

**TỔNG CÔNG TY HÓA CHẤT VIỆT NAM**  
**VIỆN HÓA HỌC CÔNG NGHIỆP VIỆT NAM**

**Báo cáo tổng kết đề tài:**

**NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CAO DỊCH CHIẾT CỦA RỄ CÂY  
CHÚT CHÍT RUMEX CRISPUS ĐỊNH HƯỚNG LÀM THUỐC TRỪ NẤM  
THẢO MỘC THÂN THIỆN MÔI TRƯỜNG**

**Chủ nhiệm đề tài:**

**TS. Lưu Hoàng Ngọc**

**Cán bộ tham gia:**

**Ths. Nguyễn Ngọc Thanh**

**Ths. Nguyễn Thị Hoài Anh**

**Ths. Nguyễn Thị Thu Hương**

**Ks. Nguyễn Mai Cương**

**Cn. Lê Ngọc Thúc**

**Ks. Nguyễn Thanh Loan**

**7453**  
**15/7/2009**

**Hà Nội, 04 - 2009**

# MỤC LỤC

<b>LỜI NÓI ĐẦU</b>	1
<b>CHƯƠNG I: TỔNG QUAN</b>	3
1.1. Giới thiệu chung về cây <i>Rumex crispus</i>	3
1.2. Thành phần hoá học trong cây <i>Rumex crispus</i>	4
1.3. Hoạt tính sinh học của một số hợp chất chính trong <i>Rumex</i>	6
1.4. Một số ứng dụng chính	9
1.4.1. Đặc điểm sinh học và sinh thái của nấm <i>Fusarium sp</i> gây bệnh héo vàng cây khoai tây và héo rũ cây chuối	10
1.5. Phương pháp chiết tách cao dịch chiết rễ cây <i>rumex</i> và các chất có hoạt tính	13
1.5.1. Phương pháp của Jin-Cheol Kim và cộng sự	13
1.5.1. Phương pháp Ausat A. Khan	14
1.6. Lựa chọn công nghệ	14
<b>CHƯƠNG II: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	16
2.1. Đối tượng nghiên cứu	16
2.2. Thiết kế nghiên cứu	16
2.3. Hoá chất thiết bị	17
2.4. Phương pháp nghiên cứu	17
2.4.1. Chiết cao tổng	17
2.4.2. Làm giàu cao dịch chiết	17
2.4.3. Phân tích sản phẩm	17
2.4.4. Thử hoạt tính sinh học	18
<b>CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b>	20
3.1. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết	20
3.1.1. Ảnh hưởng của dung môi chiết	20
3.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết	21
3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian chiết	22
3.2. Làm giàu cao dịch chiết	24
3.3. Phân tích sản phẩm	25
3.4. Kết quả thử hoạt tính	26
3.4.1. Hiệu quả ức chế với nấm <i>Fusarium</i> gây bệnh héo vàng cây khoai tây	26
3.4.2. Hiệu quả ức chế nấm <i>Fusarium</i> gây bệnh héo rũ cây chuối	27
3.4.3. Hiệu quả ức chế một số loại bệnh khác	29
3.5. Sản xuất thử nghiệm, thử nghiệm sản phẩm	30

3.5.1. Sản xuất thử nghiệm	30
3.5.2. Bào chế chế phẩm	31
3.6. Đề xuất tiêu chuẩn cơ sở dịch chiết rễ cây <i>Rumex crispus</i>	32
<b>KẾT LUẬN</b>	33
<b>MỘT SỐ KIẾN NGHỊ</b>	34
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	35
<b>MỘT SỐ KIẾN NGHỊ</b>	37
<b>PHỤ LỤC</b>	

## LỜI NÓI ĐẦU

Nhóm bệnh nấm mốc là một trong những bệnh gây hại nhất ở cây trồng, gây giảm năng suất mùa màng. Đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng thuốc trừ nấm để trừ loại bệnh này từ những loại thuốc trừ nấm gốc vô cơ tới những loại tổng hợp nhưng đều chưa có hiệu quả rõ rệt, lại gây ô nhiễm môi trường và sức khỏe con người. Các nghiên cứu gần đây về loài *Rumex sp.* L cho hiệu quả diệt nấm tốt, đặc hiệu với loại bệnh nấm mốc sương trên cây lúa, đậu Hà lan và cây dưa chuột. Ngoài ra sản phẩm này cũng tác dụng tới các loại nấm mốc gây bệnh như *M.grisea*, *C.sasaki*, *B.cinerea*, *P.recondite*, *B.graminis* f.sp ở lúa, và khoai tây. Các phép thử cho thấy những hợp chất emodin, parientin có tính chất diệt nấm, liều EC<sub>50</sub> (nồng độ ảnh hưởng tối đa 50%) từ 0,48-20µg/ml và hỗn hợp dịch chiết *Rumex sp.* có nồng độ khoảng 250µg/ml cho hiệu quả diệt nấm cao và phổ rộng, đặc hiệu cao trên một số loại nấm mốc sương trắng *Podosphaera sp.* và *Blumeria sp.* Phát triển sản phẩm mới từ nguồn thảo dược sẵn có là việc cần thiết, mang lại hiệu quả kinh tế cao.

Hiện Hàn Quốc đang phải nhập khẩu dịch chiết *Rumex*, sản phẩm này có giá vào khoảng 59 - 60 USD/1kg dịch chiết. Ở Việt nam chưa có nghiên cứu cụ thể nào về sản xuất cao dịch chiết rễ cây chút chút theo định hướng làm thuốc bảo vệ thực vật. Năm 2007, Viện KRICT (Hàn Quốc) và Viện Hóa học công nghiệp Việt Nam đã ký văn bản ghi nhớ hợp tác nghiên cứu sàng lọc và phát triển các chế phẩm bảo vệ thực vật có nguồn gốc từ cây cỏ Việt Nam. *Rumex* là một trong những đối tượng cả hai bên cùng quan tâm.

Xuất phát từ nhu cầu hợp tác nghiên cứu và sản xuất chế phẩm thuốc trừ nấm sinh học không gây hại môi trường, chúng tôi đã đề xuất và thực hiện đề tài “*Nghiên cứu công nghệ sản xuất cao dịch chiết của rễ cây chút chút Rumex crispus định hướng làm thuốc trừ nấm thảo mộc thân thiện môi trường*” với các nội dung cụ thể như sau:

- Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết tách;

- Làm giàu cao dịch chiết, đạt tiêu chuẩn làm thuốc trừ nấm và tiêu chuẩn xuất khẩu;
- Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao dịch chiết từ rễ cây chút chít;
- Thử hoạt tính sinh học;
- Thử nghiệm chế tạo thuốc trừ nấm thảo mộc thân thiện môi trường.

# CHƯƠNG I: TỔNG QUAN

## 1.1. Giới thiệu chung về cây *Rumex crispus*

Cây chút chít có tên khoa học *Rumex crispus*, thuộc họ rau răm (*Polygonaceae*), chi *Rumex*, bộ Caryophyllales, còn được gọi là cây lưỡi bò, dương đề nhãn. Chi *Rumex* có khoảng 200 loài, thuộc loại thân thảo, sống lâu năm, trong đó *Rumex crispus* đã được sử dụng rộng rãi trong đời sống từ rất lâu.

Tên gọi dân gian của *Rumex crispus* xuất phát từ đặc điểm hình thái của cây. Do rễ cây giống chân dê do đó có tên “dương đề”, lá cây giống lưỡi bò nên cây còn có tên gọi "ngư thiệt". Trẻ con thường cọ hai lá vào nhau, làm phát ra tiếng kêu “chút chít” do đó còn có tên "chút chít". [1,2].

*Rumex* là loại cây sinh trưởng tốt tại vùng đất chua, chủ yếu tại khu vực bắc bán cầu nhưng đã được du nhập gần như khắp mọi nơi. Cây sinh trưởng tốt vào mùa thu đông, ở những nơi ẩm thấp[1,2].

Chút chít là loại cỏ, rễ cái dài có màu hơi nâu ở bên ngoài và màu vàng ở trong, thân cứng, mọc thẳng, ít phân nhánh. Cây cao khoảng 20 – 70 cm, trên thân có rãnh dọc, lá rộng, mỏng nước, màu xanh lục, dài 7 - 12cm, rộng 5cm - 8cm; lá dày, mọc so le, mép lá quăn, lượn sóng, cạnh sắc, có răng cưa, lông tơ mọc nhiều trên gân lá. Lá mọc thành tán rộng dưới thân. Hoa nhỏ màu hơi xanh hoặc hơi đỏ, mọc nhiều vào mùa hè. Hoa mọc thành cụm sát nhau. Đài hoa có kích thước 3 - 4mm, có lông tơ, tràng hoa hơi trắng dài 4 - 5mm. Hoa chút chít mọc trên các lá và mọc thành cụm giống như một vòng xoắn, khó quan sát. Chúng chủ yếu là hoa lưỡng tính. Quả bế ba cạnh, dưới có đài dài 8 - 12mm[2].

Rễ cây có thể đào quanh năm, nhưng tốt nhất vào mùa thu đông, từ tháng tám tới tháng 10. Sau khi thu hoạch, rễ được rửa sạch, cắt bỏ rễ con và phơi khô, cắt thành từng đoạn 10 - 20cm, đường kính 1-1,5cm, mặt ngoài màu nâu có vết nhăn dọc, mặt cắt ngang màu vàng nâu, vùng sinh tầng trông rất rõ, mùi nhẹ, đặc biệt, vị lúc đầu hơi ngọt sau đắng[1,2].



**Hình 1.1.** Hình ảnh cây *Rumex crispus*

## 1.2. Thành phần hoá học trong cây *Rumex crispus*

Thành phần hóa học chính của cây chút chít là anthraquinones/antracen, các dẫn xuất của naphthalen, tannin, một số acid hữu cơ, rumicin, các chất dầu và clorophyl [4]. Trong rễ và lá chút chít có antraglucozit. Tỷ lệ antraglucozit toàn phần trung bình là 3% - 3,4% trong đó có chừng 0,47% ở dạng tự do và 2,54% ở dạng kết hợp [3, 4, 10].

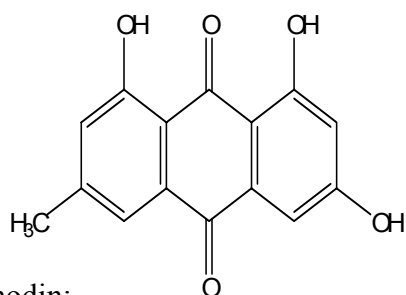
**Bảng 1.1.** Thành phần các hợp chất chính đã biết trong các phần của chi *Rumex*

Loài	Quả	lá	Rễ	Tổng lượng chất
	Đơn vị: mg/g chất khô			
<i>R. acetosa</i>	0,83	1,59	3,76	6,18
<i>R. acetosella</i>	12,93	1,10	3,66	17,69
<i>R. confertus</i>	0,52	0,67	163,42	164,61
<i>R. crispus</i>	0,39	2,40	25,22	28,01
<i>R. hydrolapathum</i>	0,39	0,89	1,02	2,30
<i>R. obtusifolius</i>	0,26	19,91	14,71	34,88

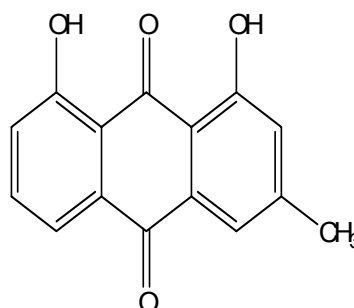
Trong số các chất được tìm thấy trong *Rumex crispus*, bốn hoạt chất có khả năng kháng nấm quan trọng là: chrysophanol, parietin, nepodin, emodin. Thành phần

của các hoạt chất này trong cây thay đổi theo điều kiện tự nhiên và điều kiện gieo trồng (bảng 1) [4, 5,7].

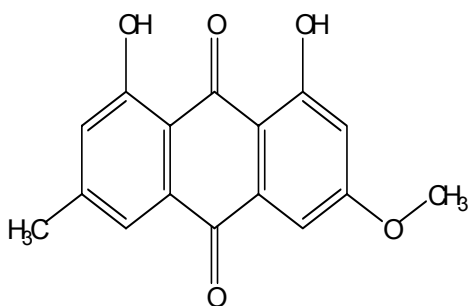
Trong cây chút chít, phần rễ là phần quan trọng nhất, các chất có hoạt tính sinh học có hàm lượng cao trong rễ (bảng 1). Chính vì vậy, các nghiên cứu về hoạt tính sinh học và chiết tách chủ yếu tập trung vào đối tượng là rễ cây chút chít [17, 18, 19].



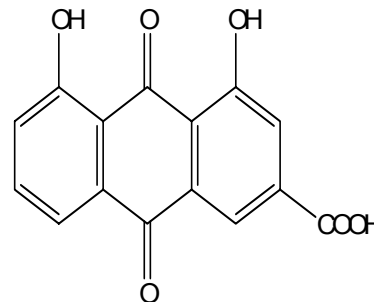
**Emodin:**  
1,3,8-Trihydroxy-6-methyl-9,10-anthracenedione  
Kết tinh hình kim, màu vàng tới nâu vàng  
Mp. 266 - 268<sup>0</sup>C



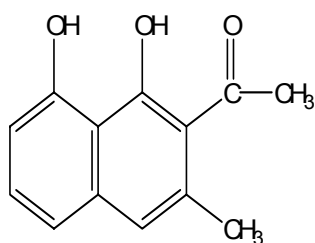
**Chrysophanol:**  
1,8-Dihydroxy-3-methyl-9,10-anthracenedione  
Kết tinh dạng mảnh, màu vàng  
Mp. 200 – 201<sup>0</sup>C



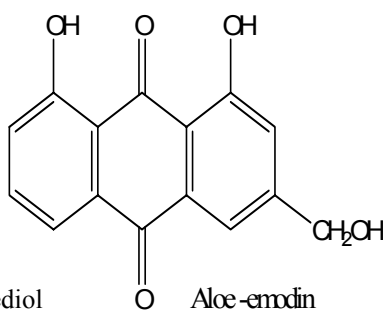
**Parietin (physcion):**  
1,8-Dihydroxy-3-methoxy-6-methylanthraquinone  
Kết tinh hình kim, màu vàng cam  
Mp. 209 – 210<sup>0</sup>C



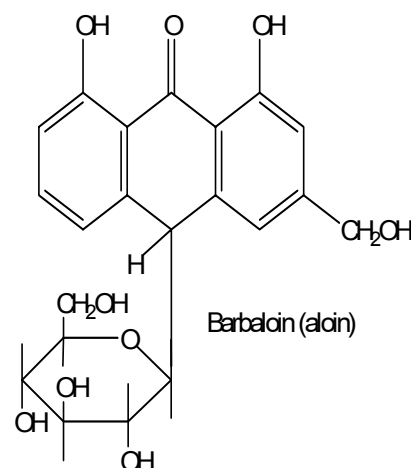
**Rhein:**  
Kết tinh hình kim  
Mp. 321<sup>0</sup>C



**Nepodin:**  
2-Acetyl-3-methyl-1,8-naphthalenediol  
Kết tinh hình kim  
Mp. 164 – 165<sup>0</sup>C



Aloe-emodin



Barbaloin (aloin)



### 1.3. Hoạt tính sinh học của một số hợp chất chính trong *Rumex*

Một vài nghiên cứu chỉ ra, cao dịch chiết từ *Rumex crispus* có hoạt tính chống vi trùng, chống lại khuẩn tụ cầu, khuẩn hình que, kháng lại hoạt động của các vi khuẩn gram (+) và gram (-)[4].

Năm 2004, Jin- Cheol Kim cùng các cộng sự tại viện công nghệ hoá học Hàn Quốc KRICT của Hàn Quốc đã công bố nghiên cứu thử hoạt tính kháng nấm của một số hoạt chất được cô lập từ rễ của *Rumex crispus*. Kết quả cho thấy *Rumex crispus* cho hiệu quả diệt nấm tốt, đặc hiệu với loại bệnh nấm mốc trên đậu Hà Lan, lúa mạch và dưa chuột. Ngoài ra cũng tác dụng tới các loại nấm mốc gây bệnh như *M.grisea*, *C.sasaki*, *B.cinerea*, *P.recondite*, *B.graminis f.sp* ở lúa và khoai tây [11, 12, 13].

Các nhà nghiên cứu Hàn Quốc đã chỉ ra rằng trong rễ của *Rumex crispus* chứa ba hoạt chất kháng nấm quan trọng là: chrysophanol, parietin, nepodin. Các chất này có khả năng kiểm soát hoạt động sống trong cây chống lại sự phát triển của sáu loại nấm, giảm sự phát sinh của nấm mốc. Các phép thử trên dịch chiết *n*-hexan, ethyl axetat, butanol, nước cho thấy chúng đều có tác dụng trên một số nấm gây bệnh ở các mức độ khác nhau do sự phân bố các hoạt chất chính trong dung môi khác nhau. Kết quả thử hoạt tính cho thấy lớp chiết *n*-hexan mang hoạt tính cao nhất, tiếp theo là ethyl axetat (bảng 1.2) [3,4].

**Bảng 1.2.** Khả năng kháng nấm của dịch chiết rễ *Rumex crispus* được chiết bằng dung môi khác nhau

Lớp dung môi	Nồng độ dịch chiết (µg/ml)	Khả năng kiểm soát bệnh					
		RCB <sup>c</sup>	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
n-Hexan	2000	65±12ab	0a	60±5,6b	25±13a	99±0,9a	100a
Etyl axetat	2000	75±9,8a	0a	70±4,5a	0b	83±5,2b	73±8,6b
Butanol	2000	65±8,9ab	0a	10±4,5c	0b	7±11c	62±61c
Nước	2000	10±13c	0a	0d	0b	0d	5±4,6d

- Cây đã bị truyền mầm bệnh một ngày sau khi đem phun dịch chiết lên lá;
- Mỗi giá trị đại diện đã được đánh giá sự sai khác với độ tin cậy 95%;

c. RCB<sup>c</sup> bệnh đạo ôn (*Magnaporthe grisea*); RSB bệnh khô vằn (*Corticium sasaki*); TGM bệnh mốc xám trên cà chua (*Botrytis cinerea*); TLB bệnh mốc sương trên cây cà chua (*phytophthora infestans*); WLR bệnh rỉ sắt trên lá lúa mì (*Puccinia recondite*); BPM nấm mốc sương trên lúa mạch (*Blumeria graminis f.sp.hordei*).

Bên cạnh việc thử hoạt tính dịch chiết, người ta đã phân lập được một số chất và tiến hành thử hoạt tính sinh học của chúng bao gồm chrysophanol, nepodin, parietin. Kết quả cho thấy những chất này có tính diệt nấm với liều EC<sub>50</sub> như sau: 4,7µg/ml chrysophanol, 0,48µg/ml parietin, 20µg/ml nepodin. Chrysophanol (100µg/ml), nepodin (400µg/ml) có hiệu quả trị nấm gây bởi *podosphaera xanthii* cao hơn chất kháng nấm fungicides fenarimol (30µg/ml) và polyoxin (100µg/ml) trong cùng điều kiện thí nghiệm trên cây dưa chuột nuôi trồng trong nhà kính. Parietin (30 và 10µg/ml) giảm sự phát triển nấm mốc sương trên dưa chuột hiệu quả như fenarimol (30µg/ml) và hiệu quả hơn polyoxinB (100µg/ml). Các kết quả được thể hiện trong bảng 1.3, 1.4 [5].

**Bảng 1.3.** Hoạt tính của chrysophanol, nepodin, parietin trên 5 loại nấm bệnh

Tên chất	Nồng độ (µg/ml)	Khả năng kiểm soát bệnh				
		RCB <sup>c</sup>	TLB	TGM	WLR	BPM
Chrysophanol	50	65±8,9b	21±24a	25±8,9a	0	98±2,4ab
	100	75±11a	21±13a	16±5,7ab	20±6,1b	98ab
	200	80±6,1a	14±19ab	25±13a	7±13c	100a
Nepodin	50	20±10e	0c	0c	0d	50± 61c
	100	10±13f	0c	0c	0d	100a
	200	50±7,5c	0c	0c	87±6,9a	100a
Parietin	50	20±6,1e	0c	0c	0d	100a
	100	40±8,9d	0c	0c	0d	100a
	200	50±11c	0c	0c	0d	100a

Chú thích: a,b,c như bảng 1.2.

**Bảng 1.4.** Hoạt tính kháng nấm *Blumeria graminis f. sp. Hordei*

Tên chất	Nồng độ (µg/ml)	Khả năng kiểm soát bệnh				
		Trước khi truyền mầm bệnh (ngày)			Sau khi truyền mầm bệnh (ngày)	
		7	4	1	1	2
Chrysophanol	50	18±11b	72±7,5b	97±2,1b	78±5,4b	44±12b
Nepodin	100	4±9,8c	30±21c	94±27c	64±8,9c	40±11bc

Parietin	5	53±5,3a	100a	100a	47±5,3d	33c
Fenarimol	5	60±8,0a	100a	100a	100a	100a

- a. Sau khi tiêm mầm bệnh 7 ngày thì khoảng 100% diện tích cây trồng bị ảnh hưởng;  
b. Mỗi giá trị đại diện đã được đánh giá sự sai khác với độ tin cậy 95%.

Các kết quả thử hoạt tính trên dịch chiết tổng methanol của rễ cây chút chút cũng cho kết quả kháng 6 loại nấm gây bệnh thông dụng ở cây trồng tuy ở các mức độ thấp hơn do nồng độ các chất có hoạt tính trong dịch chiết methanol thấp, ngoại trừ trường hợp bệnh WLR (gỉ sét trên lá lúa mì) cho hiệu quả kiểm soát bệnh gần 100% và bệnh BPM (nấm mốc sương trên lúa mạch) cho hiệu quả kiểm soát bệnh 90%. Từ các kết quả này có thể thấy, đối với dịch chiết tổng việc sử dụng chế phẩm sẽ không rộng rãi và phải sử dụng ở nồng độ cao dịch chiết lớn hơn so với cao dịch chiết đã được làm giàu (bảng 1.5, 1.6, 1.7) [4, 5].

**Bảng 1.5.** Hoạt tính của *Rumex crispus* trên sáu loại bệnh hại cây[6]

Tên bệnh	RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
Khả năng kiểm soát bệnh (%)	13	0	25	6	90	100

RCB: bạc lá lúa (*Magnaporthe grisea*).

RSB: đốm vằn, lép hạt cây lúa (*Corticium sasaki*).

TGM: mốc xám trên cây cà chua (*Botrytis cinerea*).

TLB: bệnh mốc sương trên cây cà chua (*Phytophthora infestans*).

WLR: gỉ sắt trên lá lúa mì (*Puccinia recondita*).

BPM: nấm mốc sương trên lúa mạch (*Erysiphe graminis f.sp hordei*).

**Bảng 1.6.** Tính kháng nấm *Erysiphe graminis hordei* trên lúa mạch của dịch chiết rễ *Rumex crispus*

Lượng đem cô lấy dịch (g)	300	100	33	11	3,7	1,2
Khả năng kiểm soát bệnh (%)	100a	100a	98a	87b	33d	0e

a - Giống cây đã bị tiêm nhiễm nấm *E. graminis hordei* một ngày sau khi được phun dịch chiết trên lá;

b - Sau khi tiêm mầm bệnh 7 ngày thì đã có khoảng 100% diện tích cây trồng bị ảnh hưởng;

c - Từ 300g vật liệu tươi cho 1,6g dịch chiết *Rumex*.

**Bảng 1.7.** Hoạt tính kháng nấm *Sphaerotheca fuliginea* trên dưa chuột của dịch chiết rễ *Rumex crispus* (trồng và theo dõi trong nhà kính).

Lượng đem cô lấy dịch (g)	300	100	33
Khả năng kiểm soát bệnh (%)	67a	53b	20d

- Dịch chiết hay hoá chất được phun lên lá dưa chuột hai lần trong 7 ngày ngay sau khi bắt đầu xuất hiện những triệu chứng đầu tiên của nấm mốc sương (dưa chuột được trồng và theo dõi trong điều kiện nhà kính).
- Đánh giá bệnh sau bảy ngày điều trị.
- Từ 300g nguyên liệu tươi cho 1,6g dịch chiết *Rumex*.

#### 1.4. Một số ứng dụng chính

Trong các bộ phận của chi *Rumex*, rễ là phần có giá trị sử dụng cao nhất. Trong y học dân tộc, nó được dùng như một loại thuốc bổ giúp thanh lọc máu, chữa bệnh thấp khớp, táo bón, sưng viêm đường hô hấp cấp và mãn tính, chứng bệnh scorbut (bệnh của máu do thiếu vitamin C). *Rumex crispus* còn được dùng như thuốc nhuận tràng do có tác dụng tẩy nhẹ, êm dịu trên ruột và dùng trong điều trị bệnh trĩ.

Ngoài ra, cây *rumex crispus* còn được sử dụng để chữa các bệnh ngoài da như: vẩy nến, eczêma, chứng mày đay, chứng bệnh vàng da, mẩn ngứa.

Ngày nay, cùng với sự phát triển của sinh học phân tử và các ngành khoa học khác, các nhà nghiên cứu đã chứng tỏ hai hoạt chất parientin và emodine trong cây *rumex crispus* còn có tác dụng hỗ trợ trong điều trị kháng khuẩn, ngăn ngừa sự phát triển của các tế bào u bướu.



Sản phẩm bột từ cao dịch chiết  
*Rumex crispus*  
( 787,50 USD/25kg)

Hiện nay, trên thị trường có một số nhà cung cấp như Shamanshop, Kalyx Natural Maketplate.. đang cung cấp cao dịch chiết rễ cây chút chút dạng bột dưới dạng bao gói 1, 5, 10, 20, 25 kg trong túi nilon 2 lớp hoặc thùng carton với giá từ 31 – 70 USD/kg tùy vào khối lượng đặt hàng. Đồng thời, một số công ty đã tiến hành tinh chế cao thô này để pha chế thành sản phẩm thuốc trị bệnh cho con người

Sản phẩm thuốc sử dụng để trị bệnh cho người:

Hình dạng: dạng nước

Độ cồn: 12%;

Giá: 57,78 USD



Trong công tác phòng trừ bệnh hại cây trồng, đã có khá nhiều nghiên cứu và ứng dụng khả năng kháng nấm của các hoạt chất có trong *Rumex crispus*. Các kết quả thử nghiệm cho thấy *Rumex* cho hiệu quả diệt nấm tốt, đặc hiệu với loại nấm mốc trên đậu Hà Lan và dưa chuột. Điều này đã và đang mở ra một hướng phát triển sản phẩm mới từ nguồn thảo mộc sẵn có, mang lại hiệu quả kinh tế cao, đặc biệt không gây ô nhiễm môi trường, an toàn cho người sử dụng [14, 15, 17].

#### **1.4.1. Đặc điểm sinh học và sinh thái của nấm *Fusarium sp* gây bệnh héo vàng cây khoai tây và héo rũ cây chuối**

Nấm *Fusarium* hại cây có phổ ký chủ rộng, phân bố rộng ở nhiều vùng sinh thái. Nấm *Fusarium* gây ra các bệnh héo bó mạch mốc hồng, thối rễ củ, quả (Tharane, U, 1989). Ở nước ta, bệnh lúa von, mốc hồng hạt, bệnh héo vàng cà chua, khoai tây, chết héo cây con trong vườn ươm thủ phạm đều có sự tham gia của nấm này.

Bệnh héo rũ cây chuối còn gọi là bệnh héo rũ PANAMA do nấm *Fusarium* gây ra. Đây là bệnh khá nguy hiểm, nhất là vào mùa mưa do điều kiện thời tiết rất thuận lợi cho cây phát triển.

Ban đầu bệnh xuất hiện ở những lá già ở phía dưới, biểu hiện của bệnh là lá bị vàng dần từ bìa lá trở vào gân chính, sau đó lan rộng lên các lá phía trên. Đồng thời với quá trình này



ến lá chết khô. Lúc đầu 1 số lá trên ngọn vẫn chuyển từ màu xanh sang màu vàng xanh, lá bị dẫn đến chết khô như các lá dưới. Sau khi các lá ngoài đã bị nát, sau này cả cây bị thối khô và bệnh chưa có biểu hiện cụ thể ngay, nhưng về dẫn đến toàn bộ bụi chuối bị chết khô xơ xác. hết ngay hoặc bị ở giai đoạn cây trưởng thành rất nhỏ. Chẻ dọc thân hay cắt ngang thân thấy ion bên trong có sọc màu vàng. Cắt củ chuối ác đốm vàng, nâu, đỏ.

trong tàn dư cây bệnh, bệnh được lan truyền mầm bệnh, qua nước tưới, qua các dụng cụ vào trong cây qua phần chóp rễ, hay qua các lân khác gây ra ở rễ.

trong những bệnh gây thiệt hại lớn cho các Anh, Ấn Độ, Brazil, đôi khi làm giảm tới n, bệnh héo vàng phổ biến ở khắp các vùng ân từ 1-3%, cá biệt có nơi gây thiệt hại tới

ế và củ (Vũ Triệu Mân 1972). Ở gốc cây, vết h gốc, gây hiện tượng thối khô tóp lại. Khi h có màu nâu xám, thường trên vết bệnh có ứng này thể hiện trên cây lúc đầu có 1 vài lá sau đó toàn bộ lá héo rũ vàng và cây chết ng biểu hiện ở 1 vài thân trong 1 khóm, ở

**Hình 1.3.** Cây chuối bị nhiễm nấm c cả một diện tích nhỏ bị héo chết lại.

Vào giai đoạn cây con, khi bị bệnh thường cây héo rất nhanh, trong đó có nhiều cây bị bệnh chưa thể hiện màu vàng trên cây đã bị héo chết nhanh chóng. Ngoài ra, bệnh còn gây hại ở củ và mầm củ. Đối với củ bị nấm xâm nhập, bề ngoài có biểu hiện hoàn toàn bình thường nhưng phần thịt củ có nhiều vòng vân vàng hắc nâu bao quanh và ăn sâu vào trong củ, khi đó gọi là bệnh thối khô củ khoai tây.





**Hình 1.4.** Củ khoai, cây khoai bị nhiễm

Nguyên nhân gây bệnh héo vàng cây khoai tây là do nấm *Fusarium oxysporium* Schlecht có sợi đa bào, màu sắc tản nấm trắng, phát hồng. Sinh sản vô tính tạo ra hai loại bào tử lớn và bào tử nhỏ. Bào tử lớn cong nhẹ, một đầu thon nhọn, một đầu thon gầy khúc dạng bàn chân nhỏ thường có 3 nhãn ngang. Bào tử nhỏ đơn bào có hình trứng, bầu dục dài hoặc hình quả thận được hình thành trong bọc giả trên cành bào tử không phân nhánh trên sợi nấm, trong khi đó bào tử lớn hình thành từ cành bào tử phân nhiều nhánh xếp thành tầng. Nấm còn sinh ra bào tử hậu hình cầu, màng dày màu nâu nhạt. Kích thước bào tử lớn (35 – 50) x (3,5- 5,5) và bào tử hậu từ 9 - 10.

Nấm phát triển thích hợp ở nhiệt độ 25- 30<sup>0</sup>C. Bệnh gây hại nặng trong điều kiện nóng và ẩm. Nhiệt độ 25- 30<sup>0</sup>C và ẩm độ đất quá cao kết hợp với cây sinh trưởng yếu là điều kiện để nấm xâm nhập gây hại. Nấm *Fusarium oxysporium* Schlecht là loại nấm sống trong đất và phân bố rộng rãi trong các loại đất trồng trọt và đất cỏ, loại nấm này bao gồm hơn 100 dạng chuyên hoá và chủng nấm gây bệnh héo cây đối với rất nhiều loại rau, chuối, hồ tiêu và 1 số cây cảnh khác (Nelson và cộng sự 1981).

Nguồn bệnh của nấm ở trong đất là các dạng bào tử hậu, sợi nấm và bào tử lớn phân bố tập trung ở các tầng canh tác.

### **1.5. Phương pháp chiết tách cao dịch chiết rễ cây *rumex* và các chất có hoạt tính**

Trong quá trình nghiên cứu, phân lập để xác định hoạt tính kháng nấm của dịch chiết cũng như xác định cấu trúc hóa học, hoạt tính của các chất chính có mặt trong rễ cây chút chút, người ta đã phát triển nhiều phương pháp khác nhau, cụ thể như sau:

#### **1.5.1. Phương pháp của Jin-Cheol Kim và cộng sự**

Theo phương pháp này, 10 kg mẫu rễ tươi *Rumex crispus* được thu hái ở Kongju, tỉnh Chungnam, Hà Quốc được chiết tách 2 lần bằng dung môi methanol, mỗi lần 40 lít. Dịch chiết được lọc, phần bã được rửa lại bằng 10 lít methanol để thu hồi triệt để dịch chiết còn ngấm trong bã. Phần dịch lọc được cô đặc trong điều kiện chân không ở 40°C bằng thiết bị cô quay. Cặn cô được hòa tan trở lại bằng 3 lít methanol 80% và chiết lại 2 lần bằng *n*-hexan, mỗi lần 3 lít. Sau khi thu được 2 lớp dung môi, đem cô quay. Phần cặn cô tan trong methanol được hòa tan trở lại trong 3 lít nước cất và chiết lỏng lỏng lần lượt với ethyl axetat và butanol. Hai lớp dung môi và lớp nước được cô kiệt trong điều kiện áp suất giảm thu cặn cô. Bốn phân đoạn này được thử hoạt tính *in vivo*, các kết quả thể hiện trong bảng 1.2. Phần cặn *n*-hexan (18,2) gam và cặn ethyl axetat (44 gam) được kiểm tra trên TLC, kết quả cho thấy các vết giống nhau, do vậy, chúng được gom chung lại thành một phân đoạn. Cặn được nạp vào cột silicagel (5 x 60 cm, 500 gam silicagel loại 60 (70-230 mesh, merck)). Quá trình chạy cột được thực hiện trên hệ dung môi rửa giải *n*-hexan:aceton:methanol (70:9:1 và 50:9:1 v/v/v). Các phân đoạn sau chạy cột được kiểm tra trên TLC và gom chung thành 2 phân đoạn F1, F2. F1 (3,77 gam) tiếp tục được chạy sắc ký cột trên silicagel 60, 70-230 mesh bằng hệ dung môi *n*-hexan:ethyl axetat (3/1, v/v) thu được 960 mg chất 1. Phân đoạn F2 (5,53 gam) được chạy sắc ký cột trên silicagel 60, 70-230 mesh bằng hệ dung môi *n*-hexan:ethyl axetat (3/1, v/v) thu được 1,37 gam chất 1, 360 mg chất 2 và 1,52 gam chất 3. Ba chất này được kết tinh lại trong methanol để thu tinh thể sạch.

Bằng các phương pháp phổ: MS, <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C – NMR, kết quả cho thấy chất 1 là chrysophanol (1,8-dihydroxy-3-methyl-9,10-anthracenedion), chất 2 là parietin (physcion, 1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methyl-9,10-anthracenedion), chất 3 là nepodin (1,8-dihydroxy-2-acetyl-3-methylnaphthalen).

Các kết quả thử hoạt tính kháng nấm của 3 chất này (bảng 1.3, 1.4) cho thấy đây là những chất mang hoạt tính chính trong rễ cây chút chít. Chính vì vậy, các sản phẩm thương mại phải đảm bảo hàm lượng 3 hợp chất này [3,4].

#### 1.5.1. Phương pháp Ausat A. Khan

Theo phương pháp này, 1 kg rễ khô *Runzex Crispus* Linn được chiết ngược dòng bằng 1,5 lít ete dầu hỏa nhiệt độ sôi 60 – 80°C. Quá trình chiết tách được thực hiện tối thiểu 3 lần. Dịch chiết được gom chung và để trong 5 ngày ở nhiệt độ 0°C. Sau 5 ngày, tiến hành lọc, thu được 0,9 gam cặn rắn. Hòa tan phần cặn này trong



chloroform, kết tinh thu được tinh thể hình kim, màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 206 – 208<sup>0</sup>C. Phần nước ót được cô kiệt, kết tinh phân đoạn trong benzen thu được axit chrysophanic (chrysophanol), hình kim, màu vàng sáng nhiệt độ nóng chảy 194-196<sup>0</sup>C và emodin, màu vàng cam, sáng, nhiệt độ nóng chảy 254 - 256<sup>0</sup>C. Tổng lượng chrysophanol và emodin chiếm khoảng 0,03% theo nguyên liệu [19].

### 1.6. Lựa chọn công nghệ

Với mục đích chiết cao dịch chiết rễ cây *Rumex crispus* định hướng xuất khẩu cho đối tác là Viện Krick, Hàn Quốc làm thuốc trừ nấm thảo mộc cho các loại cây ngắn ngày và thử hoạt tính sơ bộ trên một số đối tượng cây trồng bị nhiễm nấm ở Việt Nam và Hàn Quốc, đồng thời phối chế thử nghiệm chế phẩm, thông qua tài liệu tham khảo và các khảo sát sơ bộ chúng tôi lựa chọn phương pháp chiết tách cao dịch chiết rễ cây chút chút qua 2 giai đoạn:

- Giai đoạn 1: Chiết cao dịch chiết tổng: với mục đích vừa xuất khẩu, vừa có nguyên liệu để thử nghiệm hoạt tính và nâng cao hiệu suất chiết;
- Giai đoạn 2: Làm giàu cao dịch chiết để tăng hoạt lực của chế phẩm, giảm lượng dung môi pha chế.

Qua kết quả thử hoạt tính của các đơn chất mang hoạt tính chính: chrysophanol, emodin, parietin và dịch tổng chiết từ rễ cây chút chút đã được công bố, chúng tôi nhận thấy dịch chiết có hoạt tính kháng nấm cao hơn nhiều các đơn chất, điều này có thể được giải thích do các chất trong rễ cây ít nhiều đều có khả năng phòng và trừ nấm, khi nằm trong cùng một hỗn hợp chúng có tác dụng tương hỗ tới nhau, không đơn thuần chỉ là một phép cộng đơn giản. Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn sản phẩm của đề tài chủ yếu là cao dịch chiết rễ cây *Rumex crispus*.

## CHƯƠNG II

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

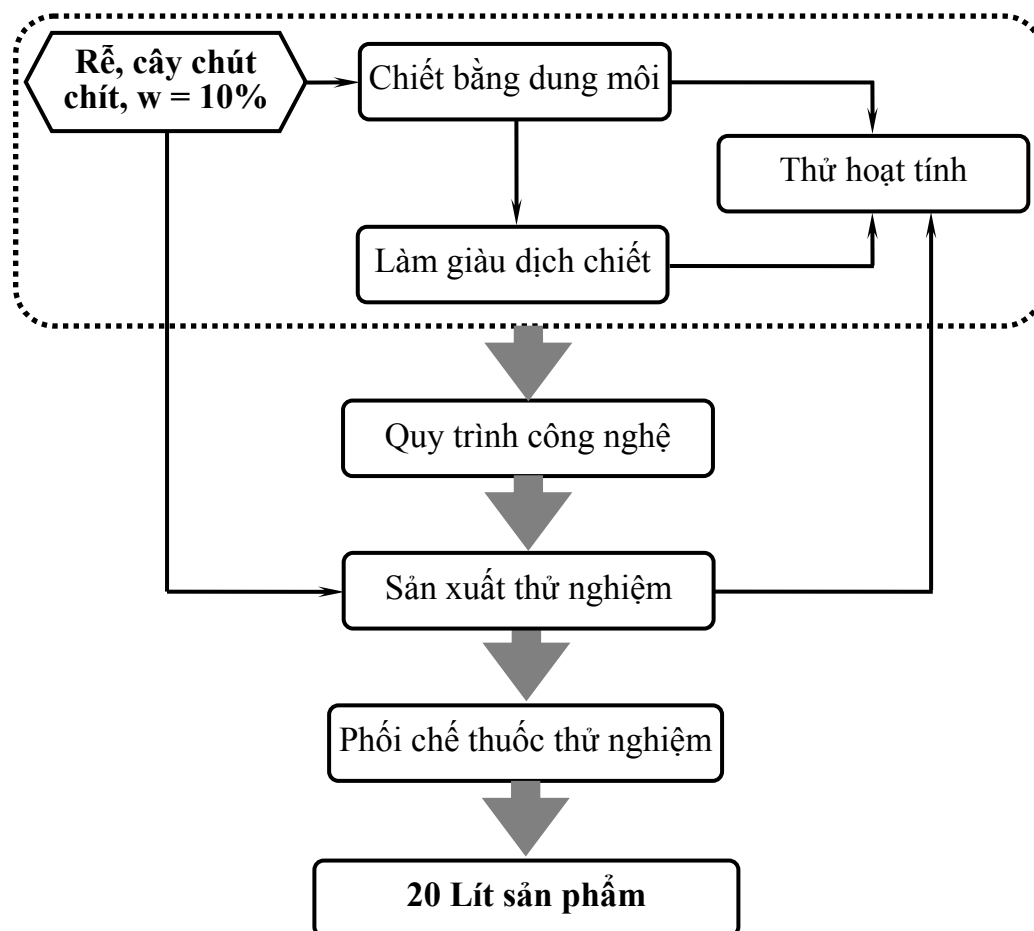
#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

*Rumex crispus* (cây chút chít) được thu hái ở Hoài Đức - Hà Nội vào tháng 3, sơ chế cắt lấy rễ đem sấy khô ở 50<sup>0</sup>C đến độ ẩm W= 10%, bảo quản nơi khô ráo, thoáng mát.

Mẫu thực vật được định tên bởi TS. Trần Thế Bách, Viện Sinh thái Tài nguyên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu thực vật được bảo quản tại Trung tâm Hóa thực vật, Viện Hóa học công nghiệp Việt Nam.

#### 2.2. Thiết kế nghiên cứu

Dựa trên tài liệu tham khảo và các khảo sát bước đầu, chúng tôi đã tiến hành xây dựng thiết kế nghiên cứu để từng bước thực hiện nhiệm vụ của đề tài như sau:



Hình 2.1: Thiết kế nghiên cứu

### 2.3. Hoá chất, thiết bị

- Hoá chất: *n*-hexan, ethyl axetat, butanol, metanol, ethanol, giấy lọc...
- Thiết bị: Thiết bị sấy, máy nghiền, phễu chiết, phễu lọc Buchner, máy Cô quay chân không Buchi.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Chiết cao tổng

Rễ *rumex crispus* được sơ chế sạch, sấy khô về độ ẩm 10%. Sau khi nghiền, mẫu được ngâm chiết với dung môi hữu cơ. Phần dịch chiết được cô loại dung môi thu được cao dịch chiết rễ cây chút chút. Dung môi thu hồi tiếp tục quay trở lại công đoạn chiết ban đầu.

Các dung môi sử dụng để nghiên cứu là: methanol, ethanol, *n*-hexan, ethyl axetat và butanol. Sau khi cô loại dung môi thu được 5 loại cặn chiết 5 phần cặn này được thử hoạt tính để xác định phần có hoạt tính mạnh nhất với các loại bệnh hay gặp và đánh giá về hiệu suất chiết.

#### 2.4.2. Làm giàu cao dịch chiết

Phần cao tổng sau khi chiết bằng methanol (dung môi được lựa chọn để chiết cao tổng) được chiết lại bằng *n*-hexan để làm giàu các thành phần mang hoạt tính trong rễ cây.

#### 2.4.3. Phân tích sản phẩm

Cao dịch chiết sau khi làm giàu được phân tích trên thiết bị HPLC Thermo-Finigan, phòng thí nghiệm Các hợp chất sinh học, Viện Kriet, Hàn Quốc với các điều kiện sau:

- Cột pha đảo, 250 x 6,5 mm I.D, cỡ hạt 5 µm;
- Lượng mẫu bơm 25 µl;
- Tốc độ dòng 1 ml/phút;
- Dung môi:

Dung môi A: axit axetic nồng độ 0,5%;

Dung môi B: methanol;

- Trường trình chạy gradient, tăng nồng độ B từ 45 tới 85% trong 30 phút đầu, giữ B ở 85% trong 10 phút, sau đó giảm B từ 85 về 45% trong 2 phút;

- UV – VIS: 190 – 750 nm;

- Các chất chuẩn.

#### **2.4.4. Thử hoạt tính sinh học**

Quá trình thử hoạt tính sinh học được thực hiện tại phòng thí nghiệm bộ môn Miễn dịch thực vật Viện Bảo vệ thực vật và Viện Nghiên cứu Công nghệ Hoá học Hàn Quốc KRICT.

- Thí nghiệm đánh giá hiệu lực của chế phẩm dịch chiết rễ cây chút chút 5% với bệnh héo vàng cây khoai tây;

- Thí nghiệm đánh giá hiệu lực của chế phẩm dịch chiết cây chút chút 5% với bệnh héo rũ cây chuối;

Thí nghiệm gồm 11 công thức, các công thức được đưa ra với mục đích nghiên cứu để đánh giá hiệu quả chung của dịch chiết rễ cây đã làm giàu ở các nồng độ khác nhau, đồng thời tìm ra nồng độ thích hợp để phối chế sản phẩm, cụ thể như sau:

- 1 - Dịch chiết cây chút chút 5% nồng độ 0,05%;
- 2 - Dịch chiết cây chút chút 5% nồng độ 0,1%;
- 3 - Dịch chiết cây chút chút 5% nồng độ 0,15%;
- 4 - Dịch chiết cây chút chút 5% nồng độ 0,2%;
- 5 - Dịch chiết cây chút chút 5% nồng độ 0,25%;
- 6 - Dịch chiết cây chút chút 5% nồng độ 0,3%;
- 7 - Dịch chiết cây chút chút 5% nồng độ 0,35%;
- 8 - Dịch chiết cây chút chút 5% nồng độ 0,4%;
- 9 - Dịch chiết cây chút chút 5% nồng độ 0,45%;
- 10 - Đối chứng thuốc hoá học Bavistin 50FL nồng độ 0,1%;
- 11 - Đối chứng không sử dụng chế phẩm.

Phương pháp: Nấm *Fusarium* được phân lập và nuôi cấy thuần trên môi trường PCA, PDA, Chapeks...

Môi trường PCA ( Potato Carrot Agar )

Thành phần:

+ Khoai tây	20g;
+ Cà rốt	20g;
+ Agar	20g;
+ Nước cất	100ml;

Môi trường PDA ( Potato Dextrose Agar )

Thành phần:

+ Khoai tây	200g;
+ Đường Dextro ( có thể thay bằng Glucose )	20g;
+ Agar	20g;
+ Nước cất	1000ml;

Cách làm: khoai tây rửa sạch thái mỏng, đun sôi trong 500- 700ml nước cất trong thời gian 20- 25 phút. Dùng vải màn sạch lọc bỏ cặn bã, sau đó cho đủ nước cất 1000 ml. Cho đường và khuấy nhẹ sau đó cho tiếp agar vào (khi cho agar vào, nhiệt độ môi trường thấp, tránh cho agar vón cục và cháy). Môi trường được cho vào bình tam giác đem hấp vô trùng ở 121<sup>0</sup>C trong 30 phút. Giảm nhiệt độ môi trường về 40- 50<sup>0</sup>C cho lần lượt các nồng độ chế phẩm vào rồi đổ vào hộp petri với độ dày của môi trường 5mm. Mỗi công thức 5 hộp nhắc lại 3 lần, tổng số 1 công thức 15 hộp. Để hộp petri nguội cấy nấm *Fusarium* có đường kính tản nấm 5mm vào chính giữa hộp. Công thức đối chứng thuốc hoá học không cho chế phẩm mà thay bằng thuốc Bavistin 50FL nồng độ 0,1% và công thức đối chứng thường không dùng chế phẩm. Theo dõi đường kính phát triển của tản nấm sau 1, 2, 3...10 ngày có ảnh và số liệu sau mỗi ngày điều tra

Các loại nấm gây bệnh được thử:

- Nấm *Fusarium* gây bệnh héo vàng cây khoai tây;
- Nấm *Fusarium* gây bệnh héo rũ cây chuối;

Hiệu quả ức chế của chế phẩm dịch chiết rễ cây chút chút 5% với nấm *Fusarium* gây bệnh héo rũ cây chuối được đánh giá sau 5 ngày, 7 và 10 ngày.

Hiệu quả kháng bệnh của chế phẩm được tính theo công thức sau:

$$\eta = \frac{d_1 - d_2}{d_1} (\%)$$

Trong đó:

$\eta$ : Hiệu quả kháng bệnh;

$d_1$ : Đường kính tán nấm mẫu đối chứng không dùng chế phẩm (cm);

$d_2$ : Đường kính tán nấm mẫu dùng chế phẩm (cm).

Ngoài ra chúng tôi cũng gửi mẫu để thử hoạt tính trên một số bệnh thường gặp ở cây trồng Hàn Quốc tại Viện KRICT.

## CHƯƠNG III

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết

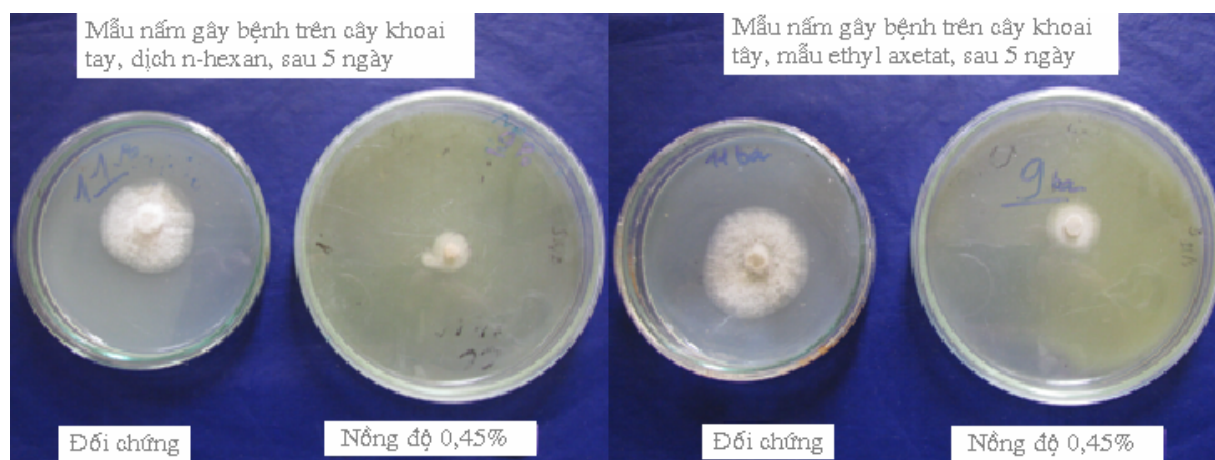
##### 3.1.1. Ảnh hưởng của dung môi chiết

Để xác định dung môi chiết phù hợp đối với sản phẩm là dịch chiết rễ cây chút chít, chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên một số dung môi công nghiệp thông dụng để đánh giá sơ bộ hiệu suất chiết tách so với nguyên liệu và hoạt tính kháng nấm *Fusarium oxysporium schlech* gây bệnh héo vàng cây khoai tây (bệnh 1) và nấm *Fusarium* gây bệnh héo rũ cây chuối (bệnh 2). Quá trình chiết được thực hiện tại nhiệt độ sôi của các dung môi. Các kết quả thí nghiệm được thể hiện cụ thể trong bảng 1.1

**Bảng 3.1.** Ảnh hưởng của loại dung môi chiết

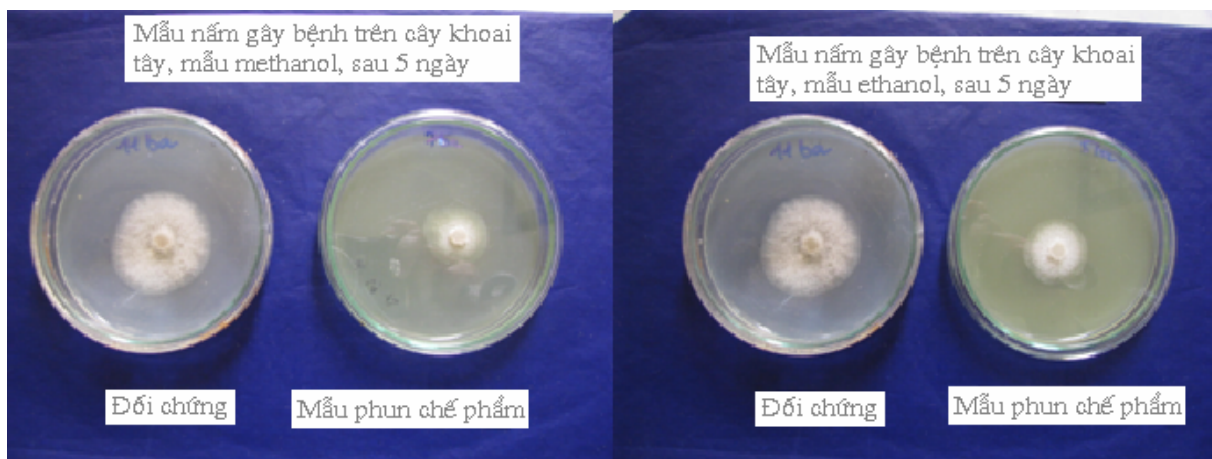
Loại dung môi	Methanol	Ethanol	Butanol	<i>n</i> -hexan	Ethyl axetat
Hiệu quả chiết (%)	11,1	10,8	14,5	7,0	9,1
Hiệu quả kháng bệnh 1	45	41	30	65	60
Hiệu quả kháng bệnh 2	36,1	35	27,5	54	50

*Hiệu quả chiết: Tính theo % nguyên liệu khô;*



Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở cùng một nồng độ 0,45%, sau khi phun chế phẩm, khả năng kiểm soát bệnh của cao dịch chiết *n*-hexan là lớn nhất, sau đó đến ethyl axetat. Tuy nhiên, khi chúng tôi sử dụng toàn bộ cao dịch chiết thu được từ các dung môi khác nhau để phun lên các mẫu nấm có đường kính tản nấm giống nhau thì hiệu quả là tương đương nhau, đạt 61 - 65%. Điều này chứng tỏ phần chất có hoạt tính

chủ yếu trong rễ cây chứt chứt tan tốt trong *n*-hexan. Tuy nhiên, để tiết kiệm dung môi, giảm thiểu khối lượng dịch chiết mà vẫn đảm bảo hiệu quả chiết, chúng tôi định hướng chiết cao tổng ban đầu bằng methanol sau đó làm giàu dịch chiết bằng *n*-hexan.



### 3.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

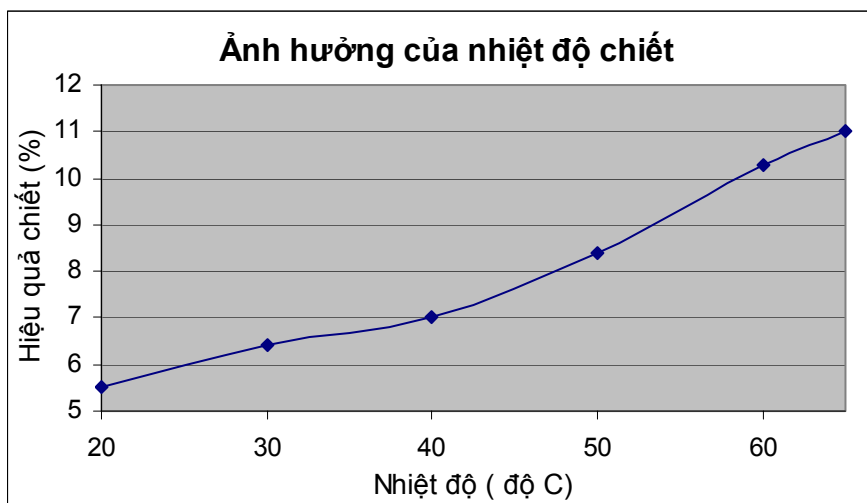
Trong quá trình chiết cao tổng, nhiệt độ là yếu tố quan trọng, có ảnh hưởng quyết định tới hoạt tính chế phẩm và khối lượng chất thu hồi được cũng như thời gian chiết. Để xác định ảnh hưởng của nhiệt độ chiết chúng tôi thực hiện quá trình chiết cao tổng và thử hoạt tính của dịch chiết tổng có so sánh với kết quả thử hoạt tính trong phân đoạn chiết lại bằng *n*-hexan, nồng độ 0,45%. Hiệu quả diệt nấm *Fusarium oxysporium Schlech* gây bệnh héo vàng cây khoai tây được đánh giá sau khi phun chế phẩm 10 ngày. Để đánh giá chính xác ảnh hưởng của nhiệt độ, toàn bộ lượng mẫu thu được được thử hoạt tính. Các kết quả nghiên cứu được thể hiện cụ thể trong bảng 2.2.

**Bảng 3.2.** Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tới hiệu quả chiết cao tổng và hoạt tính

Nhiệt độ chiết (°C)	20	30	40	50	60	<b>65</b>
Hiệu quả chiết (%)	5,5	6,4	7	8,4	10,3	<b>11</b>
Hoạt tính đối với <i>Fusarium oxysporium Schlech</i> gây bệnh héo vàng cây khoai tây của dịch chiết tổng	45	51	55	58	60,3	<b>61</b>
Hoạt tính đối với <i>Fusarium oxysporium Schlech</i> gây bệnh héo vàng cây khoai tây phân đoạn chiết lại bằng <i>n</i> -hexan	59	59	61	60,3	60	<b>59,6</b>

*Hiệu quả chiết: Tính theo % nguyên liệu khô;*





Kết quả thử hoạt tính trên nấm *Fusarium oxysporium Schlech* gây bệnh héo vàng cây khoai tây cho thấy, hoạt tính của sản phẩm chiết không bị ảnh hưởng nhiều bởi nhiệt độ chiết. Hơn nữa, khi chiết ở nhiệt độ sôi của methanol, thời gian chiết tách ngắn, hiệu suất thu nhận cao tổng lớn, dễ khống chế nhiệt độ. Do vậy, nhiệt độ chiết thích hợp cho giai đoạn chiết cao tổng là 65°C.

### 3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian chiết

Trong quá trình chiết tách, thời gian chiết đóng một vai trò quan trọng, quyết định tới năng suất hoạt động của hệ thống. Khi thời gian chiết quá ngắn, hiệu suất chiết giảm nhưng nếu quá dài sẽ gây tổn hao dung môi, nhân công và năng lượng, làm giảm năng suất hoạt động của thiết bị, tăng chi phí vận hành. Chính vì vậy, việc tìm ra thời gian chiết thích hợp đảm bảo dung hòa hiệu suất và chi phí là một mục tiêu mà đề tài cần đạt được. Các kết quả nghiên cứu được thể hiện cụ thể trong bảng 3.3.

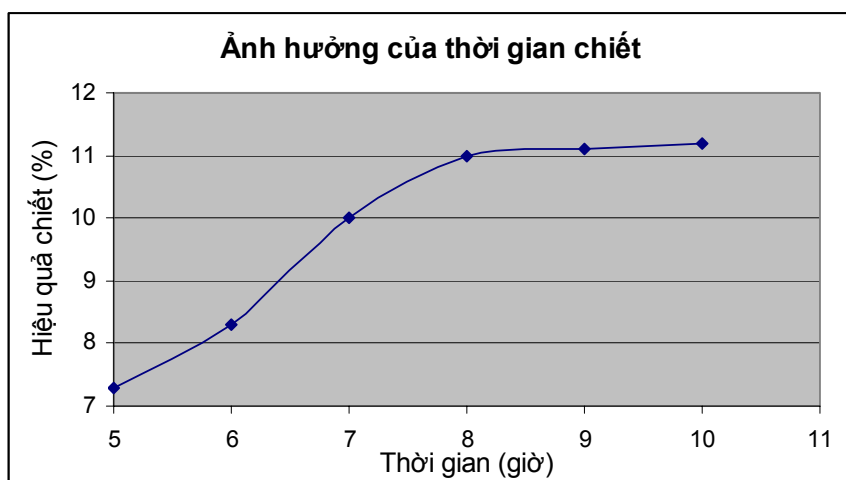
**Bảng 3.3.** Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tới hiệu quả chiết cao tổng và hoạt tính

Thời gian chiết (giờ)	5	6	7	<b>8</b>	9	10
Hiệu quả chiết (%)	7,3	8,3	10	<b>11</b>	11,1	11,2

*Hiệu quả chiết: Tính theo % nguyên liệu khô;*

Các kết quả thực nghiệm trong bảng 3 cho thấy, khi thời gian chiết tăng, hiệu suất thu nhận cao dịch chiết tổng tăng. Tuy nhiên, khi thời gian vượt quá 8 giờ, hiệu suất thu nhận sản phẩm gần như không phụ thuộc vào thời gian chiết. Như vậy, thời

gian chiết thích hợp nhất là 8 giờ đối với phương pháp chiết tuần hoàn. Một số hình ảnh của tán nấm được thể hiện trong ảnh dưới.



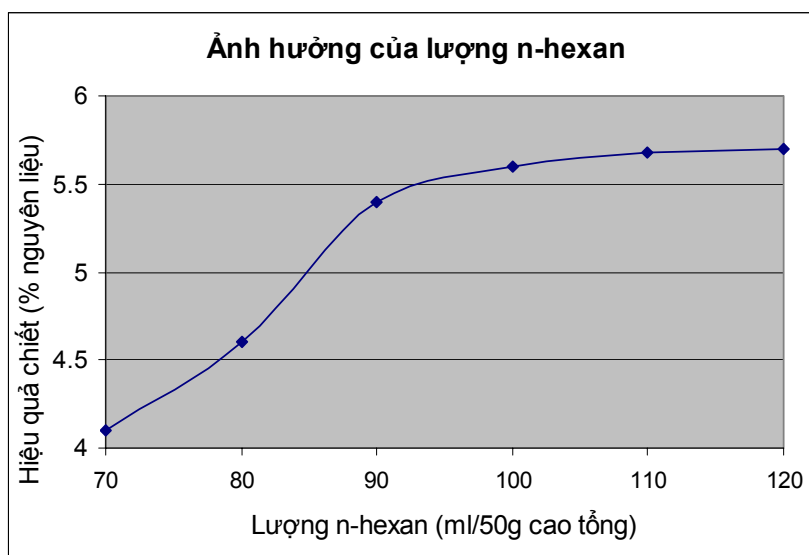
### 3.2. Làm giàu cao dịch chiết

Các kết quả thử hoạt tính cho thấy, phần chất mang hoạt tính kháng nấm của rễ cây chút chít (*rumex crispus*) chủ yếu là các chất có khả năng tan trong *n*-hexan. Hơn nữa, nếu sử dụng cao dịch chiết từ dịch chiết tổng methanol sẽ gặp rất nhiều khó khăn do khi đưa phần cao này về độ ẩm thấp sẽ không thể hòa tan trở lại trong các dung môi thông dụng, còn nếu để ở độ khô thấp, lượng methanol tổn hao nhiều. Đồng thời khi sử dụng chế phẩm để phun cho cây trồng sẽ phải sử dụng một lượng lớn do nồng độ các chất mang hoạt tính thấp. Chính vì vậy, việc làm giàu chế phẩm là rất quan trọng. Dung môi lựa chọn phải phù hợp với tiêu chí: làm giàu thành phần mang hoạt tính. Bên cạnh đó, chúng tôi thử nghiệm pha chế chế phẩm dạng dịch không tan trong nước, có khả năng tạo với nước khi pha loãng thành một hệ thể nhũ tương, hệ này đảm bảo các thành phần có hoạt tính kháng nấm không bị tan vào nước khi phun, giúp cho phần thất thoát giảm xuống. Chính vì vậy, dung môi được lựa chọn là *n*-hexan. Quá trình chiết được thực hiện 2 lần, tại nhiệt độ sôi của *n*-hexan. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.4.

**Bảng 3.4.** Ảnh hưởng của lượng *n*-hexan

Lượng <i>n</i> -hexan (ml/50g cao tổng)	70	80	90	<b>100</b>	110	120
Hiệu quả chiết (%)	4,1	4,6	5,4	<b>5,6</b>	5,68	5,7

*Hiệu quả chiết: Tính theo % nguyên liệu khô;*

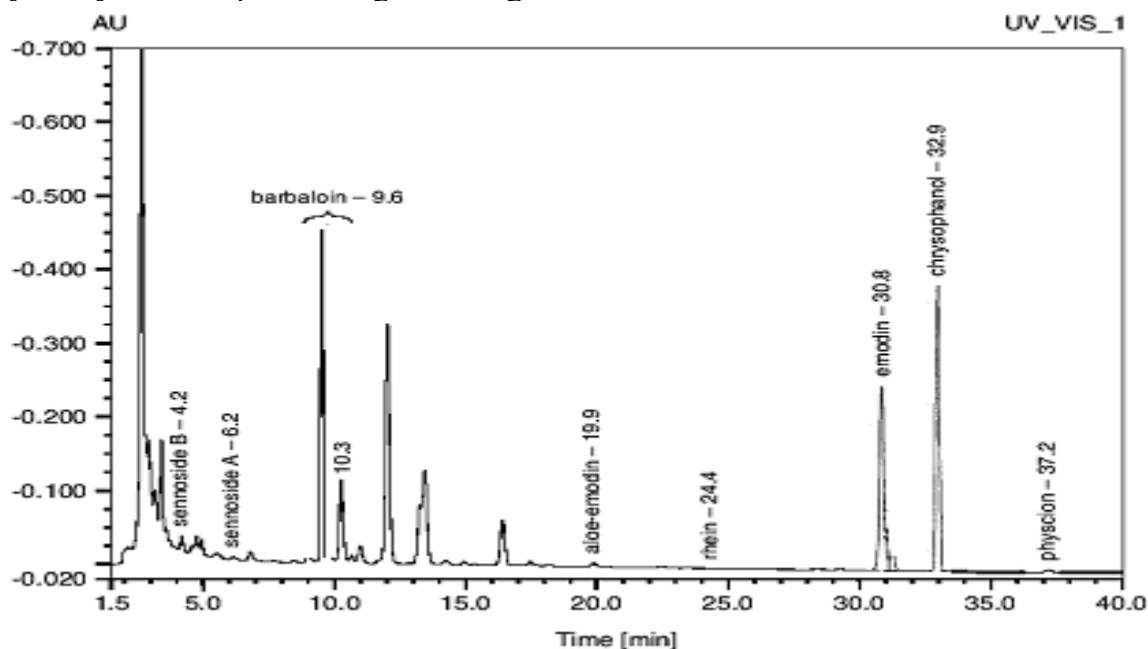


Từ bảng số liệu thu được ta nhận thấy, tỉ lệ thích hợp cho quá trình làm giàu cao dịch chiết bằng dung môi *n*-hexan là 2/1 (ml *n*-hexan/gam cao dịch chiết tổng). Nếu lượng dung môi sử dụng nhỏ hơn sẽ không thể chiết hết phần chất mang hoạt tính trong cặn chiết methanol. Nếu quá nhiều, hiệu quả chiết tách không tăng lên trong khi đó lại gây tổn hao dung môi.

### 3.3. Phân tích sản phẩm

Sản phẩm dịch chiết đã được làm giàu bằng *n*-hexan được phân tích bằng HPLC, với các điều kiện như mô tả trong mục 2.4.3 chương II.

Trên sắc ký đồ HPLC có đối chiếu với các chất chuẩn cho thấy, trong dịch chiết từ rễ cây chít chít *Rumex crispus* chứa một số chất chính: chrysophanol, physcion, emodin và các dạng liên kết glucosid của chúng, rhein, rhein – dianthrone – D - glycosid (mezo) hay sennosid B, rhein – dianthron – D - glycosid (R+) hay sennosid A, aloe – emodin – anthrone – C - glycosid hay còn gọi là barbaloin (hoặc aloin A và B) nepodin, nepodin – 1 – O –  $\beta$  – D - glycosid, 1,5 – dihydroxyanthraquinon, oxymethylantraquinon và glucofrangulin.



**Hình 3.1.** Sắc ký đồ HPLC của dịch chiết

Hàm lượng một số chất có hoạt tính chính trong dịch chiết rễ cây chít chít như sau:

Hàm lượng chrysophanol: 8%;

Hàm lượng parietin: 0,7 %;

Hàm lượng emodin: 5%.

Khi đối chiếu với các kết quả thử hoạt tính của các chất này trong tài liệu tham khảo [3], nhận thấy rằng đây là những chất có hoạt tính cao trong phần rễ cây chút chút.

### 3.4. Kết quả thử hoạt tính

Cao dịch chiết của rễ cây chút chút (*rumex crispus*) sau khi đã được làm giàu được pha tới nồng độ 5% để tiến hành thử hoạt tính.

#### 3.4.1. Hiệu quả ức chế với nấm *Fusarium* gây bệnh héo vàng cây khoai tây

Hiệu quả ức chế của chế phẩm dịch chiết rễ cây chút chút 5% với nấm *Fusarium* gây bệnh héo vàng cây khoai tây được đánh giá sau 5 ngày, 7 và 10 ngày thí nghiệm, có đánh giá và so sánh với thuốc hóa học và mẫu không sử dụng bất kỳ một chế phẩm nào. Các kết quả thí nghiệm được thể hiện cụ thể trong bảng 3.5.

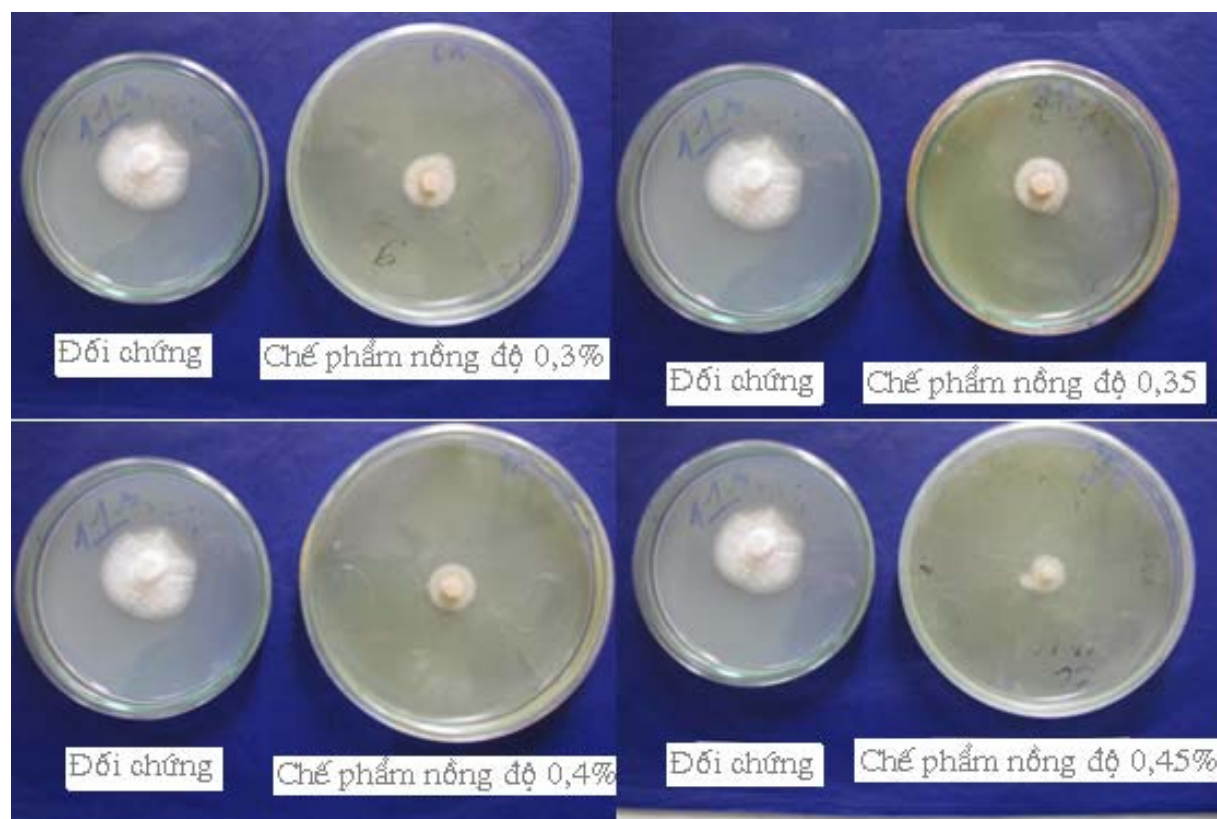
**Bảng 3.5.** Hiệu quả ức chế của chế phẩm dịch cây chút chút 5% với nấm *Fusarium oxysporium* Schlech gây bệnh héo vàng cây khoai tây

CT	Số ngày sau khi phun					Số ngày sau khi phun						
	2	3	4	5	HQ%	6	7	HQ%	8	9	10	HQ%
1	1,5	2,5	3,2	3,5	<b>23,9</b>	4,8	5,2	<b>23,5</b>	6,1	7,3	8,0	
2	1,4	2,3	2,9	3,4	<b>24,0</b>	4,6	4,6	<b>32,3</b>	5,7	6,8	8,0	
3	1,3	2,1	2,5	3,0	<b>34,7</b>	4,2	4,5	<b>33,8</b>	5,0	6,3	7,0	
4	1,0	1,5	2,2	2,8	<b>39,0</b>	3,4	4,0	<b>41,2</b>	4,6	5,6	6,3	<b>30,0</b>
5	0,8	1,5	1,9	2,2	<b>52,1</b>	2,9	3,4	<b>50,0</b>	4,2	5,1	6,0	<b>33,3</b>
6	0,8	1,4	2,0	2,2	<b>52,1</b>	2,5	3,2	<b>52,9</b>	4,0	4,8	5,4	<b>40,0</b>
7	0,7	1,3	1,8	2,1	<b>52,6</b>	2,3	3,0	<b>55,8</b>	3,2	4,2	5,0	<b>44,0</b>
8	0,5	0,9	1,4	1,8	<b>60,8</b>	2,1	2,8	<b>58,8</b>	2,8	3,8	4,5	<b>50,0</b>
9	0,5	0,5	0,9	1,6	<b>65,2</b>	1,9	2,5	<b>63,2</b>	2,6	3,0	3,5	<b>60,0</b>
10	0,5	1,0										
11	2,2	2,8	3,3	4,6	-	5,9	6,8	-	7,5	8,2	9,0	-

Ghi chú: HQ: hiệu quả ức chế

Kết quả bảng 3.5 cho thấy: dịch chiết cây chút chút 5% sau 5 ngày làm thí nghiệm đều có hiệu quả ức chế nấm *Fusarium* nhưng ở các mức độ khác nhau. Nồng

độ chế phẩm 0,05% đến các nồng độ 0,1% - 0,15% và 0,2% có hiệu quả thấp chỉ đạt từ 24% - 39%. Nồng độ chế phẩm 0,25%- 0,3%...0,45% có hiệu quả ức chế > 50% cao nhất ở nồng độ 0,45% có hiệu quả là 65%, sau 5 ngày đường kính của tản nấm không sử dụng chế phẩm là 4,6cm thì ở các công thức có dùng chế phẩm đường kính tản nấm chỉ từ 1,6 – 2,8cm. Một số hình ảnh tản nấm được thể hiện ở hình 3.2 và phụ lục 1, 2



**Hình 3.2.** Hình ảnh tản nấm sau 5 ngày

Sau 7 ngày thí nghiệm cho kết quả tương tự như 5 ngày. Sau 10 ngày thí nghiệm có sự sai khác rõ rệt, các công thức sử dụng chế phẩm nồng độ 0,4% và 0,45% cho hiệu quả ức chế cao từ 50 -60%, đường kính tản nấm của đối chứng sau 10 ngày là 9cm thì ở công thức có dùng chế phẩm chỉ 3,5 -4,5cm.

Công thức 10 là công thức có sử dụng thuốc hoá học làm đối chứng chúng tôi nhận thấy sau 4 ngày sợi nấm không phát triển được đạt hiệu quả 100%.

### **3.4.2. Hiệu quả ức chế nấm *Fusarium* gây bệnh héo rũ cây chuối**

Hiệu quả ức chế của chế phẩm dịch chiết rễ cây chút chút 5% với nấm *Fusarium* gây bệnh héo rũ cây chuối được đánh giá sau 5 ngày, 7 và 10 ngày thí nghiệm, có đánh

giá và so sánh với thuốc hóa học và mẫu không sử dụng bất kỳ một chế phẩm nào. Các kết quả thí nghiệm được thể hiện cụ thể trong bảng 3.6.

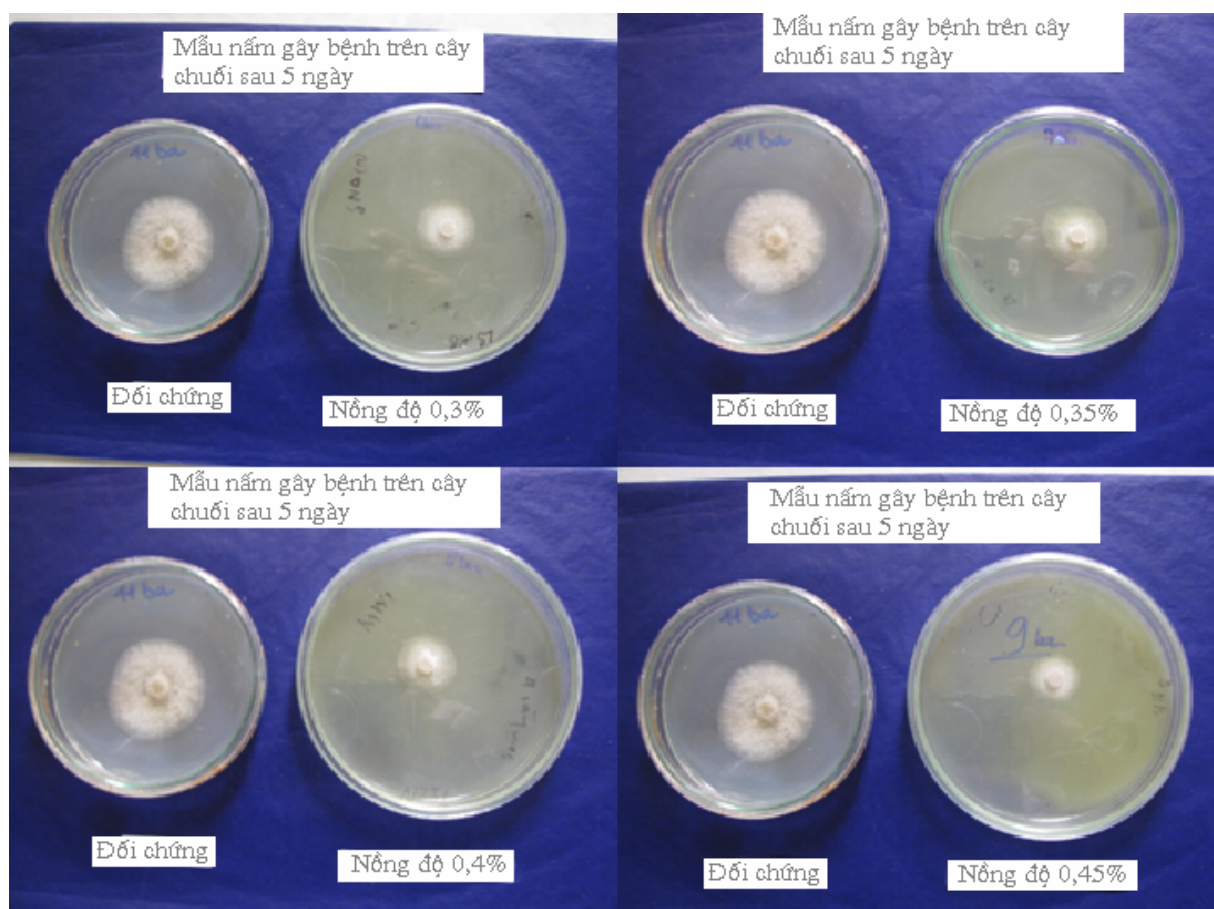
**Bảng 3.6.** Hiệu quả ức chế của chế phẩm dịch cây chút chít 5% với nấm *Fusarium sp* gây bệnh héo rũ cây chuối

CT	Số ngày sau khi phun					Số ngày sau khi phun						
	4/12	5/12	6/12	7/12	HQ%	8/12	9/12	HQ%	10/12	11/12	12/12	HQ
1	1,3	2,7	3,5	4,0	<b>16,6</b>	5,5	6,5	<b>7,14</b>	7,5	8,0	8,5	
2	1,5	2,5	3,0	3,9	<b>17,2</b>	5,2	6,3	<b>10,0</b>	6,5	7,0	8,0	
3	1,3	2,2	3,0	3,8	<b>20,8</b>	5,0	5,7	<b>18,6</b>	6,0	6,5	7,8	
4	0,8	2,0	2,5	3,2	<b>33,3</b>	4,5	5,5	<b>21,4</b>	5,8	6,3	7,5	<b>16,6</b>
5	0,8	1,7	2,3	2,9	<b>39,5</b>	4,0	5,0	<b>29,0</b>	5,0	5,5	6,5	<b>27,7</b>
6	0,7	1,6	2,0	2,7	<b>43,7</b>	3,5	4,3	<b>38,6</b>	4,5	5,0	6,2	<b>31,1</b>
7	0,7	1,5	2,0	2,6	<b>45,8</b>	3,2	4,0	<b>42,0</b>	4,3	4,8	6,0	<b>33,3</b>
8	0,5	1,3	1,6	2,5	<b>47,9</b>	3,5	3,8	<b>45,2</b>	4,0	4,5	5,5	<b>38,8</b>
9	0,5	1,2	1,5	2,2	<b>54,2</b>	2,8	3,5	<b>50,0</b>	3,8	4,2	5,5	<b>37,5</b>
10	0,5											
11	2,5	3,2	3,5	4,8	-	6,0	7,0	-	7,5	8,5	9,0	-

Kết quả thử hoạt tính trong bảng 3.6 cho thấy: chế phẩm dịch chiết cây chút chít ở tất cả các nồng độ sau 5, 7 ngày đều có hiệu quả ức chế nấm nhưng không cao chỉ đạt từ 10% đến 54%, đường kính tán nấm của mẫu đối chứng là 7cm sau 7 ngày thì ở công thức có sử dụng nồng độ 0,45% đường kính là 3,2 cm. Sau 10 ngày dịch chiết ở nồng độ 0,45% là có hiệu quả > 35%, sự chênh lệch về đường kính tán nấm giữa công thức đối chứng và công thức sử dụng chế phẩm không chênh lệch nhiều, công thức đối chứng đường kính tán nấm là 9cm sau 10 ngày thì đường kính ở nồng độ chế phẩm 0,45% là 5,5cm.

Cùng 1 loại chế phẩm và cùng các nồng độ chế phẩm như nhau nhưng có hiệu quả ức chế khác nhau còn phụ thuộc vào từng loại cây, cấu trúc tế bào của các cây đó và khả năng tiếp nhận chế phẩm. Một số hình ảnh phát triển của tán nấm trên canh trường có sử dụng chế phẩm và mẫu đối chứng được thể hiện trong ảnh dưới và phụ lục 3, 4.





### 3.4.3. Hiệu quả ức chế một số loại bệnh khác

Dịch chiết phần rễ và phần thân cây chút chít được thử hoạt tính sinh học trên một số loại bệnh hay gặp ở cây trồng tại Hàn Quốc tại Viện KRICT. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng 7.

**Bảng 3.7.** Hiệu quả ức chế nấm gây bệnh của dịch chiết từ cây chút chít

Phần dịch chiết	Nồng độ dịch chiết ( $\mu\text{l/ml}$ )	Hiệu quả diệt nấm (%)						
		RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	PAN
Thân lá <i>Rumex crispus</i>	1000	0	0	0	8	13	87	40
	500	10	26	8	0	0	92	40
Rễ <i>Rumex crispus</i>	1000	0	5	0	15	3	100	66
	500	0	0	8	0	0	93	10

RCB (rice blast): Bệnh đạo ôn;

RSB (rice sheath blight): bệnh khô vằn;

TGM (tomato gray mold): bệnh mốc xám trên cà chua;

TLB (tomato late blight); bệnh héo cây, chết xanh ở cây cà chua;

WLR (wheat leaf rus): bệnh gỉ sắt trên lá lúa mì;



BPM (barley powdery mildew): bệnh nấm mốc sương trên lúa mạch;  
PAN (red papper anthracnose): bệnh thối thư củ cải đỏ (loét củ cải đỏ).

Kết quả thử nghiệm ban đầu từ dịch chiết rễ và thân là cây chít chít *Rumex crispus* cho thấy, hiệu quả diệt nấm gây bệnh nấm mốc sương trên lá lúa mạch bởi nấm *Erysiphe graminis f sp hordei* đạt hiệu quả cao nhất 87 – 100 % tùy vào nồng độ và phần chiết của cây. Đối với phần dịch chiết từ rễ, có hiệu quả cao cả với thối thư củ cải đỏ.

### 3.5. Sản xuất thử nghiệm, thử nghiệm sản phẩm

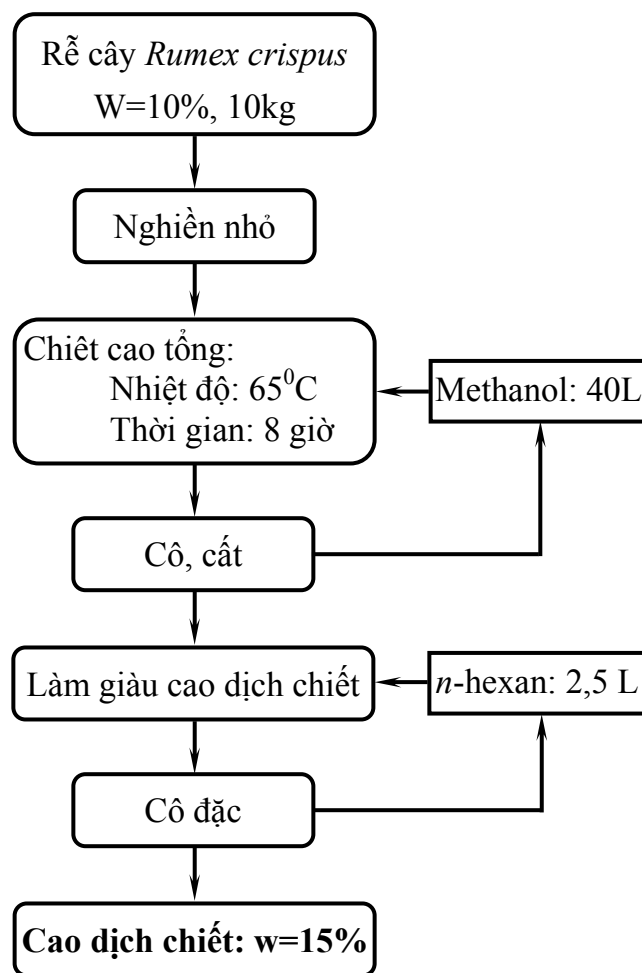
#### 3.5.1. Sản xuất thử nghiệm

Kết quả sản xuất thử nghiệm sản phẩm cao dịch chiết rễ cây chít chít được tiến hành với qui mô 10 kg nguyên liệu/mẻ, kết quả thu được như sau:

Lượng nguyên liệu:	10 kg rễ khô;	Kết quả
Lượng methanol:	40 L;	Lượng cao tổng: 1,2 kg
Nhiệt độ chiết:	65°C;	Cao dịch chiết đã làm giàu: 0,58 kg
Thời gian chiết:	8 giờ;	Hàm lượng chrysophanol: 8%;
Lượng <i>n</i> -hexan:	2,5 L.	parietin: 0,7 %; emodin: 5%.

Kết quả thử nghiệm cho thấy không có sự sai khác nhiều so với khi nghiền cứu với lượng nhỏ. Hiệu suất thu nhận cao dịch chiết tổng và cao dịch chiết đã làm giàu cao hơn một chút so với các thông số thu được khi làm với lượng nhỏ. Sản phẩm cao dịch chiết tiếp tục được bào chế thành chế phẩm và thử nghiệm lại hoạt tính. Quá trình chiết tách và làm giàu cao dịch chiết được thực hiện như sau:

10 kg rễ cây *Rumex crispus*, khô được nghiền nhỏ, nạp vào bình chiết dung tích 75 lít. Methanol được bổ xung với lượng 40L. Xả 10 L dịch xuống bình cô qua van tháo đáy của bình chiết. Quá trình chiết được thực hiện theo công nghệ chiết tuần hoàn, dịch chiết được xả liên tục xuống bình cô, lượng dịch xả được điều chỉnh cân bằng với lượng dung môi bốc hơi ngưng tụ ở sinh hàn quay trở lại bình chiết. Sau 8 giờ, cho phần dung môi ngưng tụ đi vào bình chứa dung môi, quá trình trình cô đặc vẫn tiếp tục cho tới khi xả kiệt dịch trong bình chiết. Phần cao thu được tiếp tục chuyển qua công đoạn làm giàu cao dịch chiết. Trong công đoạn này, bổ xung 2,5 lít dung môi *n*-hexan, chia làm 2 lần để chiết tách phần chất mang hoạt tính. Lốp *n*-hexan được cô đặc về độ khô 85% thu được cao dịch chiết đã làm giàu. Quá trình thực hiện được mô tả chi tiết trong sơ đồ công nghệ dưới đây.



Sơ đồ công nghệ chiết cao dịch chiết rễ cây *Rumex crispus*

### 3.5.2. Bào chế chế phẩm

Dịch chiết có độ khô 50% trong *n*-hexan được pha chế thành chế phẩm bảo vệ thực vật tại Phòng Bào chế - Phân tích thuốc Viện Bảo Vệ Thực vật, Bộ nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Cổ Nhuế, Từ Liêm, Hà Nội. Công thức pha chế cụ thể như sau:

Dạng thuốc: Dạng dịch lỏng;

Dịch chiết chát chát 50%: 20 %;

Hỗn hợp dung môi pha chế ethyl axetat/ *n*-hexan: 70 %;

Phụ gia (chất hoạt động bề mặt...): 10%.

### 3.6. Đề xuất tiêu chuẩn cơ sở của dịch chiết rễ *Rumex crispus*

Dựa trên cơ sở sản xuất cao dịch chiết rễ cây *Rumex crispus* định hướng làm thuốc bảo vệ thực vật, qua tham khảo một số tiêu chuẩn về dịch chiết từ cây cỏ và các yêu cầu của viện KRICT, chúng tôi đề xuất xây dựng nên tiêu chuẩn cơ sở ban đầu theo các chỉ tiêu như sau:

Các chỉ tiêu	Đơn vị	Chất lượng	Phương pháp
Màu sắc		Từ nâu tới xanh	Cảm quan
Độ ẩm	%	< 10	
Cặn vô cơ	%	5	
Tổng vi khuẩn hiếu khí	CFU/g	< 1000	ISO 4833
Tổng số nấm men, nấm mốc	CFU/g	< 100	ISO 7654
coliforms	MPN/g	< 0,3 (không phát hiện)	ISO 8431
E. coli	MPN/g	< 0,3 (không phát hiện)	AOAC.966.24
S. aureus	MPN/g	< 0,3 (không phát hiện)	ISO 6888
Hàm lượng chrysophanol, emodin, parietin	%	> 13	HPLC*

\* Phương pháp xác định trong mục 2.4.3 chương II

## KẾT LUẬN

Sau thời gian nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất cao dịch chiết của rễ cây chút chút *Rumex crispus* tại Trung tâm Hóa Thực vật, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam, chúng tôi đã thu được các kết quả sau đây:

1. Đã nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết tách: Chiết cao tổng bằng methanol ở 65°C trong 8 giờ sau đó làm giàu bằng *n*-hexan theo tỷ lệ 100ml *n*-hexan/50g cao tổng;
2. Đã xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao dịch chiết từ rễ cây chút chút;
3. Đã thử hoạt tính sinh học đánh giá hiệu quả ức chế của cao dịch chiết đối với nấm *Fusarium* gây bệnh héo rũ cây chuối và héo vàng khoai tây. Kết quả, hiệu quả ức chế trên khoai tây đạt 60-65%, trên chuối đạt 35-40%;
4. Đã gửi sản phẩm cao dịch chiết từ rễ và thân cây chút chút *Rumex crispus* thử hoạt tính sinh học trên một số loại bệnh hay gặp ở cây trồng tại Viện KRICT Hàn Quốc;
5. Đã sản xuất thử nghiệm sản phẩm cao dịch chiết rễ cây chút chút với qui mô 10 kg nguyên liệu/mẻ thu được lượng cao dịch chiết đã làm giàu là 0,58 kg với hàm lượng các chất mang hoạt tính mạnh nhất là chrysophanol 8%, parietin 0,7 % và emodin 5%.
6. Đã tiến hành gia công chế phẩm bảo vệ thực vật dạng dịch tại Phòng Bảo chế - Phân tích thuộc Viện Bảo vệ thực vật.

## MỘT SỐ KIẾN NGHỊ

Trước những kết quả đạt được của đề tài, chúng tôi nghị được Bộ tiếp tục cấp kinh phí để tiếp tục thử nghiệm sản phẩm trên các loại nấm gây bệnh phổ biến ở cây trồng ngắn ngày Việt Nam cụ thể như sau:

- Thử nghiệm sản phẩm trong phòng thí nghiệm: đối tượng là nấm mốc gây bệnh mốc sương trên cây Dưa chuột, Dưa chuột bao tử, bệnh bạc lá lúa;
- Thử nghiệm sản xuất ở quy mô pilot: 50 kg/m<sup>2</sup>;
- Hoàn thiện quy trình điều chế sản phẩm;
- Thử nghiệm sản phẩm do chúng tôi pha chế trực tiếp trên đồng ruộng;

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Trang 153, NXB Y Học, **2003**.
2. Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam, Tập I, trang 742, NXB Trẻ, **1999**.
3. Jin Cheol Kim et al. Effects of chrysophanol, parietin and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. Crop Protection 23, 1215-1221, **2004**.
4. Jin Cheol Kim et al. Screening extracts of *Achyranthes japonica* and *Rumex crispus* for activity against various plants pathogenic fungi and control of powdery mildew. Society of Chemical Industry. Pest Manag Sci 60, 803-808, **2004**.
5. Agarwal, S.K., Singh, S.S., Verma, S., Kumar, S.,. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. J. Ethnopharmacol. 72, 43-46, **2000**.
6. Semple, S.J., Pyke, S.M., Reynolds, G.D., Flower, R.L.P., In vitro antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. Antiviral Res. 49, 169-178, **2001**.
7. S. Ba,skan et al. Talanta 71, 747-750, **2007**.
8. A. Nostro et al., Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiology 30, 379-384, **2000**.
9. Al-Sarraj, S.M., Redha, F.M.J., Mahmoud, M.J. and Hussein,W.A. Modified extraction procedure for the active constituents of some Iraqi medicinal plants. Fitoterapia LVI, 56-58, **1985**.
10. wegiera M. et al. Anthracene derivatives in some species of *Rumex* L. Genus. Acta societatis Botanicorum Poloniae, Vol. 76, No. 2, pp. 103-108, **2007**.
11. Brazdova V., Hrochova V., Starhova H. Anthracene derivatives in some species of the genus *Rumex*. IV. Cesk. Farm. 18 (7), pp. 337 - 340 (Chem. Abstr. 1970, 72, 75623a), **1969**.
12. Fairbairn J.W., El Muhtadi F.J. Chemotaxonomy of anthraquinones in *Rumex*. Phytochem. 11, pp 263 - 268, **1972**.

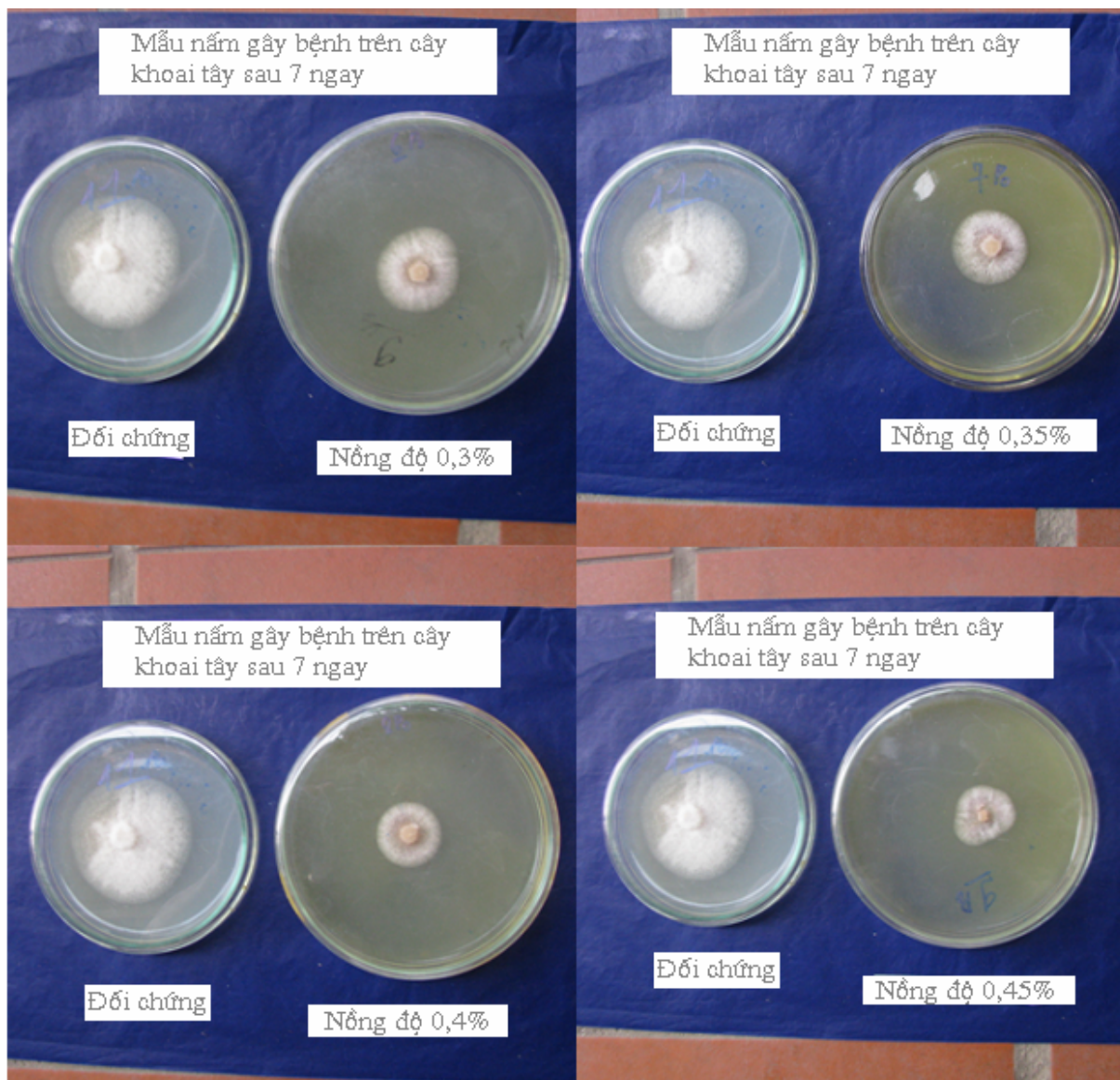
13. Demirezer L.O. Concentrations of anthraquinone glycosides of *Rumex crispus* during different vegetation stages. *Z. Naturforsch., C. Biosci.* 49 (7 -8), pp 404 – 406, **1994**.
14. Gunaydin K., Topcu G., Ion R.M. 1,5 – dihydroxyanthraquinones and an anthrone from roots of *Rumex Crispus*. *Nat. Prod. Lett.* 16, pp. 65 – 70, 2002.
15. Leveau A.M., Durand M.A . Athracene derivatives in *Rumex crispus* var Major. *C. R. Soc. Biol.* 163 (12), pp. 2662 – 2665 (Chem. Abstr. 1970, 73, 101979p), **1969** (Pub. 1970) ..
16. Yildirim A., Mavi A., Kara A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.* 49 (8), pp. 4083 – 4089, **2001**.
17. Sharma MRS. M., Ragaswami S. Chemical components of the roots of *Rumex acetosa*: isolation of 6 – acetoxyaloe emodin, a new 1,8 – dihydroxyanthraquinone derivative. *Indian J. Chem. Sect. B* 15B (10), pp 884 – 885 (Chem. Abstr. 1978, 88. 86026q), **1977**.
18. Sayed M.D., Balbaa S.J., Afifi M.S.A. Anthraquinone content of certain species growing in Egypt. *Egypt. J. Pharm. Sci.* 15 (1), pp. 1 – 10 (Chem. Abstr. 1975, 82, 82931j), 1974.
19. Ausat A. Khan. The isolation of 1,8 – dihydroxy – 3 methyl – 9 – anthrone from the root of *Rumex Crispus* L. *Canadian Journal of Chemistry*. Vol. 41, **1963**.

## PHỤ LỤC



## PHỤ LỤC 1

### HÌNH ẢNH TÁN NÂM SAU 7 NGÀY TRÊN CÂY KHOAI TÂY



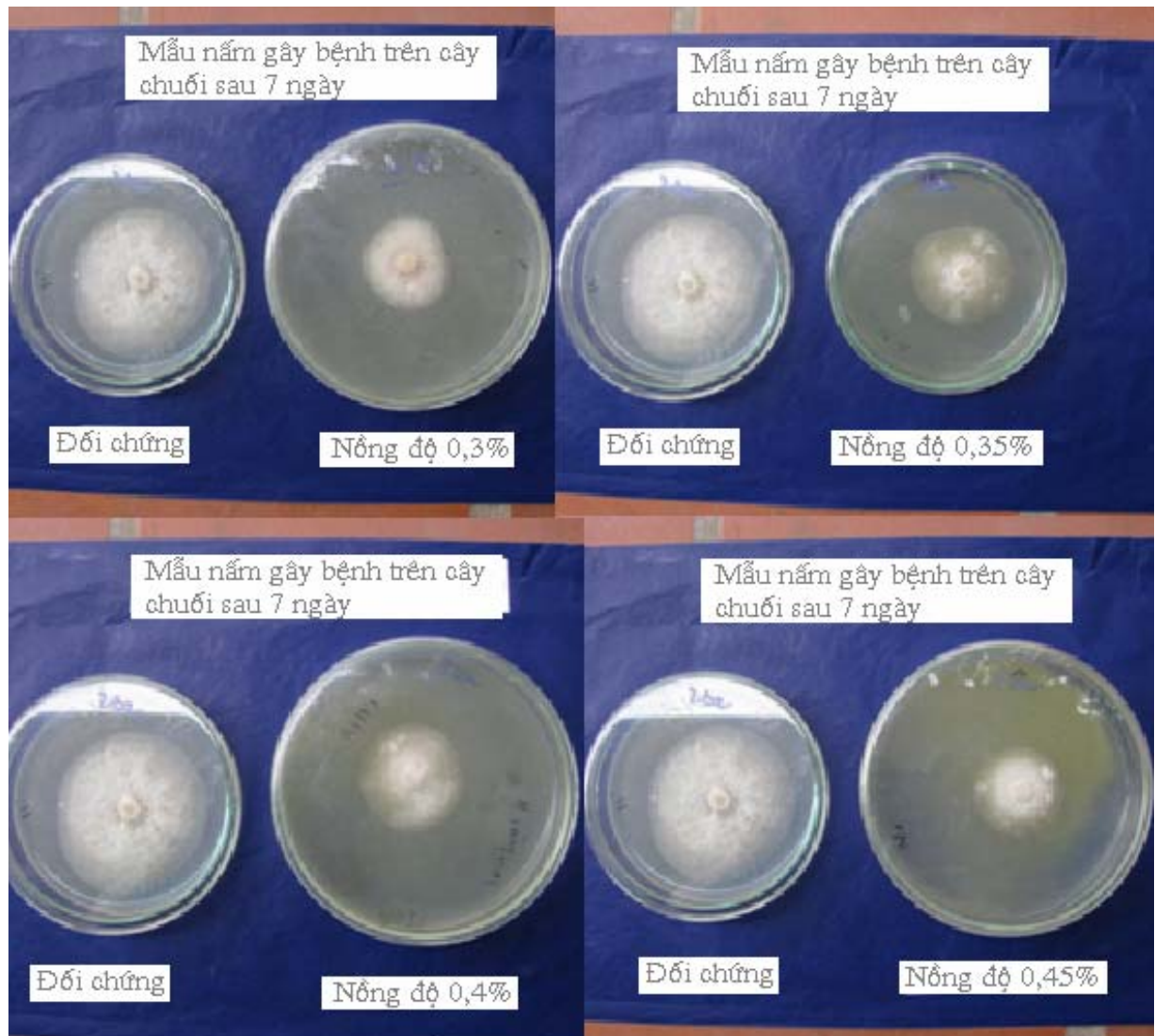
## PHỤ LỤC 2

### HÌNH ẢNH TÁN NẤM SAU 10 NGÀY TRÊN CÂY KHOAI TÂY



### PHỤ LỤC 3

#### HÌNH ẢNH TÁN NÂM SAU 7 NGÀY TRÊN CÂY CHUỐI





## PHỤ LỤC 4

### HÌNH ẢNH TÁN NẤM SAU 10 NGÀY TRÊN CÂY CHUỐI

