưa có màu sắc đặc trưng của loài, thường có màu sáng và mềm. Sau khi nở, ấu trùng thường ở yên một chỗ để ăn phần dinh dưỡng còn sót lại bên trong vỏ trứng và những trứng nở sau; sau đó vài giờ cho đến một ngày

chúng mới bắt đầu phân tán để đi tìm thức ăn. Ấu trùng thường sinh sống, tìm thức ăn ở ngay nơi nó sinh trưởng. Thời gian phát triển của trạng thái pha ấu trùng cũng phụ thuộc nhiều vào con mồi mà chúng ăn. Ấu trùng bọ rùa lột xác ba lần và có bốn tuổi. Màu sắc, kích thước của ấu trùng thay đổi qua mỗi lần lột xác. Ấu trùng tuổi lớn có màu sắc, hoa văn rõ ràng đầu màu cam nhạt, cơ thể có màu xám đen mang hai hàng u lồi màu trắng hai bên, u lồi ở mỗi đốt và các u lồi này cao nhọn hơn so với 1 số loài khác. Phần ngực tính từ đốt thứ 3 đến đốt thứ nhất ở gần đầu tạo thành hình tháp màu trắng đục. Các đốt bụng thì đa phần giống nhau trừ đốt thứ 4 có sự khác biệt. Tại đây, tạo thành một vòng màu trắng (Hoàng, 1983).

Nhộng là thuộc kiểu nhộng trần, phần lớn ấu trùng hóa nhộng ngay những nơi nó thường sống. Khi hóa nhộng chúng không bất động hoàn toàn, có vật tác động sẽ thấy nhộng cử động, màu sắc, thời gian vũ hóa của nhộng cũng phụ thuộc nhiều vào nhiệt độ của môi trường (Hoàng, 1983).

Sau khi vũ hóa, bọ rùa trưởng thành thường bám vào vỏ xác một thời gian do lúc này cánh cứng còn mềm và yếu. Hoa văn trên cánh chưa xuất hiện ngay mà phải cần có một khoảng thời gian nhất định, cánh lúc này thường có màu vàng sáng. Pha trưởng thành có cơ thể hình trứng ngắn, gần bán cầu, gồ cao, nhẵn bóng. Đầu của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* vàng nhạt, nhiều khi có một mảng đen có hình tam giác ở giữa trán. Cánh cứng đỏ với ba đôi vệt đen ngang, vệt đen ở giữa lượn sóng. Rìa cánh và đường giáp cánh màu đen. Dải bên cánh đỏ với rìa ngoài màu đen (Hoàng, 1983).



Hình 1.1 Các pha phát triển của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

1.4. THỨC ĂN SỬ DỤNG TRONG NHÂN NUÔI BỌ RÙA THIÊN ĐỊCH

1.4.1. Ảnh hưởng của thức ăn đến bọ rùa thiên địch

Thức ăn cần thiết cho côn trùng để phát triển kích thước cơ thể, phát triển các sản phẩm sinh dục và bù đắp năng lượng bị mất trong hoạt động sống. Thức ăn có ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trao đổi chất, khả năng sinh sản, tốc độ phát triển, hoạt tính sinh dục, tỉ lệ chết, mật độ cá thể, sự phân bố trong tự nhiên và cấu tạo cơ thể.

Với thức ăn thích hợp, côn trùng có khả năng sinh sản cao hơn, có tỷ lệ chết thấp và phát triển nhanh. Đồng thời thức ăn có ý nghĩa sinh học vô cùng quan trọng trong việc giảm sự cạnh tranh cùng loài và gia tăng số lượng cá thể bọ rùa.

1.4.2. Thức ăn tự nhiên rệp Aphid

1.4.2.1. Vị trí phân loại

Ngành chân khớp (Arthopoda)

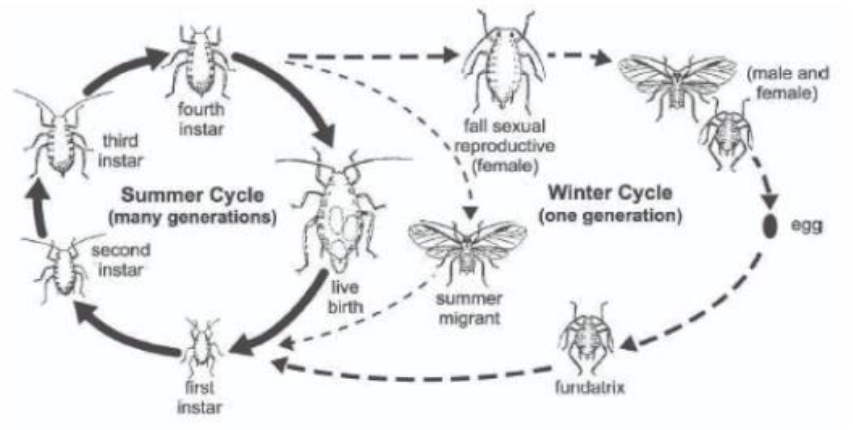
Lớp côn trùng (Insecta)

Bộ cánh đều (Homoptera)

Họ Aphididae

1.4.2.2. Đặc điểm hình thái

Rệp Aphid gây hại trên nhiều loại cây trồng khác nhau. Thân có màu xanh đen hoặc vàng xanh, phần bụng phình to, gần đuôi có 2 gai nhọn. Dù có màu sắc nào thì đều giống nhau về hình dáng, con trưởng thành có thể có cánh hoặc không. Chiều dài cơ thể 1,2 – 1,9mm. Đầu và ngực màu nâu đen, bụng vàng nhạt có khi xanh đậm. Ống bụng màu đen. Vòng đời trung bình 5-7 ngày nhưng sinh sản nhanh với sống tập trung thành tổ với số lượng lớn. Các cá thể rệp muội đều có khả năng sinh sản. Chất thải của rệp thường thu hút sự phát triển của nấm muội đen.



Hình 1.2 Các pha phát triển của rệp Aphid

1.4.2.3. Đặc tính sinh vật học

Aphid sinh sản theo 2 kiểu: sinh sản trinh sản và sinh sản hữu tính, con non sinh ra với hình dạng đầy đủ và có thể tự kiếm ăn ngay. Chúng phát triển nhanh chóng, lột xác 4 lần trước khi trưởng thành. Quá trình này mất 5-6 ngày ở 26°C và 13 ngày ở 16°C. Trong một ngày, 1 con aphid cái sinh ra 3-10 con con và suốt cuộc đời, 1 con aphid cái có thể sinh ra 40-100 con con. Do đó mật độ cá thể tăng nhanh gây ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của cây trồng.

Các loại rệp aphid đều thích chích hút trên phần non của cây làm cây bị quăn queo, chậm tăng trưởng. Trong quá trình phát triển nếu điều kiện thức ăn không đáp ứng đủ như lượng nước trong cây giảm hay nhiệt độ thấp hoặc trời khô hạn, sẽ hình thành dạng rệp có cánh (Nguyễn & Lê, 2011).

Khi chùm lá non chuyển thành lá bánh tẻ và khi bị rệp chích hút nhiều thì tập đoàn rệp giảm số lượng rất nhanh, trong đó một số ít rệp cái có cánh xuất hiện và bay khỏi tập đoàn rệp cũ, một số khác bị chết, một số khác được kiến cộng sinh tha đi đến các cành non khác hình thành tập đoàn rệp mới.

1.4.2.4. Tác hại

Aphid thường ẩn ở phần mặt dưới lá, aphid vừa có khả năng gây hại trực tiếp, vừa có khả năng gây hại gián tiếp. Chúng gây hại trực tiếp bằng cách hút cạn nguồn dinh dưỡng và gây ảnh hưởng nghiêm trọng cho sự phát triển của cây, làm biến dạng lá và giảm năng suất. Nếu aphid gây hại vào giai đoạn cây con sẽ làm chết cây. Aphid gây hại gián tiếp cho cây thông qua quá trình hút chích nhựa cây và tiết ra dịch ngọt. Dịch ngọt này làm quá trình quang hợp của lá giảm, và tạo điều kiện cho nấm đen (Cladosporium spp.) phát triển ảnh hưởng đến sự phát triển của cây. Aphid cũng chính là tác nhân truyền bệnh virus cho cây như PVY, CMV (Nguyễn & Lê, 2011).

1.4.3. Thức ăn nhân tạo

Bọ rùa là một trong những loài săn mồi có thể được sử dụng trong kiểm soát sinh học của côn trùng, sâu bệnh (rệp, nhện, bét…). Đối với hầu hết các hệ thống nông nghiệp cần tăng cường và bảo tồn đối với các loài bọ rùa để tối đa hóa việc sử dụng chúng trong kiểm soát sinh học. Sự khan hiếm thức ăn tự nhiên do ảnh hưởng của điều kiện môi trường sẽ hạn chế khả năng sinh sản của bọ rùa và việc di chuyển xa để tìm kiếm thức ăn có thể gây giảm sức sống của chúng. Do đó, nghiên cứu thức ăn nhân tạo

sẽ góp một phần quan trọng trong việc bảo tồn bọ rùa cũng như các loài thiên địch khác trong kiểm soát sinh học. (Sarwar & Saqib, 2010).

Để nhân nuôi một cách hiệu quả, sản xuất với số lượng lớn mà không bị phụ thuộc hoàn toàn vào nguồn thức ăn tự nhiên và các điều kiện bất lợi thì việc nghiên cứu tạo ra nguồn thức ăn có sẵn đang được ưu tiên như dùng bột men bia, gan lợn, mật ong để nuôi sâu non bọ rùa hay phối trộn nhộng ong, trứng gà, mật ong, thạch, nước để nuôi bọ rùa…(Trần, 2008).

Bên cạnh đó, các loại thức ăn nhân tạo còn được pha chế theo nhiều công thức khác nhau theo dạng sệt hoặc lỏng để phun trực tiếp lên lá hay quét lên cột để cắm vào luống cây nhằm duy trì mật độ bọ rùa lâu hơn trong điều kiện cạn kiệt nguồn thức ăn là rệp cây vốn có, nó còn có tác dụng dẫn dụ đối với một số loài côn trùng có ích khác (Nguyễn, 2019).

CHƯƠNG 2 – ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Bọ rùa sáu vệt *Menochilus sexmaculatus*.

2.2. THỜI GIAN, ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Tháng 08/2019 đến tháng 06/2020 tại phòng thí nghiệm động vật Khoa Sinh học trường Đại học Đà Lạt.

2.3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn tự nhiên và thức ăn nhân tạo lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* tại Đà Lạt.

2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.4.1. Nhân nuôi rệp Aphid trong phòng thí nghiệm.

2.4.1.1. Nhân nuôi rệp Aphid trên cây chủ đậu đen (*Vigna unguiculata*)

Trồng đậu đen (ngâm đậu trước khi trồng), sử dụng khay nhựa kích thước 20x35 cm có chứa giá thể (cát, xơ dừa), mật độ gieo trồng khoảng 90 – 100 hạt/khay, đặt nơi thoáng mát, đủ ánh sáng.

Thu mẫu rệp ngoài tự nhiên, sau đó mang về phòng thí nghiệm làm sạch rệp (loại bỏ tạp nhiễm không mong muốn như ong kí sinh, dòi ăn rệp…) và tiến hành lây nhiễm lên đậu đen khi cây cao khoảng 0,5 – 1 cm. Cho vào lồng nuôi.

Sau 5 ngày có thể tiến hành thu hoạch rệp để cho bọ rùa ăn và tiến hành lây nhiễm sang lứa đậu mới. Thời gian thu hoạch tốt nhất trong khoảng 5 – 7 ngày sau khi tiến hành lây nhiễm.

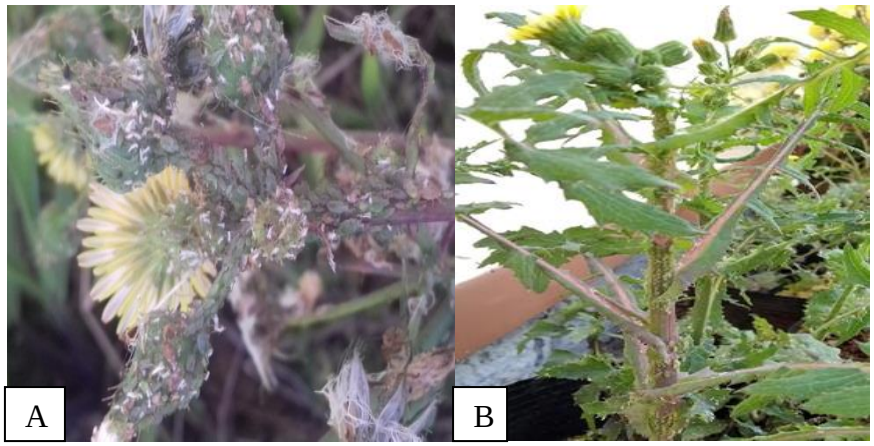


Hình 2.1 Nhân nuôi rệp trên cây đậu đen tại phòng thí nghiệm.

2.4.1.2. Nhân nuôi rệp Aphid trên cây chủ nhũ cúc (*Sonchus oleracae*).

Nhổ những cây nhũ cúc con khỏe mạnh ngoài tự nhiên mang về phòng thí nghiệm trồng trong các chậu nhựa nhỏ chứa giá thể xơ dừa.

Thu hái rệp trên cây nhũ cúc ngoài tự nhiên, mang về phòng thí nghiệm và làm sạch rệp, sau đó tiến hành lây nhiễm lên cây nhũ cúc trồng tại phòng thí nghiệm. Khi rệp phát triển nhiều trên cây thì thu hoạch. Cây phát triển cao thì có thể ngắt ngọn để tiếp tục ra nhánh mới và thu rệp.



Hình 2.2 Rệp Aphid trên cây nhũ cúc (*Sonchus oleracae*).

A – Rệp trên cây nhũ cúc tự nhiên, B – Rệp được nhân nuôi trên cây nhũ cúc tại phòng thí nghiệm.

2.4.2. Thu mẫu bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*.

Việc thu mẫu thực hiện bằng tay hoặc bằng vợt tại khuôn viên trường Đại học Đà Lạt.

Thu các pha khác nhau của bọ rùa mang về phòng thí nghiệm. Tiếp tục nhân nuôi bọ rùa bằng rệp Aphid trên cây chủ đậu đen trong phòng thí nghiệm với điều kiện nhiệt độ là 21 ± 2^0C; độ ẩm: 75 - 85% cho đến khi đẻ trứng. Thu trứng để bắt đầu thực hiện các thí nghiệm.

2.4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn tự nhiên lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*.

Thu trứng bọ rùa được nhân nuôi trong phòng thí nghiệm, quan sát trứng nở và tiến hành thí nghiệm, nuôi riêng lẻ từng cá thể ấu trùng bằng ly nhựa, có đục lỗ trên nắp ly.

Cho bọ rùa ăn thức ăn bằng rệp Aphid trên cây nhũ cúc (*Sonchus oleracae*) được nhân nuôi ở trong phòng thí nghiệm và thu hái ngoài tự nhiên ở các pha: ấu trùng,

trưởng thành. Mỗi ngày đếm và cho vào từng ly nhựa một lượng rệp dư thừa, sau một ngày đếm số rệp còn lại trong ly, ghi nhận số rệp đã ăn. Đối với pha ấu trùng quan sát khả năng ăn mồi từ lúc mới nở cho đến khi hóa nhộng, pha trưởng thành ghi nhận khả năng ăn mồi trong 5 ngày.

Tiến hành bắt cặp trưởng thành, sau đó tách từng cặp nhân nuôi trong ly nhựa để thu số liệu về khả năng sinh sản. Thu trứng được thực hiện liên tục 1-2 ngày sẽ thu một lần và ghi nhận số liệu.



Hình 2.3 Ghép cặp nhân nuôi trong ly nhựa

2.4.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn nhân tạo lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus.*

Để nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn nhân tạo lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* tiến hành thí nghiệm trên 4 công thức sau:

Công thức 1: Nhộng ong (10g), trứng gà (2g), mật ong (3g), thạch (0,7g), nước (30g) (Nguyễn, 2019).

Công thức 2: Agar (1,3g), đường (16g), mật ong (6g), tryptone (1g), nước (100ml) (Shanmugapriya, Muralidharan & Karthick, 2017).

Công thức 3: Lòng đỏ trứng gà (25g), đường (2g), mật ong (4g), casein (2g), tryptone (1g) (Shanmugapriya, Muralidharan & Karthick, 2017).

Công thức 4: Gan gà luộc, bổ sung rệp tươi (nghiền nát) (Priyadarshani and et al, 2017).

Chuẩn bị nguyên liệu, phối trộn, lữu trữ trong tủ lạnh (ngăn đá). Khi sử dụng thì rã đông bằng nước nóng, phơi nắng hoặc sử dụng máy sấy. Riêng đối với Công thức 1 và Công thức 2 phải đun sôi hỗn hợp dưới ngọn lửa đèn cồn, đổ vào khuôn tạo thành lớp thạch dày 0,2 – 0,3 cm, để nguội. Sử dụng miếng giấy nhỏ kích thước 2 x 1cm để chứa

thức ăn nhân tạo cho bọ rùa ăn và kích thước thức ăn trong khoảng 0,5 x 0,5cm. Thức ăn nhân tạo được thay mới mỗi ngày.

Thu trứng bọ rùa được nhân nuôi trong phòng thí nghiệm quan sát trứng nở và tiến thành thí nghiệm với các công thức thức ăn lên các cá thể bọ rùa pha ấu trùng và pha trưởng thành. Nuôi riêng lẻ từng cá thể ấu trùng, cặp bọ rùa trưởng thành trong mỗi ly nhựa có kích thước 4 x 6 cm, nắp đục lỗ và bỏ 1 mảnh giấy nhỏ bên trong ly kích thước 3 x 3 cm. Đối với thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn nhân tạo lên sự phát triển của pha trưởng thành và sức sinh sản của bọ rùa *Menochilus sexmacunltus* được sử dụng nhộng vũ hóa từ thức ăn tự nhiên.



Hình 2.4 Bố trí thí nghiệm nhân nuôi bằng thức ăn nhân tạo bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

2.4.5. Làm tiêu bản

Phương pháp gắn mẫu trên giấy: Được áp dụng cho hầu hết các mẫu có kích thước cơ thể nhỏ. Trước hết chọn các loại giấy dày (dày bằng 2 lớp giấy sử dụng cho giấy in), cắt bìa cứng thành hình những tam giác nhỏ có góc nhọn. Ghim côn trùng ở nữa đáy, cách đáy tam giác một đoạn bằng 1/3 chiều dài của tam giác nhỏ. Miếng bìa tam giác ở vị trí sao cho từ mũi nhọn của ghim đến bìa bằng hai lần khoảng cách từ miếng bìa đến đầu mũi kim.

Mẫu được sấy ở nhiệt độ 40^0C trong vòng 5 - 7 ngày, bảo quản trong hộp gỗ có bổ sung silicagel và long não.



Hình 2.5 Tiêu bản pha trưởng thành bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

2.4.6. Xử lý thống kê

Số liệu được xử lí thống kê trên máy tính bằng phần mềm Excel 2010 (Trong đó: X là giá trị trung bình, SD là độ lệch chuẩn).

CHƯƠNG 3 – KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA THỨC ĂN TỰ NHIÊN LÀ RỆP APHID ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ KHẢ NĂNG SINH SẢN CỦA LOÀI BỌ RÙA *MENOCHILUS SEXMACULATUS*

3.1.1. Thời gian phát triển các pha của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

Bảng 3.1 Thời gian phát triển các pha của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

Pha phát triển	Số lượng quan sát	Thời gian phát triển (X±*SD*)
Trứng	113	4,00 ± 1,58
Ấu trùng (tuổi 1-4)	70	9,39 ± 1,57
Nhộng	63	7,24 ± 1,08
Tuổi thọ	30	89,37 ± 30,20

Giai đoạn trước trưởng thành bao gồm ba pha là trứng, ấu trùng và nhộng. Thời gian phát triển của pha trứng kéo dài từ 2-6 ngày, trung bình là 4,00±1,58 ngày (Bảng 3.1)**.** Thời gian trứng nở vào ngày thứ 4 chiếm tỷ lệ cao nhất (54,87%), tỷ lệ nở thấp nhất vào ngày thứ 2 chiếm (1,77%). Tỷ lệ trứng nở (85,60%).

Trứng nở không đồng đều, rải rác qua nhiều ngày, trứng sau khi nở thành ấu trùng chúng sẽ ăn hết vỏ trứng sau đó mới bắt đầu tìm kiếm thức ăn chính vì vậy có thể ăn cả những quả trứng chưa nở.

Thời gian phát triển của pha ấu trùng 7-16 ngày, trung bình là 9,39±1,57 ngày (Bảng 3.1), nhóm có thời gian phát triển của pha ấu trùng là 9 ngày chiếm tỷ lệ cao nhất (50,00%), thời gian phát triển của pha ấu trùng là 12 và 16 ngày chiếm tỷ lệ thấp nhất (1,43%).

Thời gian phát triển của pha nhộng kéo dài 6-11 ngày, trung bình là 7,24±1,08 ngày (Bảng 3.1). Nhóm có thời gian phát triển của pha nhộng 8 ngày chiếm tỷ lệ cao nhất (33,33%), nhóm có thời gian phát triển của pha nhộng 11 ngày chiếm tỷ lệ thấp nhất (1,59%).

Như vậy, tổng thời gian phát triển trước trưởng thành bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* trung bình là 20,63 ngày (Bảng 3.1).

Trong thí nghiệm xác định thời gian pha trưởng thành của nhóm nghiên cứu trên bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* ghi nhận thời gian sống trung bình của một con bọ rùa là 89,37±30,20 ngày, thời gian sống lâu nhất là 140 ngày, ít nhất là 55 ngày. thời

gian trước sinh của con cái từ 5 - 11 ngày ngắn hơn rất nhiều so với nghiên cứu trước đây.

Theo nghiên cứu của Shanmugapriya and et al, (2017) về loài bọ rùa này, ở nhiệt độ phòng 22 đến 28,5^{0}C trung bình: 25,12±1,68^{0}C thời gian trứng nở là 1-3 ngày trung bình: 1,48±0,54 ngày, tỷ lệ trứng nở thay đổi từ 80 đến 86,67% với trung bình là 82,85%. Thời gian pha nhộng là 5,88±0,73 ngày. Thời gian sống pha trưởng thành của con đực giao động từ 23 đến 41 ngày, trung bình: 35,20±3,72 ngày trong khi đó là 23 - 43 ngày đối với con cái. Thời gian trước sinh sản khoảng 16 - 38 ngày với trung bình 22,96±3,54 ngày.

Đối chiếu kết quả chúng tôi thu được và tác giả Shanmugapriya and et al, (2017) về loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*, nhận thấy có sự chênh lệch về thời gian phát triển cụ thể pha trứng, pha ấu trùng, pha nhộng, pha trưởng thành thời gian dài hơn có thể do sự chênh lệch về nhiệt độ, ở pha ấu trùng và pha trưởng thành ngoài ra chịu ảnh hưởng bởi loại thức ăn so với thí nghiệm của tác giả Shanmugapriya and et al, (2017).

3.1.2. Khả năng ăn mồi của ấu trùng và trưởng thành bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* trong phòng thí nghiệm

Bảng 3.2 Khả năng ăn mồi của pha ấu trùng và trưởng thành

Thời gian theo dõi	**Số lượng quan sát (cá thể)**	**Lượng thức ăn (X±*SD*) (con rệp)**
Thời gian ấu trùng (tuổi 1-4)	70	99,63 ± 19,20
Thời gian một ngày đối với trưởng thành	40	30,38 ± 4,10

Lượng thức ăn mỗi cá thể tiêu thụ khác nhau, ở pha ấu trùng thì mỗi cá thể tiêu thụ khoảng 99,63±19,20 con rệp (Bảng 3.2), ấu trùng mới nở khả năng săn mồi chưa linh hoạt, sức ăn ít nên chỉ ăn một vài con rệp trong ngày. Vào giai đoạn tuổi 2 và 3 thì khả năng săn mồi linh hoạt, giai đoạn này ấu trùng sẽ ăn được nhiều nhất, nhưng đến tuổi 4 ở thời điểm gần hóa nhộng thì sức ăn giảm.

Pha trưởng thành, quan sát lượng rệp ăn trong 5 ngày thì ghi nhận được mỗi

ngày một cá thể tiêu thụ 30,38±4,10 con rệp (Bảng 3.2). Trong thời gian mới vũ hóa cơ thể còn yếu, mềm, khó di chuyển sau một vài tiếng cơ thể cứng cáp, linh hoạt thì săn mồi tốt. Vì mỗi cá thể bọ rùa có thời gian sống khác nhau nên ở thí nghiệm này ghi nhận số lượng thức ăn trung bình của một ngày để ước lượng tương đối lượng rệp tiêu thụ trong suốt thời gian sống của pha trưởng thành.

3.1.3. Khả năng sinh sản

Bọ rùa mới vũ hóa thường sẽ không ghép cặp ngay. Sau khi vũ hóa từ 2-3 ngày bọ rùa sẽ bắt đầu ghép cặp, trung bình khoảng 7,40±2,23 ngày bắt đầu đẻ trứng (Bảng 3.3), trứng bọ rùa thường đẻ theo cụm, tuy nhiên khi mới bắt đầu sinh sản thì lượng trứng đẻ không đáng kể và rải rác vài nơi, lượng trứng đẻ nhiều nhất trong một ngày là 79 trứng, ít nhất là 1 trứng.

Trung bình một con cái đẻ 1042±399 trứng, ít nhất là 185 trứng, nhiều nhất lên đến 1658 trứng.

So với nghiên cứu trước đây của tác giả Shanmugapriya and et al, (2017) thời gian trước sinh là 22,96±3,54 ngày, số lượng trứng đẻ của một con cái là 323,52±24,80 trứng. Như vậy kết quả ghi nhận của nhóm chúng tôi về thời gian trước đẻ ngắn hơn và số lượng trứng đẻ của một con cái nhiều hơn gấp khoảng 3 lần.

Bảng 3.3 Khả năng sinh sản của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

STT	**Thời gian trước đẻ**	**Số lượng trướng đẻ**
1	9	988
2	11	863
3	9	970
4	9	1588
5	5	1658
6	5	1420
7	5	1075
8	5	1009
9	5	1427
10	8	847
11	9	1028
12	8	899
13	6	185
14	6	1249
15	11	424
X±*SD*	**7,40 ± 2,23**	**1042 ± 399**

3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA THỨC ĂN NHÂN TẠO ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ KHẢ NĂNG SINH SẢN CỦA LOÀI BỌ RÙA *MENOCHILUS SEXMACULATUS*

3.2.1. Khả năng sống sót của pha ấu trùng và tuổi thọ pha trưởng thành khi nhân nuôi bằng các loại thức ăn nhân tạo lên loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

Bảng 3.4 Ảnh hưởng của các loại thức ăn nhân tạo lên khả năng sống sót của pha ấu trùng và tuổi thọ pha trưởng thành của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

Pha phát triển		Công thức 1	Công thức 2	Công thức 3	Công thức 4
Pha ấu trùng	Số cá thể quan sát	105	35	60	35
	% cá thể sống sót sau 5 ngày	94,28	85,71	0,00	28,57
	% cá thể sống sót sau 10 ngày	81,90	22,85	0,00	2,86
	% cá thể sống sót sau 15 ngày	57,14	11,43	0,00	0,00
	% cá thể sống sót sau 20 ngày	42,85	0,00	0,00	0,00
	% cá thể hóa nhộng	5,71	0,00	0,00	0,00
	Thời gian phát triển	34,17 ± 9,49	–	–	–
Pha trưởng thành	Số cá thể quan sát	30	30	30	30
	Tuổi thọ	101,83 ± 38,54	78,43 ± 27,66 *	15,86 ± 3,50	14,73 ± 2,83

Ghi chú: * Tính đến thời điểm ngày 20/06/2020

Thức ăn nhân tạo ảnh hưởng đến khả năng sống sót của pha ấu trùng và tuổi thọ pha trưởng thành của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*. Bọ rùa có khả năng sống sót ở pha ấu trùng và hóa nhộng khi nhân nuôi bằng công thức 1, ấu trùng chết hết và không thể hóa nhộng khi nhân nuôi bằng công thức 2, 3 và 4. Pha trưởng thành tuổi

thọ cao khi nhân nuôi bằng công thức 1 và 2, tuổi thọ thấp khi nhân nuôi bằng công thức 3 và 4 (Bảng 3.4).

Khi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của 4 loại thức ăn nhân tạo thì khả năng sống sót của pha ấu trùng khác nhau giữa các công thức. Kết quả thu được ở bảng 3.4 cho thấy, đối với công thức 1 tỷ lệ % ấu trùng sống sót sau 20 ngày quan sát là 42,85% trong khi đó các công thức khác đều chết. Sau đó số cá thể giảm dần và số lượng cá thể hoàn thành pha ấu trùng là 6 cá thể. Thời gian phát triển trung bình pha ấu trùng ở công thức 1 là 34,17±9,49 ngày và tỷ lệ % ấu trùng phát triển ở công thức 1 đến pha nhộng là 5,71%. Ở công thức 2, 3 và 4 ấu trùng đều không sống sót. Sau 5 ngày và 10 ngày quan sát pha ấu trùng ở cả 4 công thức đều có sự thay đổi về số lượng, số lượng ấu trùng giảm dần. Chỉ có công thức 1 pha ấu trùng phát triển đến pha nhộng (Bảng 3.4). Công thức 2 pha ấu trùng phát triển và bắt đầu giảm dần vào ngày thứ 3, số lượng chết hết vào ngày thứ 18.

So sánh với nghiên cứu của nhóm tác giả Sarwar & Saqib (2010) nhân nuôi bọ rùa *Coccinella Septempunctata* bằng công thức 2 có bổ sung men bột cỏ linh lăng (alfalfa flour yeast) thì tỷ lệ sống pha ấu trùng là 75,32%. Điều này có thể do công thức 2 khi nhân nuôi pha ấu trùng bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* là không phù hợp hoặc do không có thành phần men cỏ linh lăng như trong công thức của nhóm tác giả Sarwar & Saqib (2010). Với công thức 3 pha ấu trùng phát triển và bắt đầu giảm dần vào ngày thứ 3, số lượng chết hết vào ngày thứ 5. Theo nghiên cứu của nhóm tác giả Sarwar & Saqib (2010) nhân nuôi bọ rùa *Coccinella Septempunctata* bằng công thức 3 tỷ lệ sống của pha ấu trùng là 0%. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của nhóm chúng tôi. Chúng tôi sơ bộ kết luận rằng khi nhân nuôi pha ấu trùng bọ rùa bằng thức ăn theo công thức 3 là không phù hợp. Đối với công thức 4 pha ấu trùng phát triển và bắt đầu giảm dần vào ngày thứ 2, số lượng chết hết vào ngày thứ 13. Trong khi đó, theo nghiên cứu của nhóm tác giả Sarwar & Saqib(2010) nhân nuôi ấu trùng bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* tỷ lệ sống của ấu trùng là 72% ở 27^0C và độ ẩm: 80%. Điều này có thể là do nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng sống sót của pha ấu trùng bọ rùa *Menochilus sexmaculatus.*

Tỷ lệ nhộng vũ hóa thành công khi ăn thức ăn nhân tạo công thức 1 đạt 83,33%, thấp hơn so với tỷ lệ nhộng vũ hóa khi nhân nuôi bằng thức ăn tự nhiên (90%), tuy

nhiên sự chênh lệch nhưng không nhiều. Ở công thức 2, 3 và 4 pha ấu trùng không thể sống đến khi hóa nhộng.

Tuổi thọ của bọ rùa khi nhân nuôi bằng công thức 1 và công thức 2 kéo dài hơn so với công thức 3 và công thức 4. Công thức 1 tuổi thọ thấp nhất là 26 ngày và dài nhất là 148 ngày, trung bình 101,83±38,54 ngày. Với công thức 2 tuổi thọ thấp nhất là 15 ngày và cao nhất (tính đến ngày 20/06/2020) là 102 ngày, trung bình 78,43±27,66 ngày. So với nghiên cứu của nhóm tác giả Sarwar & Saqib (2010) nghiên cứu dựa trên công thức 2 có bổ sung thêm men cỏ linh lăng thì tuổi thọ khi nhân nuôi bọ rùa *Coccinella Septempunctata* lại rất thấp so với công thức 2 khi không bổ sung men bột cỏ đinh lăng khi nhân nuôi bọ rùa *Menochilus sexmaculatus.* Đối với công thức 3 và và công thức 4 tuổi thọ khá thấp chênh lệch nhau không đáng kể. Tuổi thọ thấp nhất 11 ngày và cao nhất là 22 ngày.

Dựa vào kết quả ở bảng trên, chúng tôi nhận thấy trong các công thức thức ăn nhân tạo thì công thức 1 có tính khả quan nhất, cả pha ấu trùng và trưởng thành đều có khả năng sống sót. Tuổi thọ ở công thức 1 cũng khá cao.

3.1.2. So sánh ảnh hưởng của thức ăn nhân tạo (công thức 1) và thức ăn tự nhiên đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

Bảng 3.5 Ảnh hưởng của Công thức 1 và thức ăn tự nhiên lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*

	Thức ăn nhân tạo (Công thức 1)	**Thức ăn tự nhiên**
Pha phát triển	**Thời gian phát triển (X±*SD*)**	**Thời gian phát triển (X±*SD*)**
Trứng	4,50 ± 1,29	4,00 ± 1,58
Ấu trùng	34,17 ± 9,49	9,39 ± 1,57
Nhộng	6,83 ± 0,40	7,24 ± 1,08
Thời gian trước đẻ	45,93 ± 27,42	7,40 ± 2,23
Số lượng trứng đẻ	15,00 ± 10,60	1042 ± 399
Tuổi thọ	101,83 ± 38,54	89,37 ± 30,20

Thời gian pha trứng không có sự chênh lệch đáng kể so với các công thức thức ăn nhân tạo khác và thức ăn tự nhiên. Thời gian phát triển của pha trứng là 3 – 6 ngày, trung bình 4,50±1,29 ngày (Bảng 3.5). Trong đó, nhóm có thời gian phát triển của pha trứng vào ngày thứ 4 chiếm tỷ lệ cao nhất (58,57%). Nhóm có thời gian phát triển vào ngày thứ 6 chiếm tỷ lệ thấp nhất (11,42%). Tỷ lệ trứng nở là 94,59 %.

Thời gian phát triển của pha ấu trùng kéo dài 24 – 48 ngày, trung bình 34,17±9,49 ngày (Bảng 3.5). Đối với nghiên cứu bằng thức ăn tự nhiên là rệp Aphid thì thời gian của pha ấu trùng là 9,39±1,57 ngày, chênh lệch 24,78 ngày. Nghiên cứu (Solangi và ctg, 2005) nhân nuôi *Menochilus sexmaculatus* bằng rệp sáp thời gian phát triển của pha ấu trùng trung bình là 12,30±2,41 ngày. Nghiên cứu (Nguyễn, 2019) nhân nuôi bọ rùa *Oenopia Kirbyi* ở pha ấu trùng theo công thức của tác giả Trần Văn Mão, (2008) thời gian trung bình 12,02 ngày, không có sự khác biệt lớn so với thức ăn tự nhiên. Như vậy, thức ăn nhân tạo theo công thức của tác giả Trần Văn Mão, (2008) làm kéo dài thời gian phát triển pha ấu trùng của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* và thức ăn nhân tạo ảnh hưởng đến tùy từng loài bọ rùa khi nhân nuôi.

Thời gian của pha nhộng là 6 – 7 ngày, trung bình 6,83±0,40 ngày (Bảng 3.5). Nhóm có thời gian phát triển vào ngày thứ 6 chiếm 40% và ngày thứ 7 chiếm 60%. Tỷ lệ nhộng vũ hóa thành công chiếm 83,33% và tỷ lệ nhộng không vũ hóa chiếm 16,66%. So với nghiên cứu nhân nuôi bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* bằng thức ăn tự nhiên trong điều kiện ở cùng thời điểm tại phòng thí nghiệm thì trung bình thời gian pha nhộng là 7,24±1,08 ngày. Kết quả cho thấy thời gian pha nhộng khi nhân nuôi bằng thức ăn tự nhiên so với thức ăn nhân tạo không có sự khác biệt lớn.

Tuổi thọ trung bình của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* trung bình là 101,83±38,54 ngày. Thời gian sống ngắn nhất là 26 ngày, thời gian sống dài nhất là 148 ngày. So với nghiên cứu nhân nuôi bằng thức ăn tự nhiên là rệp Aphid khi nhân nuôi bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* trong điều kiện phòng thí nghiệm ở cùng thời điểm là 89,37±30,20 ngày. Điều này cho thấy thức ăn nhân tạo kéo dài thời gian sống của bọ rùa nhưng khả năng sinh sản kém hơn so với nghiên cứu nhân nuôi bằng thức ăn tự nhiên.

Thời gian trước đẻ trứng của con cái trung bình là 45,93±27,42 (Bảng 3.5). So với nghiên cứu của Mirhosseini and et al (2015, tr.109) cho rằng nhân nuôi bọ rùa

Menochilus sexmaculatus bằng thức ăn nhân tạo gồm gan có bổ sung đường thì bọ rùa không sinh sản. Công thức thức ăn nhân tạo của tác giả Trần Văn Mão (2008) có lợi thế hơn. So với nhân nuôi bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* bằng thức ăn tự nhiên là rệp Aphid thì thời gian trước đẻ trứng của con cái trung bình 7,40±2,23, chênh nhau 38,53 ngày. Kết quả trên cho thấy thức ăn nhân tạo ảnh hưởng đến thời gian trước đẻ trứng của bọ rùa.

Trung bình một con cái đẻ 15,00±10,60 quả trứng. Nhiều nhất là 37 quả trứng và ít nhất là 4 quả trứng. So với thức ăn tự nhiên thì trung bình một con cái đẻ 1042±399, nhiều nhất 1658 quả trứng và ít nhất 185 quả trứng. Từ kết quả này , ta nhận thấy rằng thức ăn ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh sản của bọ rùa.

KẾT LUẬN

Qua thời gian nghiên cứu về loài bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* tại phòng thí nghiệm khoa Sinh học trường Đại học Đà Lạt, chúng tôi rút ra kết luận như sau:

1. Khi nhân nuôi bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* với thức ăn là rệp Aphid trên cây nhũ cúc *Sonchus oleracae* thì thời gian phát triển của pha trứng, ấu trùng, nhộng và trưởng thành lần lượt là 4,00±1,58 ngày; 9,39±1,57 ngày; 7,24±1,08 ngày và 89,37±30,20 ngày.
2. Khi nuôi bằng rệp Aphid trên cây nhũ cúc *Sonchus oleracae* sức sinh sản của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* trung bình là 1042±399 trứng/con cái; thời gian trước đẻ là 7,40±2,23 ngày.
3. Khả năng ăn mồi pha ấu trùng là 99,63±19,20 con rệp; khả năng ăn mồi của con trưởng thành trong một ngày là 30,38±4,10 con rệp.
4. Thức ăn nhân tạo ảnh hưởng đến khả năng sống sót của ấu trùng và tuổi thọ của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus*. Trong 4 công thức, chỉ có công thức 1 ấu trùng có khả năng sống sót phát triển tới pha nhộng với thời gian pha ấu trùng là 34,17±9,49 ngày. Tuổi thọ bọ rùa khi cho ăn các công thức thức ăn nhân tạo lần lượt là 101,83±38,54 ngày; 78,43±27,66 ngày; 15,86±3,50 ngày và 14,73±2,83 ngày.
5. Thức ăn nhân tạo (công thức 1) kéo dài thời gian phát triển pha ấu trùng (trung bình 34,17±9,49 ngày), thời gian trước đẻ của bọ rùa cái (trung bình 45,93±27,42 ngày) và làm giảm đáng kể khả năng sinh sản của bọ rùa *Menochilus sexmaculatus* (trung bình 15,00±10,60 trứng/con cái).

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của các loài rệp Aphid khác nhau lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh sản của loài bọ rùa *Menochilus semaculatus*.
2. Tiếp tục nghiên cứu cải tiến thức ăn nhân tạo công thức 1 và công thức 2 để sử dụng trong thực tế.
3. Nghiên cứu sử dụng kết hợp thức ăn tự nhiên và thức ăn nhân tạo trong nhân nuôi bọ rùa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Hà, H. N., & Nguyễn, T. C. (2004). *Bảo vệ thực vật*. NXB Đại học Sư phạm.

Hoàng, Đ. N. (1982). *Bọ rùa - Coccinellidae ở Việt Nam*. NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, Tập I.

Hoàng, Đ. N. (1983). *Bọ rùa - Coccinellidae ở Việt Nam*. NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, Tập II.

Lê, T. K. L. (2012). *Hoàn thiện quy trình nhân nuôi một số loại bọ rùa thiên địch trong phòng thí nghiệm*. Khóa luận tốt nghiệp đại học Khóa 32 ngành Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt.

Nguyễn, Đ. S. (2019). *Bước đầu nghiên cứu đặc điểm hình thái và đặc tính sinh vật học của loài bọ rùa Oenopia kyrbiy*. Khóa luận tốt nghiệp đại học Khóa 39 ngành Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt.

Nguyễn, T. N. (2009). *Côn trùng học*. NXB Nông Nghiệp, Tập 1.

Nguyễn, T. T. C., & Trần, N. T. T. (2010). Đặc điểm sinh vật học của bọ rùa *Chilocorus politus* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 66-75.

Nguyễn, V. H., & Lê, T. S. (2011). *Côn trùng gây hại cây trồng*. NXB Nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh.

Priyadarshani, T. D. C., Hemachandra, K. S., Sirisena, U. G. A. I., & Wijayagunasekara, H. N. P. (2017). Mass rearing of Cheilomenessexmaculata (Coleoptera: Coccinellidae) on different diets under laboratory conditions. Tropical Agricultural Research, 28(2).

Sarwar, M., & Saqib, S. M. (2010). Rearing of predatory seven spotted ladybird beetle Coccinella septempunctata L.(Coleoptera: Coccinellidae) on natural and artificial diets under laboratory conditions. Pakistan Journal of Zoology, 42(1).

Shanmugapriya, V., Muralidharan, C. M., & Karthick, K. (2017). Biology and Bionomics of Zig Zag Beetle Cheilomenes sexmaculatus Fabricius (Coleoptera: Coccinellidae). Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 6(3), 541-548.

Trần, K., Hoàng, Đ. N., & Mai, S. T. (2002). *Sinh thái học và môi trường*. NXB Giáo dục.

Trần, V. M. (2008). *Sử dụng sâu nấm có ích*. Trường Đại học Lâm Nghiệp.

http://biocont.chiliweb.org/rep-aphid/