

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VÀ KHÁNG
NẤM CỦA CÁC CHẤT CHIẾT THÔ TỪ CÂY LÔ HỘI
(*Aloe vera*) VÀ CÂY HOA PHẤN (*Mirabilis jalapa* L.)
NUÔI CÂY *IN VITRO***

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2003 – 2007

Sinh viên thực hiện: LÊ THỊ BÍCH UYÊN

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 9 / 2007

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VÀ KHÁNG
NẤM CỦA CÁC CHẤT CHIẾT THÔ TỪ CÂY LÔ HỘI
(*Aloe vera*) VÀ CÂY HOA PHẤN (*Mirabilis jalapa* L.)
NUÔI CÂY *IN VITRO***

**Giáo viên hướng dẫn:
TS. TRẦN THỊ DUNG**

**Sinh viên thực hiện:
LÊ THỊ BÍCH UYÊN**

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 9 / 2007

LỜI CẢM ƠN

Mỗi một ngày trôi qua là một ngày con thêm thương ba má, thêm mang ơn ba má, Người đã mang đến cho con cuộc sống hôm nay, giáo dục con nên người. Con xin thành kính khắc ghi công ơn trời biển của ba má dành cho con!

Em xin trân trọng cảm ơn:

- + Ban giám hiệu Trường Đại Học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh đã hỗ trợ và tạo điều kiện thuận lợi cho em trong suốt quá trình học tập.
- + Các thầy cô Bộ môn Công nghệ Sinh học cùng các thầy cô ở các Khoa khác đã dày công dạy dỗ, truyền thụ kiến thức cho em trong suốt 4 năm trên giảng đường Đại Học.
- + TS Trần Thị Dung đã dành nhiều thời gian và công sức để truyền đạt cho em những kiến thức quý báu, lắng nghe và động viên em, tạo mọi điều kiện thuận lợi cho em hoàn thành khóa luận này.
- + KS Nguyễn Thị Thu Hằng, KS Lê Hồng Thủy Tiên cùng các thầy cô trong Bộ môn Công Nghệ Sinh Học đã luôn tạo điều kiện cho em hoàn thành khóa luận này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến: Các bạn lớp Công Nghệ Sinh Học 29 luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt 4 năm qua!

TÓM TẮT

LÊ THỊ BÍCH UYÊN, Đại học Nông Lâm Tp Hồ Chí Minh, với đề tài “**Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của các chất chiết thô từ cây lô hội (*Aloe vera*) và cây hoa phấn (*Mirabilis japala* L.) nuôi cấy *in vitro***”, dưới sự hướng dẫn của TS. Trần Thị Dung. Đề tài được thực hiện tại Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm. Thời gian nghiên cứu từ tháng 3/2007 đến tháng 7/2007.

Đề tài được thực hiện qua 2 giai đoạn:

+ **Giai đoạn 1:** Khảo sát ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng như BA, 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo và cụm chồi cây lô hội và cây hoa phấn *in vitro*.

+ **Giai đoạn 2:** Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cây lô hội, cây hoa phấn ngoài tự nhiên; cây lô hội và cây hoa phấn *in vitro*.

Qua thực nghiệm, chúng tôi thu được một số kết quả sau:

- Môi trường thích hợp nhất cho sự tạo sẹo cây hoa phấn là môi trường MS với BA 4 mg/l và 2,4-D 3 mg/l.

- Môi trường thích hợp nhất cho sự tạo chồi của cây lô hội và cây hoa phấn là môi trường MS với BA 2 mg/l.

- Dịch chiết trong ethanol của cây lô hội ngoài tự nhiên có khả năng kháng các chủng vi khuẩn: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và không kháng được chủng vi khuẩn *Staphylococcus*, nấm *Candida albicans*. Tuy nhiên khả năng kháng rất yếu, vòng kháng sinh rất mờ và nhỏ.

- Dịch chiết trong ethanol của cây lô hội *in vitro* có khả năng kháng các chủng vi khuẩn: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus*. Khả năng kháng cao, vòng kháng sinh tương đối rõ.

- Dịch chiết trong ethanol của:

+ Thân, lá cây hoa phần ngoài tự nhiên: có khả năng kháng các chủng vi khuẩn: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và không kháng được chủng vi khuẩn *Staphylococcus*, nấm *Candida albicans*. Khả năng kháng tương đối cao.

+ Rễ cây hoa phần ngoài tự nhiên: có khả năng kháng khuẩn *Staphylococcus*. Khả năng kháng cao, đường kính vòng kháng sinh tương đối lớn.

- Dịch chiết trong ethanol của mô sẹo cây hoa phần và cây hoa phần *in vitro*: có khả năng kháng các chủng vi khuẩn: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus*. Khả năng kháng cao, vòng kháng sinh tương đối rõ.

SUMMARY

LE THI BICH UYEN, Nong Lam University Ho Chi Minh city, topic
“Investigate the antibacterial and antifungal activity of the crude extracts from aloe (*Aloe vera*) and four o’clock flower (*Mirabilis jalapa* L.) *in vitro*”.

Supervisor: Tran Thi Dung, PhD.

The topic was realized in department of Biotechnology, Nong Lam University from March 2007 to July 2007.

The topic consists of two stages:

+ Stage 1: investigate the effects of BA, 2,4-D plant growth regulators on formation callus and cluster of shoots of aloe and four o’clock flower *in vitro*.

+ Stage 2: investigate the antibacterial and antifungal activity of the crude extracts from aloe and four o’clock flower *in vitro* and in the field.

❖ Results:

- Murashige and Skoog (MS) medium containing 4 mg/l BA and 3 mg/l 2,4-D is suitable for formation callus of four o’clock flower.

- MS medium containing 2 mg/l BA is suitable for formation cluster of shoots of aloe and four o’clock flower.

- The extracts of aloe (in the field) in ethanol can resist *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and can’t resist *Staphylococcus*, *Candida albicans*. However, the resistant ability is very weak. The inhibition diameter is small and isn’t clear.

- The extracts of aloe (*in vitro*) in ethanol can resist *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus*. The resistant ability is strong, the inhibition diameter is rather clear.

- The extracts in ethanol of:

+ The stem and leaf of four o'clock flower (in the field) can resist *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and can't resist *Staphylococcus*, *Candida albicans*. The resistant ability is rather strong.

+ The root of four o'clock flower (in the field) can resist *Staphylococcus* and the resistant ability is strong.

- The extracts of callus of four o'clock flower (*in vitro*) in ethanol can resist *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus*. The resistant ability is strong, the inhibition diameter is rather clear.

MỤC LỤC

CHƯƠNG	TRANG
Trang tựa	
Lời cảm ơn	iii
Tóm tắt	iv
.....	
Summary	vi
Mục lục.....	viii
Danh mục hình	x
Danh mục bảng	xi
Các từ viết tắt	xii
Chương 1. Mở đầu	1
1.1. Đặt vấn đề	1
1.2. Mục đích và yêu cầu	2
Chương 2. Tổng quan tài liệu	3
2.1. Vài nét về cây lô hội và cây hoa phởn	3
2.2. Đặc điểm sinh học của cây lô hội và cây hoa phởn	4
2.2.1. Đặc điểm sinh học của cây lô hội	4
2.2.2. Đặc điểm sinh học của cây hoa phởn	5
2.3. Công dụng của cây lô hội và cây hoa phởn.....	7
2.3.1. Làm cảnh.....	7
2.3.2. Làm chất bảo quản thực phẩm	7
2.3.3. Làm thuốc.....	7
2.4. Các phương pháp nhân giống cây lô hội và cây hoa phởn.....	13
2.4.1. Nhân giống tự nhiên.....	13
2.4.2. Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô	13

2.5. Vài nét về các chất điều hòa sinh trưởng thực vật	14
2.5.1. Auxin.....	14
2.5.2. Cytokinin.....	16
2.6. Vài nét về các vi khuẩn và nấm gây bệnh thường gặp.....	17
2.6.1. Tụ cầu khuẩn (<i>Staphylococcus</i>)	17
2.6.2. Trực khuẩn (<i>Escherichia coli</i>)	22
2.6.3. Trực khuẩn mũ xanh (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	25
2.6.4. Nấm men (<i>Candida albicans</i>).....	28
2.7. Một số nghiên cứu có liên quan.....	29
Chương 3. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu	31
3.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	31
3.2. Vật liệu.....	31
3.2.1. Trang thiết bị và dụng cụ	31
3.2.2. Vật liệu nuôi cấy mô cây lô hội và cây hoa phấn	31
3.2.3. Vật liệu thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm	31
3.2.4. Thành phần môi trường sử dụng trong nghiên cứu	31
3.3. Phương pháp nghiên cứu.....	33
3.3.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng lên sự hình thành mô sẹo cây hoa phấn	33
3.3.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi từ cây lô hội <i>in vitro</i> và cây hoa phấn <i>in vitro</i>	34
3.3.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cây lô hội và cây hoa phấn ngoài tự nhiên	35
3.3.4. Thí nghiệm 4: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của mô sẹo cây hoa phấn	37
3.3.5. Thí nghiệm 5: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của cây lô hội và cây hoa phấn <i>in vitro</i>	37

Chương 4. Kết quả và thảo luận	39
Chương 5. Kết luận và đề nghị	53
Tài liệu tham khảo	55
Phụ lục	

DANH MỤC HÌNH

HÌNH	TRANG
Hình 2.1. Cây lô hội	4
Hình 2.2. Cây hoa phân	6
Hình 4.1. Mô sẹo từ lá hoa phân dưới tác dụng của BA và 2,4 – D sau 25 ngày nuôi cấy.	40
Hình 4.2. Cụm chồi cây lô hội dưới tác dụng của BA sau 25 ngày nuôi cấy.	42
Hình 4.3. Cụm chồi hoa phân dưới tác dụng của BA sau 25 ngày nuôi cấy.	44
Hình 4.4. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô lá lô hội đối với các chủng vi sinh	45
Hình 4.5. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô thân, lá cây hoa phân đối với các chủng vi sinh.	47
Hình 4.6. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô rễ cây hoa phân đối với các chủng vi sinh	47
Hình 4.7. Vòng kháng sinh của chất chiết thô mô sẹo cây hoa phân đối với các chủng vi sinh.	49
Hình 4.8. Vòng kháng sinh của chất chiết thô cây lô hội <i>in vitro</i> đối với các chủng vi sinh.	50
Hình 4.9. Vòng kháng sinh của chất chiết thô cây hoa phân <i>in vitro</i> đối với các chủng vi sinh	51

DANH MỤC BẢNG

BẢNG	TRANG
Bảng 3.1. Thành phần môi trường MS của Murashige và Skoog	32
Bảng 3.2. Nồng độ BA và 2,4-D sử dụng trong thí nghiệm 1	34
Bảng 3.3. Nồng độ BA sử dụng trong thí nghiệm 2	35
Bảng 4.1. Ảnh hưởng của BA và 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo cây hoa phần <i>in vitro</i> sau 25 ngày nuôi cấy	39
Bảng 4.2. Ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi cây lô hội sau 25 ngày nuôi cấy	41
Bảng 4.3. Ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi cây hoa phần sau 25 ngày nuôi cấy	43
Bảng 4.4. Kết quả hoạt tính kháng sinh và đường kính vòng kháng sinh của các chất chiết thô lá cây lô hội ngoài tự nhiên	45
Bảng 4.5. Kết quả hoạt tính kháng sinh và vòng kháng sinh của các chất chiết thô thân, lá, rễ cây hoa phần ngoài tự nhiên.....	46
Bảng 4.6. Kết quả hoạt tính kháng sinh và vòng kháng sinh của các chất chiết thô mô sẹo cây hoa phần <i>in vitro</i>	48
Bảng 4.7. Kết quả hoạt tính kháng sinh và vòng kháng sinh của các chất chiết thô cây lô hội và cây hoa phần <i>in vitro</i>	50

CÁC TỪ VIẾT TẮT

MS: môi trường Murashige và Skoog (1962)

BA: benzyl adenine

NAA: 1 – naphthalene acetic acid

2,4-D: 2,4 – dichlorophenoxyacetic acid

TDZ: thiadiazuron

EDTA: ethylene diamine tetra acetate

CFU: colony format unit (đơn vị tạo thành khuẩn lạc)

ĐC: đối chứng

BD₀: môi trường MS

BD₁: môi trường MS + BA 4 mg/l + 2,4-D 1 mg/l

BD₂: môi trường MS + BA 4 mg/l + 2,4-D 2 mg/l

BD₃: môi trường MS + BA 4 mg/l + 2,4-D 3 mg/l

BD₄: môi trường MS + BA 4 mg/l + 2,4-D 4 mg/l

BA₀: môi trường MS

BA₁: môi trường MS + BA 1 mg/l

BA₂: môi trường MS + BA 2 mg/l

BA₃: môi trường MS + BA 3 mg/l

BA₄: môi trường MS + BA 4 mg/l

Chương 1. MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Hiện nay, trên thế giới đang có xu hướng quay về với các hoạt chất từ thiên nhiên, đặc biệt là các hoạt chất được dùng để làm thuốc và làm mỹ phẩm. Trong số các cây có các hoạt chất đó, chúng tôi khảo sát cây lô hội và cây hoa phấn.

Cây lô hội còn gọi là cây nha đam, có tên khoa học là *Aloe vera* hay *Aloe barbadensis*, thuộc họ Aloaceae. Theo y học cổ truyền, nhựa lô hội có tác dụng nhuận tràng, kháng khuẩn, giúp vết thương mau lành sẹo, nhuận gan, lợi mật, giảm loét dạ dày. Lá dùng ngoài có tác dụng sát khuẩn, chống bỏng, giữ ẩm, làm mịn da và phòng mụn nhọt...

Cây hoa phấn còn gọi là cây bông phấn, có tên khoa học là *Mirabilis jalapa* L. thuộc họ hoa phấn Nyctaginaceae. Dân gian thường dùng nước ép lá để bôi chữa bỏng, sung tấy. Rễ cây có tác dụng trị nhọt vú, viêm đường tiết niệu, viêm tuyến tiền liệt, bạch đới, đái đường, đái ra máu...

Các cây ngoài tự nhiên thường bị nhiễm bẩn nhiều, điều này có thể ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của chúng. Có thể các cây được nuôi cấy trong điều kiện vô trùng (nuôi cấy *in vitro*) sẽ có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm cao hơn. Hơn nữa hệ số nhân giống của các cây *in vitro* thường rất cao, có thể tạo được nguồn nguyên liệu dồi dào.

Do đó, để so sánh khả năng kháng khuẩn và kháng nấm của cây ngoài tự nhiên với cây *in vitro*, tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn, chúng tôi thực hiện nghiên cứu đề tài: “**Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của các chất chiết thô từ cây lô hội (*Aloe vera*) và cây hoa phấn (*Mirabilis jalapa* L.) nuôi cấy *in vitro*.**”

1.2. Mục đích và yêu cầu

1.2.1. Mục đích

- Khảo sát môi trường tối ưu để tạo mô sẹo và tạo cụm chồi cây lô hội, cây hoa phần *in vitro*.

- So sánh khả năng kháng khuẩn và kháng nấm của các chất chiết thô trong ethanol của cây lô hội, cây hoa phần ngoài tự nhiên với cây lô hội, cây hoa phần *in vitro* và mô sẹo *in vitro*.

1.2.2. Yêu cầu

- Xác định nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thích hợp cho sự tạo mô sẹo.

- Xác định nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thích hợp cho sự tạo cụm chồi.

- Xác định hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cây lô hội và cây hoa phần ngoài tự nhiên, mô sẹo *in vitro* và cây lô hội, cây hoa phần *in vitro*.

Chương 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Vài nét về cây lô hội và cây hoa phấn

2.1.1. Vài nét về cây lô hội

Theo truyền thuyết Ai Cập, nữ hoàng Cléopâtre đã sử dụng lô hội để tạo ra một làn da mịn màng, tươi tắn. Còn đại đế Hy Lạp Alexandra đã dùng lô hội để chữa vết thương cho binh lính của mình trong những cuộc viễn chinh. Những dòng chữ tượng hình và những hình vẽ còn lưu lại trên những bức tường ở những đền đài Ai Cập cho thấy cây lô hội đã được biết đến và sử dụng cách đây hơn 3000 năm. Cho đến tận ngày nay con người đã chứng minh và khẳng định được phần nào vai trò của cây lô hội trong cuộc sống con người. Đặc biệt là trong lĩnh vực dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm.

Vào cuối thế kỷ XIII, một du khách người Ý tên là Macro Polo (1254 - 1323) đã thực hiện một chuyến thám hiểm toàn châu Á. Khi đến Trung Hoa, Polo đã giới thiệu cho người dân bản xứ một dược thảo mà sau này chúng ta gọi là lô hội. Từ Trung Hoa cây lô hội được di thực sang Việt Nam. [11]

2.1.2. Vài nét về cây hoa phấn

Cây hoa phấn (*Mirabilis jalapa*), tên tiếng Anh là “Four o’clock flower” hoặc “Marvel of Peru”, có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới Nam Mỹ, từ đó du nhập vào khắp các vùng nhiệt đới và vùng có nhiệt độ ấm. Ở các vùng có nhiệt độ lạnh hơn, nó sẽ “ngủ đông” khi gặp sương giá đầu tiên và sẽ mọc lại vào mùa xuân từ các rễ củ.

Hoa thường nở vào khoảng 4 giờ trở đi. Ở Trung Quốc, cây hoa phấn được gọi là “Shower flower” (hoa mưa rào), hoặc “Rice boiling flower” (hoa cơm sôi) vì nó nở vào thời điểm diễn ra các hoạt động này. Một điều kì lạ của cây này là các hoa có màu sắc khác nhau có thể tìm thấy cùng lúc trên cùng một cây. [10]

Cây hoa phấn ở các nước đã được sử dụng để làm thuốc, còn ở nước ta thì chưa được phổ biến lắm.

2.2. Đặc điểm sinh học của cây lô hội và cây hoa phấn

2.2.1. Đặc điểm sinh học của cây lô hội

2.2.1.1. Vị trí phân loại thực vật [9]

Cây lô hội thuộc:

Giới: Plantae

Ngành: Magnoliophyta

Lớp: Liliopsida

Bộ: Asparagales

Họ: Asphodelaceae, trước đây thuộc họ Liliaceae.

Giống: *Aloe*

Loài: *A. vera*



Hình 2.1. Cây lô hội

Trong khoảng 330 loài thì chỉ có 4 loài được sử dụng để làm thuốc. Hai loài được chú ý nhiều nhất là *Aloe ferox* Mill và *Aloe vera* L. (hoặc *Aloe barbadensis* Mill).

2.2.1.2. Mô tả cây lô hội [2]

Cây thảo nhỏ, sống lâu năm. Thân ngắn hoá gỗ, mang nhiều vết sẹo do lá rụng. Lá không cuống, gốc tày và rộng, mọc áp sát vào nhau thành hình hoa thị, đầu thuôn dài thành hình mũi nhọn, phiến rất dày, mỏng nước, mặt trên phẳng hoặc hơi lồi, có những đốm trắng, mặt dưới khum, mặt cắt tam giác, mép có gai thưa và cứng. Cắt lá thấy có nhựa vàng chảy ra.

Cụm hoa mọc ở kẽ lá thành chùm trên một cán dài, mang rất nhiều hoa bao bọc bởi những lá bắc màu đỏ, mọc rủ xuống, bao hoa nạc màu vàng cam, có 6 phiến dính liền ở gốc, 6 nhị hơi dài hơn bao hoa, bầu rời có 3 ô.

Quả nang hình trứng thuôn, khi chín màu nâu, chứa nhiều hạt.

Mùa hoa quả: tháng 3 - 5.

Cây này rất dễ nhầm lẫn với cây lưỡi hổ (*Sauropus rostratus* Mig.) thuộc họ Thầu dầu (Euphorbiaceae).

2.2.1.3. Phân bố và sinh thái của cây lô hội [2]

Chi Aloe L. có khoảng 330 loài trên thế giới, phân bố ở vùng nhiệt đới châu Phi, Madagascar và Ả Rập. Trong đó, Nam Phi, Ethiopia và Bắc Sômalia là những trung tâm có sự đa dạng cao nhất về các loài của chi này. Trong số 330 loài đã có 100 loài và các dạng lai được trồng khá phổ biến ở khắp các vùng nhiệt đới thuộc Bắc Mỹ, Caribê, châu Phi, Nam Á, Đông Nam Á và Australia. Cây lô hội được trồng nhiều ở Thái Lan, Campuchia, Malaysia, Ấn Độ, Indonesia, Philipin và Việt Nam.

Ở nước ta, lô hội được trồng rải rác ở khắp nơi, nhiều nhất là các tỉnh phía nam và ven biển miền Trung như ở các vùng Phan Thiết, Phan Rí (tỉnh Bình Thuận), Phan Rang (tỉnh Ninh Thuận). Cây được trồng trong chậu hay trên đồng ruộng để làm cảnh và làm thuốc. Lô hội là cây có biên độ sinh thái khá rộng, thích nghi với nhiều loại đất, kể cả đất pha cát hoặc chỉ có cát. Chúng chịu hạn hán và khô nóng rất giỏi vì chúng có khả năng tồn trữ nước trong lá; sinh trưởng và phát triển mạnh trong điều kiện chiếu sáng đầy đủ và ra hoa quả nhiều.

2.2.1.4. Các thành phần chủ yếu trong lô hội [2]

* Nhóm anthraquinone: emodin, aloemodin, acid chrysophanic, aloeresistanol, aloin A (barbaloin A), aloin B, isobarbaloin ($C_{21}H_{22}O_9$)... Các chất trong nhóm này là thành phần có hoạt tính kháng khuẩn trong cây lô hội, trong đó aloin là chất có hoạt tính chính. [8]

- * Nhóm glucosyl chromon: aloeresin A, aloeresin B, aloeresin C.
- * Nhóm polysaccharide: glycomannan, galactan, acemannan galacturonan.
- * Acid amin, các enzyme, phytosterol, muối khoáng, các vitamin (B1, B2, B6 và acid folic)

2.2.2. Đặc điểm sinh học của cây hoa phấn

2.2.2.1. Vị trí phân loại thực vật [10]

Cây hoa phấn thuộc:

Giới: Plantae

Ngành: Magnoliophyta

Lớp: Magnoliopsida

Bộ: Caryophyllales

Họ: Nyctaginaceae

Giống: *Mirabilis*

Loài: *M. jalapa*

Chi: *Mirabilis* L.



Hình 2.2. Cây hoa phấn

2.2.2.2. Mô tả cây hoa phấn [2]

Cây nhỏ, sống nhiều năm, cao 0,7 - 1 m. Rễ củ mập. Thân hình trụ tròn, nhẵn, phình lên ở những mấu. Lá mọc đối, hình trái xoan hoặc gần tam giác, gốc bằng hoặc hơi hình tim, đầu thuôn nhọn, mép nguyên, hai mặt nhẵn.

Cụm hoa mọc ở đầu cành thành xim có cuống rất ngắn, tổng bao có 5 lá bắc nhỏ, màu lục, dính liền trông như đài hợp. Hoa lưỡng tính màu hồng, đỏ, trắng hoặc vàng, rất thơm nhất là về đêm; bao hoa gồm 5 phiến tròn hàn liền thành hình phễu, ống rất hẹp; 5 nhị không bằng nhau, xếp xen kẽ với các phiến của bao hoa, chỉ nhị dính với nhau thành ống ngắn, bầu thượng.

Quả bế hình cầu có đài tồn tại, vỏ mỏng nhăn nheo, màu đen, chứa chất bột trắng mịn.

Mùa hoa quả: gần như quanh năm.

2.2.2.3. Phân bố và sinh thái của cây hoa phấn [2]

Chi *Mirabilis* L. gồm các đại diện có nguồn gốc chủ yếu ở châu Mỹ. Một số loài có hoa đẹp, được trồng làm cảnh ở khắp nơi trên thế giới. Ở Việt Nam, chỉ có một loài hoa phấn xuất xứ từ Mêhicô. Cây ưa sáng và ưa ẩm, có biên độ sinh thái rộng, trồng được ở vùng đồng bằng, trung du và vùng núi cao có khí hậu cận nhiệt đới, về mùa đông có thể nhiệt độ xuống khoảng 0°C. Cây trồng ở các tỉnh phía nam đôi khi nhiệt độ cao tuyệt đối tới 35 - 36°C. Hoa phấn ra hoa quả quanh năm, tái sinh chủ yếu bằng hạt.

2.2.2.4. Các thành phần chủ yếu trong cây hoa phấn [2]

* Rễ có trigonelin, là một cacbohydrat khi thủy phân cho galactose và arabinose.

* Phần trên mặt đất chứa Mc 3-oxo-urs-12-en-28-oat, β -sitosterol, acid oleanolic, acid ursolic, brasicasterol, stigmasterol (Siddiqui B.S. và cs). Trong đó, acid ursolic là chất được dùng nhiều trong mỹ phẩm do có hoạt tính kháng viêm, kháng ung thư, kháng vi sinh... [15]

Begum S. và cs (1994) đã chứng minh sự có mặt của α -amyrin và α -amyrin acetat trong cây.

2.3. Công dụng của cây lô hội và cây hoa phấn

2.3.1. Làm cảnh

Cây lô hội dễ trồng lại có dáng đẹp nên ở một số nơi trồng để làm cảnh. Gần đây, cơ quan hàng không vũ trụ của Mỹ (NASA) đã nghiên cứu thấy lô hội có khả năng chống ô nhiễm môi trường, khử khí độc hại trong nhà ở thông dụng (để ứng dụng trong các phi thuyền vũ trụ). Sơ bộ thấy sau 24 giờ cây lô hội khử hết 90% lượng khí formaldehyd có trong 1 m³ không khí nhà ở. [5]

Cây hoa phấn có nhiều màu sắc như hồng, vàng, trắng... rất đẹp nên cũng được trồng làm cảnh.

2.3.2. Làm chất bảo quản thực phẩm [9]

Các nhà khoa học tại Đại học Miguel Hernández ở Alicante (Tây Ban Nha) đã phát triển một loại gel lô hội có khả năng kéo dài thời gian bảo quản các sản vật tươi như trái cây và đậu tươi. Gel này không màu, không mùi, không vị. Sản phẩm tự nhiên này rất an toàn và thân thiện với môi trường, thay thế cho các chất bảo quản tổng hợp như sulfur dioxide. Nó được phủ bên ngoài, hình thành một lớp bảo vệ chống sự oxy hóa và chống hơi ẩm của không khí và ngăn cản sự hoạt động của các vi sinh vật gây hại nhờ có các hợp chất kháng khuẩn và kháng nấm.

2.3.3. Làm thuốc [2]

Ngoài dùng làm cảnh, người ta còn sử dụng cây lô hội và cây hoa phấn để làm thuốc.

2.3.3.1. Cây lô hội làm thuốc [2]

❖ Bộ phận dùng

Lá thu hái quanh năm dùng tươi hoặc điều chế thành nhựa lô hội bằng cách cắt lá, loại bỏ lớp biểu bì, lấy hết khối nhựa trong suốt, sấy ở nhiệt độ khoảng 50°C. Cũng có thể ép lá lấy dịch, đem cô cách thuỷ đến khô.

❖ Tác dụng dược lý

+ Nhựa khô lá lô hội

Nhựa khô lá lô hội có tác dụng kích thích chuyển động của ruột kết, tăng sự đẩy về phía trước và thúc đẩy nhanh phân qua ruột kết, làm giảm hấp thu dịch từ khối phân, đồng thời làm tăng độ thấm quanh tế bào qua niêm mạc ruột kết, có lẽ do ức chế Na^+ , K^+ , adenosin triphosphatase hoặc do ức chế kênh clorid dẫn đến làm tăng lượng nước trong đại tràng.

Trên lâm sàng, tác dụng tẩy của lô hội chủ yếu do các glycosid 1,8 dihydroxyanthracen, các aloin A và B không hấp thu ở ruột non, bị thuỷ phân trong ruột kết bởi các vi khuẩn ở ruột và biến đổi thành các chất chuyển hoá có hoạt tính, mà chất chính là aloe-emodin-9-anthron có tác dụng kích thích và kích ứng đường tiêu hoá. Tác dụng tẩy của lô hội thường không xuất hiện trước 6 giờ sau khi uống mà đôi khi phải sau 24 giờ hoặc hơn.

Khi dùng quá liều, triệu chứng ngộ độc chủ yếu là đau quặn bụng và tiêu chảy nặng với hậu quả là mất dịch và mất chất điện giải.

+ Thuốc gel lô hội

Gel lô hội là gel thu được từ tế bào nhu mô lá tươi lô hội. Thuốc gel lô hội có tác dụng dược lý như sau:

- Làm lành vết thương: nghiên cứu lâm sàng cho thấy gel lô hội làm mau lành vết thương. Nghiên cứu thực nghiệm *in vivo* chứng minh lô hội làm mau lành vết thương do kích thích trực tiếp hoạt tính của đại thực bào và nguyên sợi bào. Các nguyên sợi bào được hoạt hoá bởi gel lô hội làm tăng sự tổng hợp của collagen và proteoglycan, do đó thúc đẩy làm mau lành vết thương.

Một số hoạt chất là polysaccharide gồm nhiều monosaccharide, chủ yếu là mannose. Chất mannose-6-phosphate có trong gel có thể chịu trách nhiệm một phần về tác dụng làm lành vết thương của gel. Mannose-6-phosphate có thể gắn với thụ thể của yếu tố sinh trưởng trên bề mặt của nguyên bào sợi và do đó làm tăng hoạt tính.

Ngoài ra, acemannan là một phức hợp carbohydrat phân lập từ lá lô hội, được chứng minh làm mau lành vết thương và giảm phản ứng da do phóng xạ. Có hai cơ chế tác dụng: một là acemannan là một chất gây hoạt hoá mạnh các đại thực bào và do đó có thể kích thích giải phóng cytokin tạo fibrinogen, hai là yếu tố sinh trưởng có thể gắn trực tiếp với acemannan làm tăng độ ổn định và kéo dài sự kích thích mô hạt.

Công dụng điều trị của gel lô hội gồm: dự phòng thiếu máu cục bộ da tiến triển gây bởi bỏng, cước và làm thương tổn lạnh giá, thương tổn do điện và sự lạm dụng tiêm thuốc động mạch. Nhiều cơ chế khác giải thích tác dụng của gel lô hội gồm kích thích bổ thể liên kết với polysaccharide, tác dụng thủy hợp, tác dụng cách ly và bảo vệ của gel.

Vì nhiều thành phần có hoạt tính bị hư hỏng trong khi bảo quản nên dùng thuốc gel mới bào chế. Nghiên cứu trên sự phát triển của tế bào bình thường của người cho thấy sự sinh trưởng của tế bào và sự gắn tăng lên khi cho tác dụng lá lô hội tươi, trong khi chế phẩm gel lô hội được làm ổn định có tác dụng độc hại tế bào với cả tế bào bình thường và tế bào khối u. Tác dụng độc hại của gel được ổn định có lẽ do thêm những chất khác trong quá trình xử lý.

- Tác dụng kháng viêm: một số nghiên cứu *in vivo* và *in vitro* chứng minh hoạt tính kháng viêm của gel lô hội. Gel lô hội làm giảm viêm cấp tính ở chuột cống trắng, không tác dụng trên viêm mạn tính. Có thể tác dụng kháng viêm là do hoạt tính của bradykinase và do ức chế thromboxan B₂ và prostaglandin F₂. Ba sterol thực vật có trong lô hội làm giảm viêm cấp tính trên chuột nhắt trắng, trong đó lupeol có tác dụng mạnh nhất.

Trong điều trị bỏng, gel lô hội bị chống chỉ định với người dị ứng với các cây họ Hành tỏi.

❖ Tính vị, công năng

Lô hội có vị đắng, tính hàn, vào 4 kinh: can, tỳ, vị, đại tràng, có tác dụng thanh nhiệt, làm mát gan, thông đại tiện, nhuận tràng...

❖ Công dụng

- Lô hội được dùng trị táo bón cấp tính. Dùng liều cần thiết nhỏ nhất để làm phân mềm. Liều nhuận tràng cho người lớn và trẻ em trên 10 tuổi là 0,04 - 0,11 g dịch ép khô lá lô hội, tương đương với 10 - 30 mg hydroxyanthraquinone trong một ngày hoặc uống một liều 0,1 g vào buổi chiều.

Không dùng lô hội trong những trường hợp sau: tắc hoặc hẹp ruột mất trương lực, mất nước, mất điện giải nặng hoặc táo bón mạn tính, viêm ruột thừa, viêm ruột kết loét, hội chứng kích thích ruột hoặc viêm túi thừa ruột, co cứng cơ, cơn đau bụng, trĩ, thận hoặc những triệu chứng ở bụng không được chuẩn đoán như đau, buồn nôn hoặc nôn, trẻ em dưới 10 tuổi, phụ nữ có thai hay đang cho con bú.

Tác dụng không mong muốn có thể xảy ra như đau quặn bụng, phân lỏng. Sự lạm dụng mạn tính có thể gây viêm gan. Dùng làm thuốc nhuận tràng thời gian dài có thể gây rối loạn chất điện phân, hạ kali máu và canxi máu, nhiễm acid chuyển hoá khó hấp thu, sút cân, albumin niệu, huyết niệu, yếu ớt hoặc hạ huyết áp có thể đứng có thể tăng ở người già. Chứng tăng andosterol thứ phát có thể xảy ra do thương tổn tiểu quản thận sau khi dùng liều cao. Đã nhận xét thấy giảm albumin máu, bài tiết canxi quá mức trong phân và nhuyễn xương cột sống, bệnh nhiễm melanin kết tràng ở người uống thuốc nhuận tràng anthraquinone trong thời gian kéo dài. Sự nhiễm sắc tố vô hại về lâm sàng và thường hồi phục trong vòng 4 - 12 tháng sau khi ngưng thuốc.

- Gel lô hội được dùng trong y học cổ truyền để điều trị vết thương và viêm da nhẹ, bỏng, vết thâm tím và vết trầy da, nhất là những vết bỏng do nhiệt ở độ I và độ II và bỏng do phóng xạ đều khỏi nhanh và ít để lại sẹo.

Dùng gel mới pha chế vì để lâu dễ bị phân huỷ do men, do oxy hoá hoặc do vi khuẩn.

Không dùng gel lô hội bằng đường uống vì không có tác dụng điều trị chắc chắn.

Trong y học dân gian, lô hội được dùng ngoài chữa trĩ, trứng cá, vẩy nến, viêm da tăng tiết bã nhờn và nhiễm nấm, côn trùng đốt, mẫn ngứa do con giòi leo. Dùng gel mới bào chế hoặc chế phẩm chứa 10 - 70% gel lô hội.

Tác dụng không mong muốn: một số ít trường hợp viêm da tiếp xúc và cảm giác bỏng da sau khi bôi tại chỗ gel lô hội trên da bị trầy xước. Cũng có phản ứng dị ứng bong nước cấp tính và mày đay tiếp xúc do dùng gel lô hội.

❖ Bài thuốc có lô hội

Bột lô hội 0,05 g, cao mật bò tinh chế 0,05 g, phenolphtalein 0,05 g, bột cam thảo 0,05 g, tá dược vừa đủ cho một viên. Ngày uống hai viên sau bữa ăn chiều, không dùng liên tục trên 1 - 2 tuần để tránh nguy cơ mất cân bằng chất điện phân.

2.3.3.2. Cây hoa phấn làm thuốc [2]

❖ Bộ phận dùng

Rễ thu hái quanh năm, thái mỏng, tẩm nước gừng, sao vàng. Còn dùng lá và hạt.

❖ Tác dụng dược lý

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết từ hạt cây hoa phấn được thử nghiệm sàng lọc chống vi khuẩn Gram âm và Gram dương, phân lập từ những vết thương nhiễm khuẩn và phân người bị tiêu chảy. Hạt hoa phấn có tác dụng ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn phân lập.

Cao chiết còn 50° của rễ hoa phần có tác dụng ức chế co thắt cơ trơn gây bởi acetylcholin và histamin trên hồi tràng cô lập chuột lang.

❖ Tính vị, công năng

Rễ cây hoa phần có vị ngọt nhạt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt, lợi tiểu, khử thấp, hoạt huyết, giải độc.

❖ Công dụng

Rễ cây hoa phần được dùng chữa băng huyết, bạch đới, đau vú, đình nhọt. Ngày 8 - 16 g sắc uống.

Y học phương Tây dùng rễ hoa phần làm thuốc tẩy thay cho rễ Jalap (là loại thuốc tẩy cổ điển). Liều dùng người lớn: 1 - 2 g; trẻ em: 0,1 - 0,4 g. Ở Trung Quốc, rễ hoa phần được sử dụng như một loại thuốc nhuận tràng nhẹ. Rễ khô (20 g) hoặc rễ tươi (40 g) sắc uống trị nhọt vú, viêm đường tiết niệu, viêm tuyến tiền liệt, bạch đới, đái đường, đái buốt, đái ra máu và đái đục. Rễ hoa phần phối hợp với rễ bạch quả, quả kim anh, quả đơn, rau má, mỗi vị 12 g sắc uống chữa di mộng tinh. Rễ tươi giã đắp trị vết thương, ung nhọt. Kiên kỵ đối với người có thai.

Ở Campuchia, lá hoa phần giã nát đắp lên thái dương làm giảm sốt. Ở Malaysia, nước ép lá hoa phần dùng bôi chữa bỏng, sưng tấy. Quả tán bột, nhào với nước thành bột nhào đắp chữa trứng cá.

Nhân dân Ấn Độ và Pakistan dùng rễ hoa phần thái nhỏ, tẩm bơ, sao khô, tán bột cùng với vài hương liệu có tính ấm, uống làm thuốc bổ. Lá vò nát đắp trị áp xe và nhọt. Dịch ép lá bôi trị vết thương, vết bầm tím và ngứa do mào đay. Ở Pakistan, người ta còn dùng lá làm thuốc trị gậy mù nhọt và hạch xoài, rễ làm thuốc tẩy và chữa trĩ.

❖ Bài thuốc có cây hoa phần

Chữa phát ban: rễ hoa phần 12 g, huyền sâm 30 g, xuyên quy 10 g, thăng ma, phục thần mỗi vị 8 g, hoàng liên, kinh giới, cam thảo, mỗi vị 4 g sắc uống.

2.4. Các phương pháp nhân giống cây lô hội và cây hoa phấn

2.4.1. Nhân giống tự nhiên

Cây lô hội được trồng chủ yếu bằng chồi. Chồi có thể tách và trồng quanh năm, nhưng tốt nhất là vào mùa xuân. Ở quy mô lớn hơn, cần làm đất, lên luống và trồng với khoảng cách 30 x 30 cm hay 30 x 40 cm. Muốn cho cây mọc khoẻ, lá to, cần bón lót phân chuồng. Sau khi trồng và sau mỗi lần thu hoạch lá, bón thúc thêm nước phân chuồng hoặc đạm pha loãng. Nhưng không tưới phân lên ngọn cây vì dễ làm thối nõn và lá non. Cây ít có sâu bệnh, cần giữ cho cây không bị ngập úng. [2]

Cây hoa phấn thường được trồng bằng hạt và thường tự mọc cây mới từ những hạt rụng. Cây rất dễ trồng, không kén đất.

2.4.2. Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô

2.4.2.1. Các nghiên cứu trong nước

Hiện nay, việc nhân giống cây lô hội và cây hoa phấn bằng phương pháp nuôi cấy mô chưa phổ biến lắm, chủ yếu chỉ làm để phục vụ cho nghiên cứu. Một số viện, trường đã nhân giống thành công cây lô hội *in vitro*.

2.4.2.2. Các nghiên cứu ngoài nước

❖ Cây lô hội

Yu Pan, Guo-Ping Chen, Yang Liu, Xio-Yun Wang, Xu-Quing Chen...(2007) đã cảm ứng tạo mô sẹo cây lô hội (*Aloe vera* L. var. *chinensis*) thành công trên môi trường MS có bổ sung 6-BA 2 mg/l với 2,4-D 0,5 mg/l và vitamin C 10 mg/l. Vitamin C giúp hấp thu nhựa lô hội hiệu quả. Tỷ lệ tạo mô sẹo lên đến 91,4% và mô sẹo phát triển rất tốt. [12]

Zhihua Liao, Min Chen, Feng Tan, Xiaofen Sun và Kexuan Tang (2004) đã thiết lập một quy trình vi nhân giống cho cây lô hội (*Aloe vera* L. var. *chinensis* Berger, Chinese Aloe). Kết quả thu được: môi trường tốt nhất cho sự tạo chồi là môi trường MS bán rắn bổ sung BA 2 mg/l, NAA 0,3 mg/l, sucrose 30 g/l và 0,6 g/l PVP (pH 5,8), với cây Chinese Aloe hệ số nhân giống có thể đạt 15 lần trong 4 tuần. [13]

❖ **Cây hoa phấn**

X. Xu, D. Hunter, M.S. Reid nghiên cứu hệ thống tái sinh hiệu quả cây hoa phấn. Họ thu được cây mầm từ việc nuôi cấy (trong tối) hạt hoa phấn trưởng thành trên môi trường MS bổ sung IAA 1 mg/l và TDZ 1 mg/l. Sau đó, lá mầm được chuyển vào môi trường tái sinh chứa muối khoáng, các vitamin và TDZ 2 mg/l. Sau 4 tuần, các mô phân sinh chồi xuất hiện. Hầu hết các mô phân sinh này có thể phát triển thành các chồi trưởng thành. [14]

2.5. Vài nét về các chất điều hòa sinh trưởng thực vật [4]

Có bốn nhóm chất điều hòa sinh trưởng quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật: auxin, gibberellin, cytokinin và acid abscisic. Cả auxin và cytokinin đều được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để kích thích sự phát sinh hình thái và tỉ lệ hormone sử dụng để kích thích sự tạo chồi hay tạo rễ không giống nhau. Tùy theo giống, loài thực vật mà nhu cầu về dạng và nồng độ của auxin và cytokinin khác nhau trong sự phát sinh hình thái.

2.5.1. Auxin

Auxin là nhóm chất điều hòa sinh trưởng thực vật được sử dụng rất thường xuyên trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Auxin kết hợp chặt chẽ với các thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy để kích thích sự tăng trưởng của mô sẹo, huyền phù tế bào và điều hòa sự phát sinh hình thái, đặc biệt là khi nó được sử dụng kết hợp với các cytokinin. Sự áp dụng loại và nồng độ auxin trong môi trường nuôi cấy phụ thuộc vào:

- Kiểu tăng trưởng hoặc phát triển cần nghiên cứu.
- Hàm lượng auxin nội sinh của mẫu cấy.
- Khả năng tổng hợp auxin tự nhiên của mẫu cấy.
- Sự tác động qua lại giữa auxin ngoại sinh và auxin nội sinh.

* Đặc tính của auxin: Auxin có vai trò kích thích sự tăng trưởng và kéo dài tế bào. Auxin có khả năng khởi đầu sự phân chia tế bào. Loại auxin tự nhiên được biết

đến nhiều nhất là IAA (3-indol-acetic acid). Các auxin thường được sử dụng là: IBA, 2,4 – D, NAA...

* Ảnh hưởng của auxin trong nuôi cấy mô:

- Cảm ứng sự tăng trưởng của mô sẹo

Auxin thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng sự tạo mô sẹo từ mẫu cấy. Loại auxin thường được sử dụng cho mục đích này là 2,4 – D , nhưng nếu tiếp tục duy trì mô sẹo trong môi trường có 2,4 – D thì tế bào dễ bị đột biến. Vì vậy, người ta có thể cảm ứng sự tạo mô sẹo bằng NAA hay IAA hoặc sau khi cảm ứng mô sẹo bằng 2,4 – D thì chuyển sang môi trường có NAA hoặc IAA. Để cảm ứng sự tạo mô sẹo từ mẫu cấy cây lá rộng, người ta thường dùng 2,4 – D với nồng độ 4,5 – 13,6 μM (1 – 3 mg/l).

Để cảm ứng sự tạo mô sẹo từ cây hai lá mầm, người ta thường kết hợp auxin với cytokinin nhưng cytokinin lại không cần thiết trong sự tạo sẹo từ cây một lá mầm và auxin phải được sử dụng với nồng độ cao như từ 2 – 10 mg/l.

Auxin kích thích sự phân tán các tế bào trong huyền phù tế bào còn cytokinin thì làm các tế bào kết dính lại với nhau. Nồng độ auxin trong môi trường cao sẽ ngăn cản sự phát sinh hình thái nhưng lại cảm ứng sự phát sinh phôi soma từ các tế bào có khả năng sinh phôi.

- Trong sự tổng hợp diệp lục tố

Trong khi cytokinin kích thích sự tổng hợp diệp lục tố trong mô sẹo và huyền phù tế bào thì auxin lại là yếu tố ngăn cản.

- Ảnh hưởng trên sự phát sinh hình thái (trên sự tạo chồi và rễ)

Sự tạo chồi và rễ từ mô sẹo đòi hỏi cần phải có sự điều chỉnh lại nồng độ auxin và cytokinin cảm ứng ban đầu. Khi nồng độ cytokinin cao hơn auxin thì sẽ có sự tạo chồi từ mẫu cấy. Ngược lại, khi nồng độ auxin cao hơn cytokinin hoặc khi chỉ xử lý với auxin thì rễ sẽ được hình thành. Trong sự tạo rễ thì lượng cytokinin ngoại sinh sẽ là

chất cản. Người ta cho rằng auxin cảm ứng sự tạo rễ là do nó cảm ứng sự tổng hợp polyamine (Friedman và cộng sự, 1985).

- Trên phát sinh phôi soma

Sự phát sinh phôi soma được khởi phát trên môi trường có nồng độ auxin cao (đặc biệt là 2,4 – D), nhưng sự tạo phôi sẽ không tiếp tục diễn ra nếu như không giảm nồng độ auxin trong môi trường xuống. Tuy nhiên cũng có trường hợp ngoại lệ là sự sinh phôi từ mẫu cấy xảy ra trên môi trường hoàn toàn không có auxin. Điều này có thể do hàm lượng auxin nội sinh cảm ứng sự phát sinh phôi soma từ mẫu cấy và sự tạo phôi xảy ra khi lượng auxin đó bị biến dưỡng hoặc do nó liên kết với một số chất khác.

2.5.2. Cytokinin

Cytokinin ít có ảnh hưởng trên một thực vật nguyên vẹn và nó có hiệu quả trong việc kích thích sự sinh tổng hợp protein. Vì vậy nó có thể kích thích sự trưởng thành của diệp lục và làm hoãn sự lão suy của lá cô lập. Khi xử lý cytokinin tại một vị trí trên cây, ví dụ như trên một lá thì lá này sẽ trở thành một nguồn amino acid linh động và các amino acid này sẽ được chuyển đến một cơ quan gần đó. Hiệu quả của cytokinin được chú ý nhiều nhất là trong nuôi cấy mô thực vật. Khi phối hợp cùng với auxin thì cytokinin sẽ kích thích sự phân chia tế bào và điều khiển sự phát sinh hình thái. Khi được bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy chồi thì những hợp chất này sẽ phá vỡ trạng thái hưu miên của chồi ngọn và kích thích sự hoạt động của các chồi bên.

Một số cytokinin thường dùng: BA, TDZ, IPA,...

* Ảnh hưởng của cytokinin trong nuôi cấy mô tế bào thực vật

- Kích thích sự phân chia tế bào

Trong nuôi cấy mô, cytokinin cần thiết cho sự phân chia tế bào của tế bào mẫu cấy. Khi không có cytokinin trong môi trường nuôi cấy thì metaphase của chu trình tế bào sẽ bị kéo dài vì vậy người ta cho rằng cytokinin cần thiết cho sự điều hòa sinh tổng hợp protein tế bào trong sự tăng trưởng và phát triển của tế bào. Trong nuôi cấy mô, nếu lượng cytokinin không đủ thì sự phân chia của nhân tế bào sẽ bị chặn lại tại một

giai đoạn trong chu trình tế bào. Khi cấy chuyển mô sang môi trường mới có chứa cytokinin thì tế bào sẽ phân chia liên tục sau giai đoạn nghỉ. Người ta còn cho rằng sự phân chia tế bào trong mô sẹo xảy ra khi không có sự hiện diện của cytokinin trong môi trường nuôi cấy là do tế bào đã tự tổng hợp cytokinin cho nó.

- Ảnh hưởng trên sự tạo chồi bất định

Cytokinin rất có hiệu quả trong vai trò kích thích sự tạo chồi trực tiếp hoặc gián tiếp trên thực vật nguyên vẹn cũng như trên mô thực vật nuôi cấy *in vitro*. Tác dụng này của cytokinin đôi khi trở nên hiệu quả hơn khi phối hợp với auxin. Một tỉ lệ thích hợp giữa auxin và cytokinin sẽ có hiệu quả trên sự phát sinh hình thái của mẫu cấy.

- Ảnh hưởng trên sự tạo phôi

Người ta thường bổ sung cytokinin với nồng độ thấp vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng sự tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi, đặc biệt là những cây lá rộng. Tuy nhiên, cũng có vài bằng chứng cho rằng cytokinin lại cản sự sinh phôi ở cây một lá mầm.

2.6. Vài nét về các vi khuẩn và nấm gây bệnh thường gặp

2.6.1. Tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus*) [1]

Tụ cầu đã được R. Koch mô tả từ năm 1878. Sau đó, Pasteur (1880) và Ogston (1881) gọi vi khuẩn này là tụ cầu và xếp vào loài *Staphylococcus*. Đến năm 1884, Rosenbach nghiên cứu chi tiết về khả năng gây bệnh và xếp loại của tụ cầu.

Tụ cầu có nhiều loại: có loại gây bệnh, thường gặp nhất là tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) và có loại bình thường sống trên da và niêm mạc, không gây bệnh. Tuy nhiên, trong một số điều kiện nhất định, loại không gây bệnh có thể trở nên gây bệnh. Ngoài ra, còn có những tụ cầu kỵ khí đôi khi cũng gây bệnh.

2.6.1.1. Đặc điểm sinh vật học

❖ Hình thể và tính chất bắt màu

Tụ cầu khuẩn có hình cầu, đường kính 0,8 – 1 μm , đứng tụ lại với nhau thành từng đám như chùm nho. Có thể đứng lẻ tẻ hoặc thành từng đôi hay thành từng chuỗi

ngắn. Tụ cầu thường không có vỏ, không có lông, không di động, không sinh nha bào. Nhuộm bằng phương pháp Gram, vi khuẩn bắt màu Gram dương.

❖ **Tính chất nuôi cấy**

Tụ cầu khuẩn thuộc loại vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí tùy tiện, mọc dễ dàng trên các môi trường nuôi cấy thông thường. Phát triển được trong điều kiện nhiệt độ và pH chênh lệch nhiều (nhiệt độ từ 10°C – 45°C).

- Trong môi trường canh thang, sau 5 – 6 giờ vi khuẩn đã làm đục môi trường, sau 24 giờ môi trường đục rõ, vi khuẩn phát triển nhiều.

- Trên môi trường thạch thường, sau 24 giờ vi khuẩn đã phát triển mạnh, khuẩn lạc dạng S, có sắc tố vàng nhạt hoặc vàng thẫm.

- Trên môi trường thạch máu, khuẩn lạc đục, dạng S, thường gây tan máu và có sắc tố vàng.

❖ **Tính chất sinh vật hoá học**

- Tụ cầu gây bệnh có hệ thống men rất đầy đủ giúp nó tác dụng được trên nhiều loại cacbohydrat, lipit, protein.

- Tụ cầu lên men nhiều loại đường như glucose, mannose, levulose, quan trọng nhất là đường manit.

- Men catalase (+), urease (+).

❖ **Cấu trúc kháng nguyên**

- Dựa vào hiện tượng ngưng kết với huyết thanh thỏ miễn dịch: người ta chia thành 18 type huyết thanh của *Staphylococcus aureus*, trong đó 3 type đầu (I, II, III của Cowan) phần lớn là các type gây bệnh ở người.

- Dựa vào phương pháp miễn dịch hoá học, người ta đã phân tích được tụ cầu có các kháng nguyên:

+ Một kháng nguyên Polysacarit A ở vách gồm có một mucopeptit và một acid ribitol teichoic.

+ Một kháng nguyên Protein ở ngoài vách, nhưng có thể từ vách mà ra.

Có ở 100% tụ cầu vàng và mang tính độc, không có thì không có khả năng gây bệnh.

- Định type bằng phage: người ta phân lập được rất nhiều phage của tụ cầu. Có vài chục phage khá đặc hiệu cho phép xếp loại phần lớn các chủng vào một trong bốn nhóm phage chính: I, II, III, IV. Các vi khuẩn tụ cầu thuộc nhóm nào sẽ bị ly giải bởi một hoặc nhiều phage trong nhóm đó.

❖ Các enzyme và độc tố

- Các enzyme

+ Men Coagulase: men này có khả năng làm đông huyết tương người và thỏ. Nó là một protein bền với nhiệt, tính chất kháng nguyên yếu, có thể gây thành huyết cục trong tĩnh mạch, yếu tố để tạo nên nhiễm khuẩn huyết.

+ Men Fibrinolyzin: là một men đặc trưng cho các chủng gây bệnh ở người. Men này làm tan các cục máu, tạo nên sự rời chỗ và hình thành những vật tắc mạch nhỏ, tạo ra nhiễm khuẩn di căn.

+ Men Desoxyribonuclease: là men có thể thủy phân ADN, có thể gây ra các tổn thương tổ chức.

+ Men Hyaluronidase: gây tan vỡ chất cơ bản của mô liên kết bởi sự thủy phân của acid hyaluronic.

+ Men Penicilinase: tụ cầu gây bệnh có thể tiết ra men này làm cho Penicilin mất tác dụng.

- Độc tố

+ Dung huyết tố (Hemolyzin) có 3 loại chính:

- Dung huyết tố alpha (α): gây tan hồng cầu thỏ ở nhiệt độ 37°C. Dung huyết tố này cũng gây hoại tử da và gây chết. Đó là một ngoại độc tố, có tính kháng nguyên cao và có thể trở thành giải độc tố.
- Dung huyết tố beta (β): có tác dụng làm tan hồng cầu cừu ở 4°C, ít độc hơn dung huyết tố alpha.

- Dung huyết tố denta (δ): có tác dụng lên hồng cầu người đã rửa và gây hoại tử da.
- + Nhân tố diệt bạch cầu (Leucocidin): nhân tố này làm bạch cầu mất tính di động và bị phá huỷ nhân.
- + Các độc tố ruột: các độc tố này gây nhiễm độc thức ăn và viêm ruột cấp. Các độc tố ruột chỉ do một số chủng tụ cầu tiết ra. Có 4 loại, trong đó có 2 loại được biết rõ là:
 - Độc tố ruột A: được tạo ra do một chủng phân lập trong quá trình nhiễm độc thức ăn
 - Độc tố ruột B: được tạo ra do một chủng phân lập được từ bệnh nhân viêm ruột.

2.6.1.2. Khả năng gây bệnh

❖ Gây bệnh cho người

- Các bệnh ngoài da: trên mặt da có những vết xây xát, tụ cầu xuống tổ chức dưới da gây các bệnh mụn nhọt, viêm da, đầu đinh, đinh râu...

- Nhiễm khuẩn huyết do tụ cầu: thường xảy ra ở những người có sức đề kháng yếu hoặc trẻ em. Thường mắc sau các nhiễm khuẩn địa phương. Bệnh thường nặng, có thể gây chết người hoặc trở thành mạn tính gây nên viêm xương, viêm khớp, viêm phổi, viêm cơ,...

- Nhiễm độc thức ăn và viêm ruột cấp tính: bệnh xảy ra nhanh, trầm trọng với các dấu hiệu nôn mửa dữ dội.

❖ Gây bệnh thực nghiệm

Thỏ là động vật dễ cảm nhiễm nhất. Ngoài ra, có thể dùng mèo non, chuột non để tìm độc tố ruột.

2.6.1.3. Chuẩn đoán vi khuẩn học

❖ Lấy bệnh phẩm

Tuỳ theo từng bệnh mà lấy bệnh phẩm thích hợp. Bệnh phẩm phải được lấy đúng quy cách: đảm bảo vô khuẩn, lấy đúng vị trí và thời gian. Trường hợp cần lấy máu để nuôi cấy xác định vi khuẩn phải lấy hai lần.

❖ Nhuộm soi trực tiếp

Phương pháp này sơ bộ nhận định hình thể vi khuẩn mà không có giá trị chuẩn đoán quyết định vì trong cơ thể, tụ cầu có ở nhiều bộ phận mà bình thường nó không gây bệnh. Mặt khác, trên da cũng có rất nhiều tụ cầu không gây bệnh mà hình thể và tính chất bắt màu cũng tương tự tụ cầu gây bệnh.

❖ Nuôi cấy vi khuẩn và xác định tính chất sinh vật hoá học

Phương pháp này được coi là quan trọng nhất trong chuẩn đoán tụ cầu gây bệnh.

- Bệnh phẩm là mủ, dịch: cấy bệnh phẩm vào các môi trường thạch thường, thạch máu, để tủ ấm 37°C, sau 24 giờ, nhận định hình thái khuẩn lạc, xem tính chất tan máu trên môi trường thạch máu, cấy chuyển sang môi trường chapman để kiểm tra tính chất lên men đường manit. Tiếp tục kiểm tra các tính chất sinh vật hoá học còn lại như tính chất đông huyết tương, xác định men catalase.

- Bệnh phẩm là máu: lấy 5 ml máu tĩnh mạch bằng thủ thuật vô khuẩn. Cấy máu vào bình canh thang, tỉ lệ giữa máu và canh thang là 1/12. Để tủ ấm 37°C, theo dõi hàng ngày, nếu thấy môi trường đục thì nhuộm soi, nếu có tụ cầu bắt màu Gram dương thì cấy chuyển sang môi trường thạch máu rồi tiếp tục phân lập như trên.

- Bệnh phẩm là phân: cấy ngay vào môi trường chapman, để tủ ấm 37°C. Sau 48 giờ chọn khuẩn lạc lên men đường manit, tiếp tục kiểm tra các tính chất còn lại.

Việc xác định các tính chất sinh vật hoá học của tụ cầu gây bệnh là rất quan trọng để phân biệt với tụ cầu không gây bệnh. Đáng chú ý nhất là xác định men Coagulase. Phản ứng này có thể được tiến hành trên phiến kính để xác định Coagulase liên kết hay trong ống nghiệm để xác định Coagulase tự do.

❖ **Chuẩn đoán huyết thanh**

Các phản ứng huyết thanh ít có giá trị thực tế, trừ một số bệnh tụ cầu mạn tính ở các tổ chức xương. Trường hợp này có thể tìm các kháng dung huyết tố, kháng leucocidin và kháng coagulase.

2.6.1.4. Phòng bệnh và trị bệnh

❖ **Phòng bệnh**

Vaccin là giải độc tố hoặc vaccin là vi khuẩn ít khi có kết quả tốt. Phương pháp phòng bệnh chủ yếu là giữ vệ sinh chung, vệ sinh cá nhân, vệ sinh ăn uống, vệ sinh nhà,... Đối với các dụng cụ tiêm truyền, các dụng cụ dùng trong sản khoa, ngoại khoa,... phải đảm bảo vô khuẩn khi dùng cho bệnh nhân. Đặc biệt, trong bệnh viện phải chú ý phòng bệnh cho tập thể, chống nhiễm khuẩn chéo.

❖ **Điều trị**

Tụ cầu khuẩn bị tiêu diệt bởi nhiều loại kháng sinh như penicillin, tetracyclin, oxaxilin, kanamycin, gentamycin,... Tuy nhiên, do việc dùng kháng sinh rộng rãi và tùy tiện nên tụ cầu ngày càng kháng lại nhiều loại kháng sinh. Tốt nhất là phải điều trị theo kháng sinh đồ.

2.6.2. Trực khuẩn (*Escherichia coli*) [1]

2.6.2.1. Đặc điểm sinh vật học

❖ **Hình thể**

Trực khuẩn hình que thẳng, kích thước dài ngắn khác nhau, trung bình từ 2 – 3 μm , rộng 0,5 μm , đôi khi trong môi trường nuôi cấy trực khuẩn dài 6 – 8 μm . Trực khuẩn có thể có vỏ, có lông, di động (có thể một số chủng không di động), không sinh nha bào, bắt màu Gram âm.

❖ **Tính chất nuôi cấy**

Vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí tùy tiện, phát triển được ở nhiệt độ 15°C – 40°C, tốt nhất là 37°C, pH 7 – 7,2.

- Trong môi trường lỏng, sau 4 – 5 giờ, *E. coli* đã làm đục nhẹ môi trường, càng để lâu càng đục nhiều và sau vài ngày có thể có vầng mỏng trên mặt môi trường. Để lâu vi khuẩn lắng xuống đáy ống.

- Trên môi trường thạch thường, sau 18 – 24 giờ, khuẩn lạc tròn, bờ đều, bóng, không màu hay màu xám nhẹ, đường kính 2 – 3 mm.

- Trên môi trường phân lập, vi khuẩn thường làm thay đổi màu của môi trường vì lên men lactose, khuẩn lạc có màu vàng trên môi trường Istrati, màu đỏ trên môi trường SS.

❖ **Tính chất sinh vật hóa học**

- Lên men và sinh hơi một số loại đường thông thường như lactose, glucose, manitol, ramnose...Người ta căn cứ vào khả năng lên men đường lactose để phân biệt *E. coli* với một số vi khuẩn đường ruột khác.

- ONPG (+), urease (-), H₂S (-), LDC (+).

- Nghiệm pháp IMVIC: I⁺M⁺V⁻T⁻C⁻: indol (+), đỏ methyl (+), Vosges Proskauer (-), lên men đường inositol (-), citratsimmons (-).

❖ **Sức đề kháng**

E. coli có sức đề kháng yếu. Các chất sát khuẩn thông thường như nước Javel 1/200; phenol 1/200 giết chết vi khuẩn sau 2 - 4 phút. Nhiệt độ 55°C giết vi khuẩn sau 1 giờ và 60°C sau 30 phút.

❖ **Cấu tạo kháng nguyên**

Cấu tạo kháng nguyên của *E. coli* rất phức tạp, *E. coli* có đủ 3 loại kháng nguyên O, H, K.

- Kháng nguyên O: là kháng nguyên thân, đã có đến 142 loại, do đó dựa vào kháng nguyên O để phân chia *E. coli* thành 142 type huyết thanh.

- Kháng nguyên K: là kháng nguyên bề mặt, dựa vào sự nhạy cảm với nhiệt độ của kháng nguyên này, người ta chia kháng nguyên thành 3 loại A, B, L. Kháng nguyên A bền với nhiệt, kháng nguyên L không bền với nhiệt còn kháng nguyên B có tính chất trung gian giữa hai loại kháng nguyên trên.

- Kháng nguyên H: là kháng nguyên lông, được ghi bằng các số 1, 2, 3, 4 và có 48 loại.

Căn cứ vào các kháng nguyên O, K, H người ta chia *E. coli* ra làm nhiều nhóm và nhiều type khác nhau.

2.6.2.2. Khả năng gây bệnh

❖ Gây bệnh cho người

E. coli là vi khuẩn chiếm nhiều nhất trong số các vi khuẩn hiếu khí sống ở đường tiêu hóa. Tuy là vi khuẩn cộng sinh với người nhưng *E. coli* có thể gây bệnh cơ hội. Chúng có thể gây viêm đường tiêu hóa, tiết niệu, sinh dục, đường mật, đường hô hấp và nhiễm khuẩn huyết. Nhưng nhiễm khuẩn quan trọng nhất là viêm dạ dày ruột ở trẻ em.

❖ Gây bệnh thực nghiệm

Khả năng gây bệnh cho súc vật yếu phải dựa một số lượng lớn vi khuẩn vào phúc mạc chuột nhắt hoặc đường tĩnh mạch cho thỏ mới gây chết được súc vật.

2.6.2.3. Chuẩn đoán vi khuẩn học

❖ Lấy bệnh phẩm

Tùy theo từng bệnh mà lấy bệnh phẩm có thể là máu, phân, nước tiểu, mủ, dịch,... Lấy bệnh phẩm phải tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài.

❖ Nuôi cấy

- Bệnh phẩm là máu: cấy vào bình canh thang, theo dõi hàng ngày, nếu thấy môi trường đục thì nhuộm soi vi khuẩn, nếu có trực khuẩn Gram âm thì tiếp tục cấy sang môi trường sinh vật hóa học.

- Bệnh phẩm là phân, nước tiểu, dịch:

+ Cấy vào môi trường chọn lọc Endo, desoxycholat 1% hoặc môi trường Macconkey là những môi trường có ít chất ức chế đối với *E. coli*, để 37°C trong 18 – 24 giờ.

+ Cấy vào các môi trường phân lập khác như: SS, Istrati. Sau 18 - 24 giờ nhận xét khuẩn lạc, chọn khuẩn lạc nghi ngờ cấy chuyển sang môi trường sinh vật hóa học.

Khi kết luận vi khuẩn gây bệnh cần chú ý: trong viêm đường tiết niệu nếu bệnh phẩm có nhiều bạch cầu thì sự có mặt của *E. coli* là có giá trị chuẩn đoán. Bệnh phẩm là phân thì chỉ trả lời dương tính khi phát hiện được các type *E. coli* đặc biệt.

❖ **Xác định tính chất sinh vật hóa học**

Vi khuẩn được cấy vào các môi trường Kligler, ure Indol, manit di động và LDC, ủ ở 37°C, đọc kết quả sau 18 – 24 giờ.

❖ **Phản ứng ngưng kết**

Sau khi đã định hướng bằng tính chất sinh vật hóa học phải làm tiếp các phản ứng ngưng kết trên lam kính. Người ta chế ra các kháng huyết thanh tương ứng với các *E. coli* thường gặp để chuẩn đoán. Đó là 4 tam giá I, II, III, IV và mỗi tam giá có chứa type huyết thanh khác nhau. Nếu phản ứng ngưng kết xảy ra ở một trong các tam giá nào đó thì tiếp tục ngưng kết với các kháng huyết thanh đơn giá trong nhóm đó. Trong trường hợp huyết thanh tam giá ngưng kết mà 3 huyết thanh đơn giá trong nhóm đó không ngưng kết thì coi là âm tính.

2.6.2.4. Phòng bệnh và trị bệnh

❖ **Phòng bệnh**

- Phòng không đặc hiệu: vệ sinh ăn uống và các biện pháp như phòng các bệnh đường ruột khác, đặc biệt chú ý khi có dịch viêm dạ dày ruột ở trẻ em.

- Phòng đặc hiệu: hiện nay người ta đã nghiên cứu sản xuất vaccin uống cho trẻ sơ sinh.

❖ **Điều trị**

Nên điều trị theo kháng sinh đồ vì hiện nay *E. coli* đã kháng lại nhiều loại kháng sinh.

2.6.3. Trùng khuẩn mũ xanh (*Pseudomonas aeruginosa*) [1]

2.6.3.1. Đặc điểm sinh vật học

❖ **Hình thể**

Trực khuẩn thẳng, hai đầu tròn, dài 1 – 5 μm , rộng 0,5 – 1 μm . Trực khuẩn ít khi có vỏ, có một lông ở một đầu, di động, không sinh nha bào, bắt màu Gram âm.

❖ **Tính chất nuôi cấy**

Vi khuẩn mọc dễ dàng trên các môi trường nuôi cấy thông thường, hiếu khí. Nhiệt độ thích hợp là 37°C, phát triển được ở nhiệt độ 5°C – 42°C. Trên môi trường đặc, thường có hai loại khuẩn lạc, một loại to, nhẵn, dẹt, trung tâm hơi lồi; một loại nhỏ, xù xì, lồi.

❖ **Sắc tố**

Tính chất đặc trưng của trực khuẩn mũ xanh là sinh sắc tố và chất thơm. Có 2 loại sắc tố chính: Pyoxyanin có màu xanh lam, tan trong nước và clorofoc, chúng làm cho môi trường nuôi cấy và khuẩn lạc có màu xanh. Pyoverdin là sắc tố huỳnh quang, tan trong nước nhưng không tan trong clorofoc. Các sắc tố của trực khuẩn mũ xanh là dẫn xuất của phenazin, dưới ảnh hưởng hóa học, chúng có thể thay đổi thành sắc tố nâu, đen, đỏ, vàng, ... Chất thơm do trực khuẩn sinh ra là Kimetylamin.

❖ **Tính chất sinh vật hóa học**

- Sử dụng glucose bằng hình thức oxy hóa.
- Không lên men đường lactose. Manit (+) chậm.
- Oxydase (+), citrat simmons (+).
- Indol (-), H₂S (-), LDC (-).

❖ **Cấu tạo kháng nguyên**

- Kháng nguyên lông H: chung cho cả giống, kháng nguyên này dễ bị phá hủy bởi nhiệt độ.

- Kháng nguyên thân O: đặc biệt cho từng type, kháng nguyên O bền với nhiệt độ, bản chất là một phức hợp glucit-lipit-protein tương tự như nội độc tố của các vi khuẩn đường ruột. Có 25 type kháng nguyên thân.

2.6.3.2. Khả năng gây bệnh

❖ **Gây bệnh cho người**

Trực khuẩn mủ xanh có mặt ở mọi nơi trong các bệnh viện. Chúng là loại vi khuẩn gây bệnh có điều kiện như khi cơ thể bị suy giảm miễn dịch, bị bệnh ác tính hoặc mạn tính, khi dùng corticoid lâu dài, việc sử dụng kháng sinh tùy tiện, việc sử dụng các dụng cụ thăm khám hoặc các vết bông, các vết thương hở,...

Tại chỗ, trực khuẩn gây viêm mủ (mủ có màu xanh). Khi có điều kiện thuận lợi, chúng gây bệnh toàn thân như nhiễm khuẩn huyết hoặc viêm phế quản, viêm tai giữa, viêm màng não, viêm tủy xương...

❖ **Gây bệnh thực nghiệm**

Súc vật cảm nhiễm là chuột lang, tiêm vào màng bụng chuột 0,1 – 0,5 ml canh khuẩn, khoảng 50% chuột chết sau vài giờ, những con chuột sống dần dần được hình thành những ổ mủ.

2.6.3.3. Chuẩn đoán vi khuẩn học

❖ **Lấy bệnh phẩm**

- Bệnh phẩm có thể từ các khoang kín như máu, dịch màng phổi, dịch não tủy, dịch khớp... thì dùng bơm kim tiêm vô khuẩn lấy máu, mủ hoặc dịch.

- Ngoài ra, tùy theo từng bệnh mà có thể lấy bệnh phẩm là mủ, đờm, dịch họng, nước tiểu, phân...

❖ **Nhuộm soi trực tiếp**

Nhuộm Gram, soi kính hiển vi thấy trực khuẩn nhỏ, thẳng hoặc hơi cong, bắt màu Gram âm.

❖ **Nuôi cấy**

Cấy bệnh phẩm vào môi trường thạch thường hay thạch máu 5%. Nếu bệnh phẩm bội nhiễm như đờm, ổ mủ, dịch họng..., thì cấy vào môi trường phân lập có cetrimid. Để 37°C sau 24 giờ, xem hình thái của khuẩn lạc, đường kính khuẩn lạc 2 – 4 mm, dẹt và có ánh kim khí. Trên môi trường lỏng, vi khuẩn tạo váng trên mặt môi trường. Chọn những khuẩn lạc có màu xanh và nhuộm xanh môi trường để xác định tính chất sinh vật hóa học.

❖ **Xác định tính chất sinh vật hóa học**

Xác định tính chất lên men đường, thử nghiệm oxydase và các tính chất phân biệt trực khuẩn gây bệnh với các vi khuẩn khác.

❖ Phản ứng ngưng kết

Làm phản ứng ngưng kết giữa vi khuẩn phân lập được với kháng huyết thanh mẫu để xác định vi khuẩn. Có 13 nhóm kháng nguyên O từ O₁ đến O₁₃.

2.6.3.4. Phòng bệnh và trị bệnh

❖ Phòng bệnh

Giữ gìn vệ sinh chung, tránh lây chéo trong bệnh viện, triệt để thực hiện các quy tắc khử khuẩn, vô khuẩn. Nếu có dịch xảy ra phải khẩn trương điều tra và xử lý dịch.

❖ Điều trị

Trực khuẩn mũ xanh đã kháng lại nhiều kháng sinh thường dùng, hiện nay các kháng sinh còn tác dụng là: carbenicilin, ceftazidim thuộc họ β -lactam và amikacin, gentamycin, tobramycin thuộc họ amino glycosid.

2.6.4. Nấm men (*Candida albicans*) [6]

2.6.4.1. Đặc điểm sinh vật học

Candida albicans là nấm men có thể phát triển ở nhiệt độ 20 – 38 °C, pH = 2,5 -7,5, hình dạng tế bào thay đổi từ đơn bào hình bầu dục sang dạng sợi, tế bào nhuộm Gram dương. Đây là loài eukaryote lưỡng bội đơn giản, chưa có chu kì sinh sản hữu tính, có thể sản sinh ống mầm và bào tử vách dày chiết quang rìa mép, thường được sinh ra ở đầu khuẩn ty giả. Sự hình thành bào tử vách dày là một đặc tính hình thái rất quan trọng của *C. albicans*.

2.6.4.2. Khả năng gây bệnh

C. albicans thường sống vô hại ở màng nhầy (miệng, ruột, âm đạo) của người và động vật máu nóng và không thường xuyên ở trên da ở dạng đơn bào. Ở những điều kiện nhất định, nấm men phân hóa thành dạng sợi để xâm nhập vào màng nhầy, tăng trưởng không kiểm soát và gây những bệnh “nhiễm nấm men” khá nghiêm trọng. *C. albicans* là tác nhân gây bệnh candidiasis hay còn gọi là moniliasis tuy không nghiêm trọng nhưng khi lan truyền vào máu hoặc màng não thì rất nguy hiểm. Khả năng tồn tại

ở hai dạng hình thái là đơn bào và nấm sợi giúp loài này nhanh chóng chuyển đổi hình thái trong điều kiện thích hợp và rất khó bị tiêu diệt.

2.6.4.3. Chuẩn đoán

C. albicans được phát hiện bằng khuẩn lạc điển hình trên môi trường Sabouraud Dextrose Agar. Khuẩn lạc điển hình được sử dụng để nhuộm Gram và quan sát các đặc điểm hiển vi để khẳng định là *C. albicans*.

2.6.4.4. Phòng bệnh và trị bệnh

❖ Phòng bệnh

Ăn nhiều vitamin, rau, quả, luyện tập để tăng khả năng chống chọi với bệnh.

Ăn ít đường và những thứ ngon miệng có nấm men.

Duy trì cân bằng vi nấm trong cơ thể, tích cực uống sữa chua.

Vệ sinh thân thể thường xuyên.

❖ Trị bệnh

Bệnh có thể được điều trị bằng các thuốc chống nấm đặc hiệu, tùy mức độ bệnh nặng hay nhẹ mà người ta có hướng điều trị thích hợp.

2.7. Một số nghiên cứu có liên quan

❖ Cây lô hội

Rosca-Casian O, Parvu M, Vlase L, Tamas M (2007) nghiên cứu hoạt tính kháng nấm của lá cây lô hội. Họ cho rằng dịch chiết trong rượu của lá lô hội tươi có thể ngăn cản sự phát triển khuẩn ty thể của một số loại nấm như: *Botrytis gladiolorum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, *Heterosporium pruneti* và *Penicillium gladioli* trên môi trường thạch Czapek. Nồng độ của chất diệt nấm tối thiểu từ 80 – 100 microl/ml tùy loài nấm. [16]

Wang H, Li F, Wang T, Li J, Li J, Yang X, Li J (2004) nghiên cứu xác định hàm lượng aloin trong mô sẹo cây lô hội. Hàm lượng aloin trong mô sẹo được xác định bằng phương pháp sắc kí HPLC và TLC. Kết quả chỉ ra rằng trên môi trường MS với NAA 1 mg/l + 6-BA 0,5 mg/l, độ biệt hóa của mô sẹo từ lá ở mức độ cao nhất so với

mô sẹo từ thân và từ rễ , do đó nó chứa hàm lượng aloin cao nhất. Hàm lượng aloin thấp trong mô sẹo từ thân. Không có aloin trong mô sẹo từ rễ. Trên môi trường MS với 2,4-D 1 mg/l + 6-BA 0,5 mg/l, sự biệt hóa mô sẹo ở mức thấp và không có aloin. [17]

Tian B, Hua YJ, Ma XQ, Wang GL (2003) nghiên cứu mối liên hệ giữa hoạt tính kháng khuẩn của cây lô hội và các hợp chất anthraquinone của nó. Họ cho rằng các chất thuộc nhóm anthraquinone trong lô hội có hoạt tính kháng khuẩn và aloin là chất có hoạt tính chính. Hoạt tính kháng khuẩn của cây lô hội phụ thuộc vào liều lượng của anthraquinone, aloin (1mg/l) có hoạt tính cao hơn aloe-emodin (đường kính vòng vô khuẩn tương ứng: >7,1 +/- 0,15 mm và 5,0 mm). Aloin có thể làm thay đổi hình thái và phá hủy cấu trúc tế bào ngoài của *E. coli*. Aloin và aloe-emodin có thể kháng lại 3 vi khuẩn Gram âm và 2 vi khuẩn Gram dương (được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán qua thạch). Glycoside giúp aloin dễ dàng xâm nhập vào tế bào và làm tăng hoạt tính của nó. [8]

❖ Cây hoa phấn

Cammue BP, De Bolle MF, Terras FR, Proost P, Van Damme J, Rees SB, Vanderleyden J, Broekaert WF (1992) đã cô lập từ hạt hoa phấn hai đoạn peptide kháng khuẩn, được đặt tên là Mj-AMP1 và Mj-AMP2. Các peptide này có tính kiềm cao và gồm có 37 nhóm (Mj-AMP1) hay 36 nhóm (Mj-AMP2). Theo khảo sát của họ thì: Mj-AMP1 và Mj-AMP2 đều biểu hiện hoạt tính kháng nấm phổ rộng (có thể kháng lại 13 loại nấm bệnh cây trồng được kiểm tra). Để ức chế sự phát triển của nấm khoảng 50% đòi hỏi nồng độ của Mj-AMP1 từ 6 - 300 micrograms/ml, của Mj-AMP2 từ 0,5 – 20 micrograms/ml. Hai peptide này cũng có tác động trên hai loại vi khuẩn Gram dương được kiểm tra nhưng không gây độc đối với vi khuẩn Gram âm và các tế bào người được nuôi cấy. [18]

Chương 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

3.1.1. Địa điểm

Đề tài được thực hiện tại Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm Tp HCM.

3.1.2. Thời gian nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu từ tháng 3/2007 đến tháng 7/2007.

3.2. Vật liệu

3.2.1. Trang thiết bị và dụng cụ

Thiết bị: Tủ cấy vô trùng, nồi hấp, tủ ẩm, tủ sấy, máy đo pH, cân điện tử, máy lạnh, nhiệt kế, ẩm kế, máy lắc...

Dụng cụ: Pince, dao cắt, kéo, bình tam giác, đèn cồn, pipette, micropipette, que cấy...

3.2.2. Vật liệu nuôi cấy mô cây lô hội và cây hoa phở

- Cây lô hội *in vitro* cao 4 - 5 cm.
- Hạt cây hoa phở thu hái từ tự nhiên.

3.2.3. Vật liệu thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm

- Các loại vi khuẩn: *Staphylococcus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- Nấm men *Candida albicans*.
- Dịch chiết của cây ngoài tự nhiên, mô sẹo, cây *in vitro*.

3.2.4. Thành phần môi trường sử dụng trong nghiên cứu

3.2.4.1. Môi trường dùng trong nuôi cấy mô

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS của Murashige và Skoog (1962)

Bảng 3.1: Thành phần môi trường MS của Murashige và Skoog

Thành phần	Dạng sử dụng	Nồng độ (mg/l)
Khoáng đa lượng	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	KH ₂ PO ₄	170
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Khoáng vi lượng	H ₃ BO ₄	6,2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
	Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0,25
	KI	0,83
Fe-EDTA	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
Vitamin	Myo – inositol	100
	Nicotinic acid	0,5
	Thiamine – HCl	0,1
	Pyridoxine – HCl	0,5
	Glycine	2,0
Các chất khác	Đường	30g/l
	Agar	7,5g/l
Các chất kích thích tăng trưởng	BA	Tùy nghiệm thức
	2,4-D	
	NAA	

pH môi trường trước khi hấp: 5,7 - 5,8

3.2.4.2. Hoá chất cho thử nghiệm vi sinh

* Môi trường dùng để nuôi cấy vi khuẩn: môi trường cao thịt – pepton

Cao thịt : 3 g/l

Pepton : 10 g/l

NaCl : 5 g/l

Agar : 15 g/l

Nước cất : 1000 ml

pH: 6,0

* Môi trường dùng để nuôi cấy nấm men là môi trường Sabouraud

Glucose : 40 g/l

Pepton : 20 g/l

Agar : 20 g/l

Nước cất : 1000 ml

pH: 5,5 khử trùng ở 0,5 atm/30 phút

3.3. Phương pháp nghiên cứu

3.3.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng lên sự hình thành mô sẹo cây hoa phân

* Mục đích thí nghiệm

+ Xác định nồng độ kích thích tố BA và 2,4-D thích hợp cho sự hình thành mô sẹo tối ưu của cây hoa phân.

+ Tạo nguồn nguyên liệu dùng cho thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm.

* Vật liệu: Lá thật có kích thước 0,5 x 0,5 cm của cây hoa phân nảy mầm từ hạt *in vitro*.

* Môi trường: môi trường sử dụng là môi trường MS với BA 4 mg/l và 2,4-D từ 1 – 4 mg/l, kí hiệu môi trường: BD.

* Cách thực hiện:

Bảng 3.2. Nồng độ BA và 2,4-D sử dụng trong thí nghiệm 1

Kí hiệu môi trường	Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ 2,4-D (mg/l)
BD ₀	0	0
BD ₁	4	1
BD ₂	4	2
BD ₃	4	3
BD ₄	4	4

Bố trí thí nghiệm theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên CRD (Completely Randomized Design), 3 lần lặp lại.

+ Số nghiệm thức: 5 nghiệm thức

+ Tổng số bình môi trường: 15 bình (1 bình/1 nghiệm thức)

+ Số mẫu cấy trên một bình: 3 mẫu

+ Thể tích môi trường: 20 - 25ml/bình

*Chỉ tiêu theo dõi:

+ Tỷ lệ mẫu cấy tạo sẹo (%), theo dõi sau 25 ngày nuôi cấy.

+ Tỷ lệ sống của mô sẹo (%), theo dõi sau 30 ngày nuôi cấy.

+ Khả năng tạo phôi của mô sẹo: theo dõi sau 30 ngày nuôi cấy (có hay không có khả năng tạo phôi).

3.3.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi từ cây lô hội và cây hoa phân *in vitro*

* Mục đích thí nghiệm

+ Xác định nồng độ kích thích tổ BA thích hợp cho sự hình thành cụm chồi.

+ Tạo nguồn nguyên liệu dùng cho thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm.

* Vật liệu: Chồi cây lô hội *in vitro* và chồi cây hoa phần nảy mầm từ hạt.

* Môi trường: môi trường MS với BA từ 1 - 4 mg/l

* Cách thực hiện:

Bảng 3.3. Nồng độ BA sử dụng trong thí nghiệm 2

Kí hiệu môi trường	Nồng độ BA (mg/l)
BA ₀	0
BA ₁	1
BA ₂	2
BA ₃	3
BA ₄	4

Bố trí thí nghiệm theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên CRD (Completely Randomized Design), 3 lần lặp lại.

+ Số nghiệm thức: 5 nghiệm thức đối với mỗi loại cây

+ Tổng số bình môi trường: 30 bình (1bình/1 nghiệm thức)

+ Số mẫu cây trên một bình: 3 mẫu

+ Thể tích môi trường: 50 - 55 ml/bình (cây lô hội).

20 - 25 ml/bình (cây hoa phần).

* Chỉ tiêu theo dõi sau 25 ngày nuôi cấy:

+ Tỷ lệ mẫu cấy tạo cụm chồi (%)

+ Số chồi trung bình/mẫu cấy (chồi)

+ Chiều cao trung bình của chồi (cm)

3.3.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cây lô hội và cây hoa phần ngoài tự nhiên

* Mục đích: kiểm định khả năng kháng sinh của cây ngoài tự nhiên

* Vật liệu

+ Các chủng vi khuẩn: *Staphylococcus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

+ Nấm men *Candida albicans*.

+ Lá cây lô hội

+ Thân, lá, rễ cây hoa phấn

+ Môi trường cấy khuẩn

+ Môi trường cấy nấm

+ Dung môi sử dụng để chiết suất hoạt chất là ethanol.

* Cách thực hiện

+ Môi trường khuẩn, môi trường nấm

Môi trường sau khi được pha và hấp khử trùng, cho vào mỗi đĩa petri có đáy phẳng và đặt lên mặt thật phẳng để thạch có bề dày đồng nhất, khoảng 4 mm. Thể tích môi trường khoảng 15 - 20 ml/đĩa. Để nguội ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, nếu chưa sử dụng thì để trong tủ lạnh từ 4 - 8°C.

+ Dịch vi khuẩn

Trên mặt thạch phân lập vi khuẩn, lấy một ít khuẩn lạc cho vào ống nghiệm chứa 10 ml nước muối sinh lý đã được hấp khử trùng. Sau đó lắc đều và so độ đục với ống Mc. Farland (có độ đục tương đương 1×10^8 CFU/ml) trên giấy trắng có kẻ 3 vạch ngang. Thực hiện đến khi ống nghiệm chứa dịch khuẩn có cùng độ đục với ống Mc. Farland, ta được dịch khuẩn có nồng độ khoảng 1×10^8 CFU/ml.

+ Dịch nấm: thực hiện tương tự dịch khuẩn

+ Trãi vi khuẩn, nấm lên mặt thạch

Dùng micropipette 40 - 200µl hút 200µl dịch vi khuẩn hoặc dịch nấm bơm vào đĩa môi trường. Sau đó dùng que cấy trang vô khuẩn, trang đều trên mặt thạch sao cho vi khuẩn hoặc nấm khuếch tán đầy và đều lên mặt thạch. Trang cho đến khi mặt thạch khô.

+ Dịch chiết cây lô hội và cây hoa phấn

Các bộ phận được sử dụng để chiết tách được rửa sạch. Sử dụng lá lô hội, thân lá và rễ cây hoa phấn. Cân 15 g mỗi loại, giã nát, thêm 5 ml ethanol vào. Chờ khoảng 30 - 40 phút để hiệu quả chiết suất cao.

Dùng pince gấp giấy lọc hình tròn, đường kính cỡ 0,5 cm (được gọi là đĩa kháng sinh) đã được khử trùng lên trên mặt đĩa petri đã trải khuẩn. Đĩa kháng sinh không đặt sát nhau quá, cách thành đĩa khoảng 1 cm.

Nhỏ trực tiếp dịch chiết lên đĩa kháng sinh. Thể tích dịch chiết nhỏ lên mỗi đĩa kháng sinh là 100 μ l.

Đem ủ ở nhiệt độ 37⁰C, sau 24 giờ lấy ra theo dõi.

Số nghiệm thức: 4 nghiệm thức (cây lô hội)

4 nghiệm thức (thân, lá hoa phấn)

4 nghiệm thức (rễ hoa phấn)

Số lần lặp lại: 3 lần (mỗi chủng vi khuẩn, nấm làm 3 đĩa petri)

Tổng số đĩa petri: 36 đĩa

Số mẫu trên 1 đĩa: 3 mẫu (1 mẫu đối chứng: dung môi; 2 mẫu thí nghiệm)

* Chỉ tiêu theo dõi: đo đường kính vòng kháng sinh sau 1 ngày ủ.

3.3.4. Thí nghiệm 4: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của mô sẹo cây hoa phấn

* Mục đích

+ Kiểm định khả năng kháng khuẩn và kháng nấm của mô sẹo.

+ So sánh được khả năng kháng khuẩn và kháng nấm của mô sẹo, cây *in vitro* với cây ngoài tự nhiên.

* Vật liệu

+ Mô sẹo cây lấy từ thí nghiệm 1

+ Các chủng vi khuẩn: *Staphylococcus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

+ Nấm men *Candida albicans*.

+ Môi trường cấy khuẩn

+ Môi trường cấy nấm

+ Dung môi : ethanol

* Cách thực hiện: giống thí nghiệm 3

* Chỉ tiêu theo dõi: đo đường kính vòng kháng sinh sau 1 ngày ủ.

3.3.5.Thí nghiệm 5: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của cây lô hội và cây hoa phân *in vitro*

* Mục đích

+ Kiểm định khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của cây *in vitro*

+ So sánh được khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của mô sẹo, cây *in vitro* với cây ngoài tự nhiên.

* Vật liệu

+ Cây lô hội và cây hoa phân lấy từ thí nghiệm 2

+ Các chủng vi khuẩn

+ Các chủng nấm

+ Môi trường cấy khuẩn

+ Môi trường cấy nấm

+ Dung môi: ethanol

*Cách thực hiện: tương tự thí nghiệm 3

* Chỉ tiêu theo dõi: đo đường kính vòng kháng sinh sau 1 ngày ủ.

❖ **Ghi chú:** Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm STATGRAPHICS (2000)

Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1.Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng lên sự hình thành mô sẹo cây hoa phân

Bảng 4.1. Ảnh hưởng của BA và 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo cây hoa phân *in vitro* sau 25 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Tỉ lệ mẫu cây tạo sẹo (%)	Tỷ lệ sống của mô sẹo (%)
BD ₀	0	0	0,00 ^a	0,00 ^a
BD ₁	4	1	77,78 ^b	100,00 ^c
BD ₂	4	2	66,67 ^b	100,00 ^c
BD ₃	4	3	100,00^c	88,89^c
BD ₄	4	4	100,00 ^c	66,67 ^b
CV%			14,7%	14,22%

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).



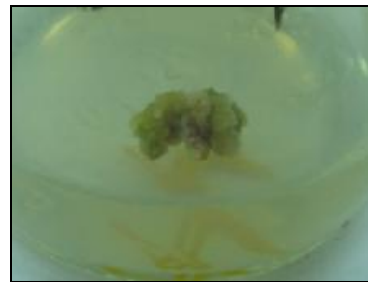
BD₁



BD₂



BD₂



BD₃



BD₄

Hình 4.1. Mô sẹo từ lá hoa phần trên môi trường MS có bổ sung BA và 2,4-D sau 25 ngày nuôi cấy.

*** Nhận xét**

Môi trường MS với BA 4 mg/l và 2,4-D nồng độ từ 1 – 4 mg/l đều thích hợp để tạo mô sẹo từ lá hoa phần.

Tốt nhất là môi trường MS với BA 4 mg/l và 2,4-D 3 mg/l (thí nghiệm BD₃). Đối với môi trường này tỷ lệ tạo sẹo cao (100%), tỷ lệ sống của mô sẹo cũng tương đối

cao (88,89%) so với các môi trường nghiệm thức còn lại. Mô sẹo trên môi trường này có khả năng tạo phôi.

Đối với môi trường đối chứng là môi trường MS không bổ sung BA và 2,4-D (nghiệm thức BD₀) thì mô lá hoa phần không hình thành sẹo. Điều này chứng tỏ trong mô lá hoa phần có thể không chứa hoặc chứa rất ít cytokinin và auxin, không đủ để kích thích sự phân phân hóa của các tế bào ở mô lá, do đó không hình thành mô sẹo được.

Ở môi trường MS với BA 4 mg/l và 2,4-D 1 mg/l (nghiệm thức BD₁), hay BA 4 mg/l và 2,4-D 2 mg/l (nghiệm thức BD₂) thì tỉ lệ tạo sẹo thấp, thời gian ra sẹo lâu hơn nghiệm thức BD₃, tuy nhiên tỷ lệ sống cao (100%), có khả năng tạo phôi.

Môi trường MS với BA 4 mg/l và 2,4-D 4 mg/l (nghiệm thức BD₄) có tỉ lệ tạo mô sẹo cao nhưng có thể nồng độ auxin cao quá làm mô sẹo khô và làm giảm khả năng sống của mô sẹo, hầu như không có khả năng tạo phôi.

4.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi từ cây lô hội và cây hoa phần *in vitro*

4.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi từ cây lô hội *in vitro*

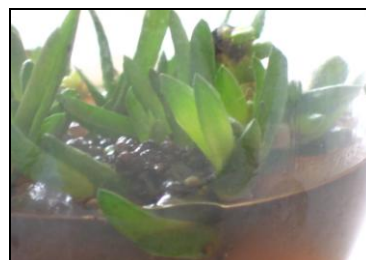
Bảng 4.2. Ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi cây lô hội sau 25 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Tỉ lệ mẫu cấy tạo cụm chồi (%)	Số chồi trung bình/mẫu cấy	Chiều cao trung bình của chồi (cm)
B ₀	33,33 ^a	2,11 ^a	4,02 ^d
B ₁	88,89 ^b	10,00 ^b	2,35 ^c
B ₂	88,89^b	17,00^e	2,41^c
B ₃	88,89 ^b	15,50 ^d	1,03 ^b
B ₄	66,67 ^{ab}	11,70 ^c	0,83 ^a
CV%	23,8%	5,45%	3,48%

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).



Nồng độ BA = 0 mg/l



Nồng độ BA = 1 mg/l



Nồng độ BA = 2 mg/l



Nồng độ BA = 3 mg/l



Nồng độ BA = 4 mg/l

Hình 4.2. Cụm chồi cây lô hội trên môi trường MS có bổ sung BA sau 25 ngày nuôi cấy.

*** Nhận xét**

Môi trường thích hợp cho sự tạo cụm chồi cây lô hội là môi trường MS với BA nồng độ từ 1 - 4 mg/l.

Môi trường tốt nhất cho sự tạo cụm chồi cây lô hội là môi trường MS với BA 2 mg/l. Ở môi trường này số chồi trung bình/mẫu cấy là lớn nhất, tỉ lệ mẫu cấy tạo cụm

chồi cũng tương đối cao (88,89%), thời gian tạo cụm chồi ngắn hơn môi trường MS với BA 3 mg/l và 4 mg/l (thể hiện ở chiều cao trung bình của chồi).

Ở môi trường MS với BA 1 mg/l, mặc dù tỉ lệ tạo cụm chồi và chiều cao trung bình tương đương môi trường MS với BA 2 mg/l nhưng số chồi trung bình/mẫu cấy thấp hơn.

Tuy nhiên điều đó cũng chưa khẳng định được nồng độ BA càng cao thì sự tạo cụm chồi càng tốt vì với môi trường MS với BA 3 mg/l và 4 mg/l thì số chồi trung bình/mẫu cấy tương đối cao nhưng thời gian tạo cụm chồi lại rất dài. Cũng có thể chồi bị ức chế do nồng độ BA cao.

Ở môi trường đối chứng là môi trường MS không bổ sung BA thì tỉ lệ tạo cụm chồi rất thấp (33,33%), chiều cao chồi cao nhất. Có thể do không có một lượng cytokinin cần thiết để ức chế ưu thế ngọn và tạo điều kiện cho các chồi bên phát triển.

4.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi từ cây hoa phấn

Bảng 4.3. Ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi cây hoa phấn sau 25 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Tỉ lệ mẫu cấy tạo cụm chồi (%)	Số chồi trung bình/mẫu cấy	Chiều cao trung bình của chồi (cm)
B ₀	0,00 ^a	1,00 ^a	0,50 ^a
B ₁	77,78 ^b	2,20 ^b	1,60 ^d
B ₂	77,78^b	3,17^c	1,14^c
B ₃	77,78 ^b	2,20 ^b	1,13 ^c
B ₄	77,78 ^b	2,40 ^b	0,81 ^b
CV%	33,33%	9,8%	5,14%

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).



Nồng độ BA = 0



Nồng độ BA = 1 mg/l



Nồng độ BA = 2 mg/l



Nồng độ BA = 3 mg/l



Nồng độ BA = 4 mg/l

Hình 4.3. Cụm chồi hoa phân dưới tác dụng của BA sau 25 ngày nuôi cấy.

*** Nhận xét**

Môi trường MS với BA nồng độ từ 1 – 4 mg/l có thể cảm ứng tạo cụm chồi cây hoa phân.

Qua bảng 4.3: trừ môi trường đối chứng, các môi trường nghiệm thức còn lại đều cho tỉ lệ mẫu cây tạo cụm chồi bằng nhau. Nghiệm thức B₂ là nghiệm thức tốt nhất vì có số chồi trung bình/mẫu cây cao nhất và thời gian tạo cụm chồi chỉ dài hơn nghiệm thức B₁.

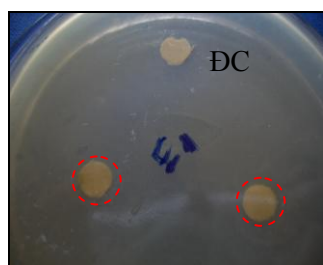
Trong môi trường đối chứng (môi trường MS), cây hoa phân không tạo được cụm chồi mà chỉ phát triển được một chồi ở hầu hết các mẫu cây và thời gian phát triển rất chậm.

4.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cây lô hội và cây hoa phân ngoài tự nhiên

4.3.1. Thí nghiệm 3a: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cây lô hội ngoài tự nhiên

Bảng 4.4. Kết quả hoạt tính kháng sinh và đường kính vòng kháng sinh của các chất chiết thô lá cây lô hội ngoài tự nhiên

Dịch chiết	Loại vi sinh vật	Hoạt tính kháng sinh	Đường kính vòng kháng sinh (cm)
Lá lô hội ngoài tự nhiên trong ethanol	<i>E. coli</i>	(+)	0,80
	<i>Staphylococcus</i>	(-)	0,00
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(+)	1,06
	<i>Candida albicans</i>	(-)	0,00



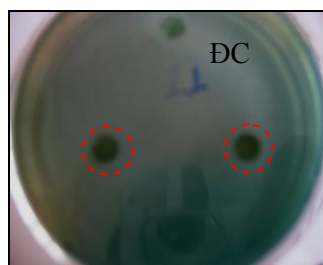
E. coli



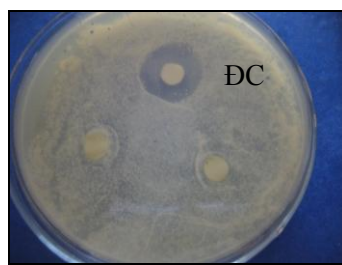
Staphylococcus

*** Ghi chú:**

 : Vòng kháng sinh



Pseudomonas



Candida albicans

Hình 4.4. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô lá lô hội đối với các chủng vi sinh

* Nhận xét

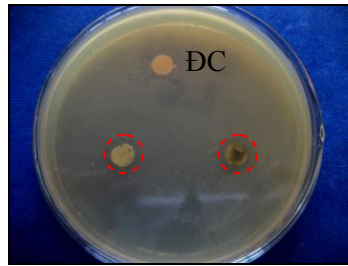
Các chất chiết thô lá lô hội ngoài tự nhiên trong dung môi ethanol chỉ có hoạt tính kháng sinh đối với các chủng *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Tuy nhiên, vòng kháng sinh này rất nhỏ và rất mờ (chỉ có thể thấy bằng mắt thường, khó phân biệt khi chụp lên ảnh).

Vòng kháng sinh đối với *Pseudomonas aeruginosa* lớn hơn đối với *E. coli* chứng tỏ các chất chiết thô lá lô hội ngoài tự nhiên kháng *Pseudomonas aeruginosa* mạnh hơn *E. coli*.

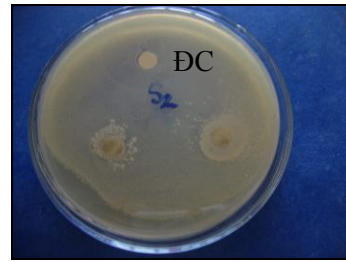
4.3.2. Thí nghiệm 3b: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cây hoa phân ngoài tự nhiên.

Bảng 4.5. Kết quả hoạt tính kháng sinh và vòng kháng sinh của các chất chiết thô thân, lá, rễ cây hoa phân ngoài tự nhiên

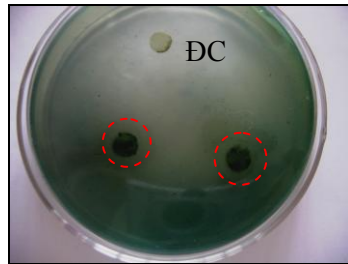
Dịch chiết	Thân, lá cây hoa phân ngoài tự nhiên trong ethanol		Rễ cây hoa phân ngoài tự nhiên trong ethanol	
	Hoạt tính kháng sinh	Đường kính vòng kháng sinh (cm)	Hoạt tính kháng sinh	Đường kính vòng kháng sinh (cm)
<i>E. coli</i>	(+)	0,80	(-)	0,00
<i>Staphylococcus</i>	(-)	0,00	(+)	1,40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(+)	1,03	(-)	0,00
<i>Candida albicans</i>	(-)	0,00	(-)	0,00



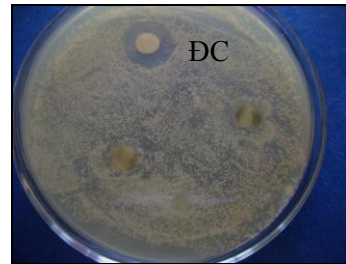
E. coli



Staphylococcus

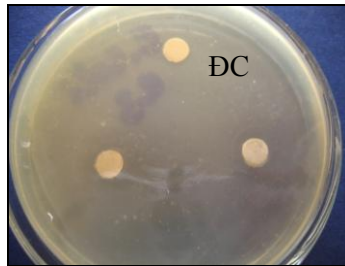


Pseudomonas aeruginosa

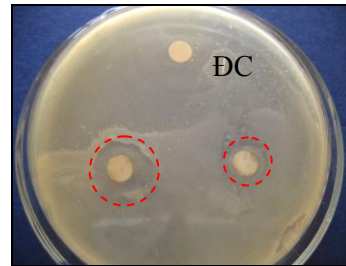


Candida albicans

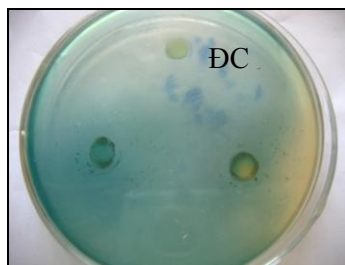
Hình 4.5. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô thân, lá cây hoa phở đối với các chủng vi sinh.



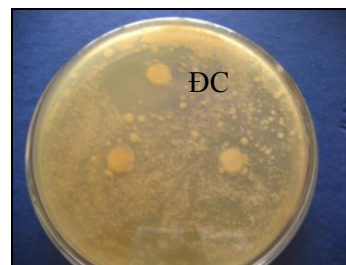
E. coli



Staphylococcus



Pseudomonas aeruginosa



Candida albicans

Hình 4.6. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô rễ cây hoa phở đối với các chủng vi sinh

*** Nhận xét**

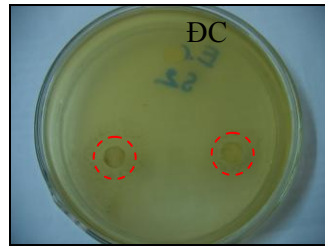
Các chất chiết thô thân, lá cây hoa phần ngoài tự nhiên trong ethanol có hoạt tính kháng sinh đối với các chủng: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; kháng *Pseudomonas aeruginosa* mạnh hơn *E. coli*. Đường kính các vòng kháng sinh này tuy không có sự khác biệt nhiều so với đường kính vòng kháng sinh của các chất chiết thô từ lá lô hội ngoài tự nhiên nhưng vòng kháng sinh rõ hơn rất nhiều. Điều đó chứng tỏ dịch chiết thân, lá hoa phần ngoài tự nhiên kháng các chủng *E. coli* và *Pseudomonas aeruginosa* mạnh hơn hẳn dịch chiết lá lô hội ngoài tự nhiên.

Các chất chiết thô rễ cây hoa phần ngoài tự nhiên trong ethanol có hoạt tính kháng sinh với chủng *Staphylococcus*. Đường kính vòng kháng sinh tương đối lớn (1,4 cm) và rõ.

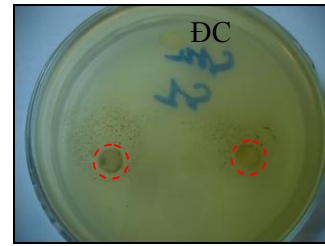
4.4.Thí nghiệm 4: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của mô sẹo cây hoa phần

Bảng 4.6. Kết quả hoạt tính kháng sinh và vòng kháng sinh của các chất chiết mô sẹo cây hoa phần *in vitro*

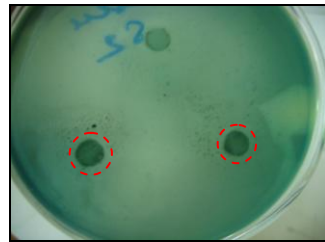
Dịch chiết	Loại vi sinh vật	Hoạt tính kháng sinh	Đường kính vòng kháng sinh (cm)
Mô sẹo cây hoa phần trong dung môi ethanol	<i>E. coli</i>	(+)	1,00
	<i>Staphylococcus</i>	(+)	0,80
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(+)	0,83
	<i>Candida albicans</i>	(-)	0,00



E. coli



Staphylococcus



Pseudomonas aeruginosa



Candida albicans

Hình 4.7. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô mô sẹo cây hoa phần đối với các chủng vi sinh.

*** Nhận xét**

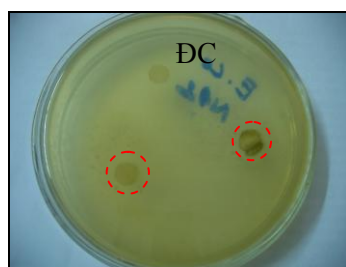
Các chất chiết thô mô sẹo hoa phần trong ethanol có hoạt tính kháng sinh đối với các chủng *E. coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*; kháng *E. coli* mạnh hơn *Staphylococcus* và *Pseudomonas aeruginosa*. Vòng kháng sinh tương đối rõ.

So với các chất chiết thô của thân, lá cây hoa phần ngoài tự nhiên thì đường kính vòng kháng sinh của dịch chiết mô sẹo đối với chủng *E. coli* lớn hơn nhưng đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa* nhỏ hơn. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô mô sẹo rõ hơn rất nhiều. Điều đó có thể chứng tỏ khả năng kháng của dịch chiết mô sẹo cao hơn của dịch chiết thân, lá cây hoa phần ngoài tự nhiên đối với 2 chủng này. Dịch chiết mô sẹo hoa phần và dịch chiết rễ hoa phần kháng được chủng *Staphylococcus*, còn dịch chiết thân, lá cây hoa phần ngoài tự nhiên thì không. Do vậy, ta có thể thay thế dịch chiết của thân, lá, rễ hoa phần ngoài tự nhiên bằng dịch chiết mô sẹo hoa phần để kháng lại 3 chủng vi khuẩn trên với hiệu quả có thể cao hơn.

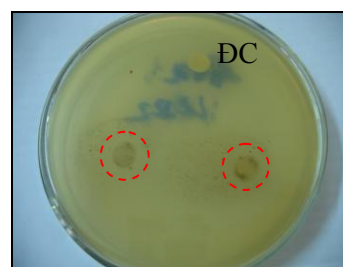
4.5. Thí nghiệm 5: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cây lô hội và cây hoa phân *in vitro*

Bảng 4.7. Kết quả hoạt tính kháng sinh và vòng kháng sinh của chất chiết thô cây lô hội và cây hoa phân *in vitro*

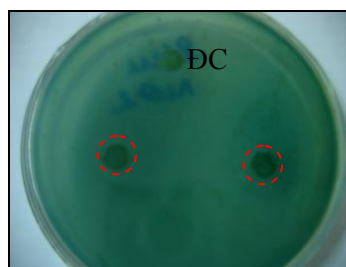
Loại vi sinh vật	Cây lô hội <i>invitro</i> trong ethanol		Cây hoa phân <i>in vitro</i> trong ethanol	
	Hoạt tính kháng sinh	Đường kính vòng kháng sinh (cm)	Hoạt tính kháng sinh	Đường kính vòng kháng sinh (cm)
<i>E. coli</i>	(+)	0,85	(+)	0,90
<i>Staphylococcus</i>	(+)	0,90	(+)	0,95
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(+)	0,80	(+)	1,05
<i>Candida albicans</i>	(-)	0,00	(-)	0,00



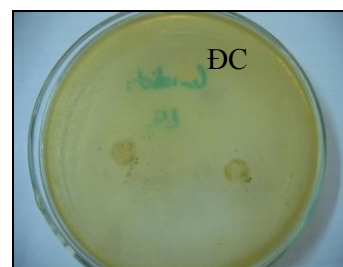
E. coli



Staphylococcus

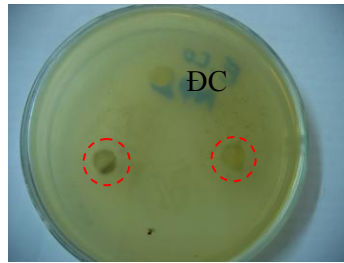


Pseudomonas aeruginosa

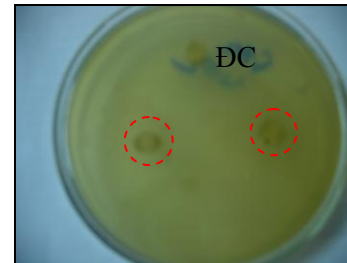


Candida albicans

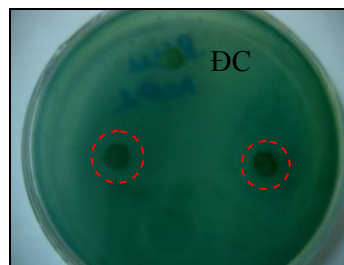
Hình 4.8. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô cây lô hội *in vitro* đối với các chủng vi sinh.



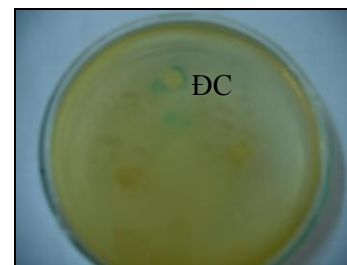
E. coli



Staphylococcus



Pseudomonas aeruginosa



Candida albicans

Hình 4.9. Vòng kháng sinh của các chất chiết thô cây hoa phần *in vitro* đối với các chủng vi sinh.

*** Nhận xét**

Các chất chiết thô cây lô hội *in vitro* và cây hoa phần *in vitro* trong ethanol có hoạt tính kháng sinh đối với các chủng *E. coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Vòng kháng sinh tương đối rõ và lớn.

So với các chất chiết thô cây lô hội ngoài tự nhiên thì các chất chiết thô cây lô hội *in vitro* có vòng kháng sinh rõ hơn rất nhiều mặc dù đường kính nhỏ hơn đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa* và dịch chiết này còn kháng được với chủng *Staphylococcus*. Chứng tỏ cây lô hội *in vitro* có hoạt tính kháng sinh mạnh hơn cây lô hội ngoài tự nhiên. Có thể do hàm lượng các chất có hoạt tính kháng sinh trong cây lô hội *in vitro* cao hơn trong cây lô hội ngoài tự nhiên.

So với các chất chiết thô cây hoa phần ngoài tự nhiên thì vòng kháng sinh của các chất chiết thô cây hoa phần *in vitro* rõ hơn và có đường kính lớn hơn (đối với chủng *E. coli*), còn kháng được với chủng *Staphylococcus*.

So với các chất chiết thô mô sẹo hoa phần thì các chất chiết thô cây hoa phần *in vitro* kháng *E. coli* yếu hơn, nhưng kháng *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* mạnh hơn hẳn.

❖ Nhìn chung các chất chiết thô mô sẹo và cây *in vitro* trong ethanol có khả năng kháng khuẩn tốt hơn các chất chiết thô cây ngoài tự nhiên. Có thể do các chất có hoạt tính kháng khuẩn trong cây *in vitro* có hàm lượng cao hơn cây ngoài tự nhiên. Các chất chiết thô trong ethanol của cây lô hội, cây hoa phần ngoài tự nhiên và *in vitro*, mô sẹo hoa phần *in vitro* không có khả năng kháng lại nấm *C. albicans*.

Chương 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

- Môi trường thích hợp nhất cho sự tạo sẹo cây hoa phấn là môi trường MS với BA 4 mg/l và 2,4-D 3 mg/l.

- Môi trường thích hợp nhất cho sự tạo chồi của cây lô hội và cây hoa phấn là môi trường MS với BA 2 mg/l.

- Dịch chiết trong ethanol của cây lô hội ngoài tự nhiên có khả năng kháng các chủng vi khuẩn: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và không kháng được chủng vi khuẩn *Staphylococcus*, nấm *Candida albicans*. Tuy nhiên khả năng kháng rất yếu, vòng kháng sinh rất mờ và nhỏ.

- Dịch chiết trong ethanol của cây lô hội *in vitro*: có khả năng kháng các chủng vi khuẩn: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus*. Khả năng kháng cao, vòng kháng sinh tương đối rõ.

- Dịch chiết trong ethanol của:

+ Thân, lá cây hoa phấn ngoài tự nhiên: có khả năng kháng các chủng vi khuẩn: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và không kháng được chủng vi khuẩn *Staphylococcus*, nấm *Candida albicans*. Khả năng kháng tương đối cao

+ Rễ cây hoa phấn ngoài tự nhiên: có khả năng kháng khuẩn *Staphylococcus* tương đối cao.

- Dịch chiết trong ethanol của mô sẹo cây hoa phấn và cây hoa phấn *in vitro*: có khả năng kháng các chủng vi khuẩn: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus*. Khả năng kháng cao, vòng kháng sinh tương đối rõ.

5.2. Đề nghị

Trong thời gian ngắn làm khóa luận tốt nghiệp này, những kết quả thu được chỉ là những kết quả bước đầu. Nếu có thời gian, xin đề nghị tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về các hoạt tính sinh học cũng như môi trường nuôi cấy cây lô hội và cây hoa phần *in vitro*. Chẳng hạn như:

- Khảo sát khả năng kháng sinh của các chất chiết thô cây lô hội, cây hoa phần ngoài tự nhiên, cây lô hội, cây hoa phần *in vitro*, mô sẹo trong các dung môi khác như: n – hexan, ether ethylic, diclometan, ethylaxetat, butanol...

- Thử nghiệm khả năng kháng sinh của các chất chiết thô từ cây lô hội và cây hoa phần trên các chủng vi sinh khác như liên cầu khuẩn *Streptococcus*, nấm mốc *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*...

- Tìm hiểu qui trình chiết tinh các chất có hoạt tính sinh học (như aloin trong cây lô hội, acid ursolic trong cây hoa phần).

- Tìm hiểu cơ chế tác dụng của các chất có hoạt tính sinh học lên các chủng vi sinh gây bệnh để từ đó có thể tạo ra các chế phẩm sinh học thay thế thuốc kháng sinh.

- Các môi trường tối ưu để nuôi cấy cây lô hội và cây hoa phần *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

* Tài liệu tiếng Việt

1. Bộ Y tế, Vụ Khoa học – Đào tạo, 2001. *Vi sinh vật y học*. NXB Y Học Hà Nội.
2. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương..., 2004. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập I, tập II*. NXB Khoa Học và Kỹ Thuật Hà Nội.
3. Nguyễn Đại Hải, 2006. *Nuôi cấy mô cây bắt ruồi Drosera burmanni Vahl và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của chất chiết thô Plumbagin*. Khóa luận tốt nghiệp kỹ sư công nghệ sinh học, Đại học Nông Lâm Tp. HCM.
4. Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên, 2002. *Công nghệ tế bào*. NXB Đại Học Quốc Gia TP. HCM.
5. Phạm Thiệp, Lê Văn Thuận, Bùi Xuân Chương, 2000. *Cây thuốc, bài thuốc và biệt dược*. NXB Y học.
6. Trần Linh Thuốc, 2005. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. NXB Giáo Dục.
7. Nguyễn Ngọc Tri, 2005. *Sinh lý thực vật*. Tài liệu lưu hành nội bộ.

* Tài liệu từ internet

8. Tian B, Hua YJ, Ma XQ, Wang GL. *Relationship between antibacterial activity of aloe and its anthraquinone compounds*, Department of Applied Bioscience, Institute of Nuclear-Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China, 2003.
<URI:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=15615409&tool=iconabstr&query_hl=8&itool=pubmed_docsum>
9. http://en.wikipedia.org/wiki/Aloe_vera
10. http://en.wikipedia.org/wiki/Mirabilis_jalapa

11. Nguyễn Bá Huy Cường. *Cây nha đam, dược liệu quý*.
<URI:<http://www.muivi.com/modules.php?op=modload&News&file=article&hold=-1&mode=flat&order=0&sid=746>>
12. Yu Pan, Guo-Ping Chen, Yang Liu, Xio-Yun Wang, Xu-Quing Chen. *Callus Induction of Aloe vera L var chinensis (Haw) Berg*, 2007.
<URI:<http://www.ceps.com.tw/ec/ecjnlarticleView.aspx?jnlcattype=1&jnlptype=3&jnltype=472&jnliid=1561&issueiid=51279&atliid=833568>>
13. Zhihua Liao, Min Chen, Feng Tan, Xiaofen Sun and Kexuan Tang. *Micropropagation of endangered Chinese aloe*, 2004.
<URI: <http://www.springerlink.com/content/m275t2107246361x/>>
14. X. Xu, D. Hunter, M.S. Reid. *An efficient regeneration system for four o'clocks (Mirabilis jalapa)*.
<URI:http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=669_19>
15. <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/ursolic-acid.php>
16. Rosca-Casian O, Parvu M, Vlase L, Tamas M. *Antifungal activity of Aloe vera leaves*, Department of Biology, Faculty of Biology and Geology, Babeş-Bolyai University, 42 Republicii Street, 400015 Cluj-Napoca, Romania, 2007.
<URI:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=17336466&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum>
17. Wang H, Li F, Wang T, Li J, Li J, Yang X, Li J. *Determination of aloin content in callus of Aloe vera var. chinensis*, College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, 2004.
<URI:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=15704580&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstractPlus>

18. Cammue BP, De Bolle MF, Terras FR, Proost P, Van Damme J, Rees SB, Vanderleyden J, Broekaert WF. *Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides form Mirabilis jalapa L. seeds*, F. A. Janssens Laboratory of Genetics, Catholic University of Leuven, Heverlee, Belgium, 1992.

<URI:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1733929&ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum>

PHỤ LỤC

1. Phụ lục 1

- ❖ Bảng giá trị đã được biến đổi dùng phương pháp arcsin của tỉ lệ tạo sẹo cây hoa phần

Nghiem thuc	Số liệu thực (%)			Số liệu biến đổi		
	BD ₀	0,00	0,00	0,00	0,95	0,95
BD ₁	100,00	66,67	66,67	89,04	54,74	54,74
BD ₂	66,67	66,67	66,67	54,74	54,74	54,74
BD ₃	100,00	100,00	100,00	89,04	89,04	89,04
BD ₄	100,00	100,00	100,00	89,04	89,04	89,04

- ❖ Bảng phân tích thống kê tỉ lệ tạo sẹo cây hoa phần

One-Way Analysis of Variance

Data: SEOHOAPH.tlts

Level codes: SEOHOAPH.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation Sum of Squares d.f. Mean square F-ratio Sig. level

Between groups 15717.968 4 3929.4920 50.100 .0000
Within groups 784.327 10 78.4327

Total (corrected) 16502.295 14

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for SEOHOAPH.tlts by SEOHOAPH.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
0	3	.950000	.000000	5.1131421	-7.108068	9.008068
1	3	66.173333	11.433333	5.1131421	58.115265	74.231401
2	3	54.740000	.000000	5.1131421	46.681932	62.798068
3	3	89.040000	.000000	5.1131421	80.981932	97.098068
4	3	89.040000	.000000	5.1131421	80.981932	97.098068
Total	15	59.988667	2.286667	2.2866667	56.384989	63.592344

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 1 P = 0
 Bartlett's test: B = 0 P(0) = 0
 Hartley's test: 0

Multiple range analysis for SEOHOAPH.tlts by SEOHOAPH.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
0	3	.950000	X
2	3	54.740000	X
1	3	66.173333	X
3	3	89.040000	X
4	3	89.040000	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-65.2233	16.1161 *
0 - 2	-53.7900	16.1161 *
0 - 3	-88.0900	16.1161 *
0 - 4	-88.0900	16.1161 *
1 - 2	11.4333	16.1161
1 - 3	-22.8667	16.1161 *
1 - 4	-22.8667	16.1161 *
2 - 3	-34.3000	16.1161 *

* denotes a statistically significant difference.

2. Phụ lục 2

- ❖ Bảng giá trị đã được biến đổi dùng phương pháp arcsin của tỉ lệ sống của mô sẹo cây hoa phân

Nghiệm thức	Số liệu thực (%)			Số liệu biến đổi		
	BD ₀	0,00	0,00	0,00	0,95	0,95
BD ₁	100,00	100,00	100,00	89,04	89,04	89,04
BD ₂	100,00	100,00	100,00	89,04	89,04	89,04
BD ₃	100,00	100,00	66,67	89,04	89,04	54,74
BD ₄	66,67	66,67	66,67	54,74	54,74	54,74

- ❖ Bảng phân tích thống kê tỉ lệ sống của mô sẹo cây hoa phân

One-Way Analysis of Variance

Data: SEOHPN.tls

Level codes: SEOHPN.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	16455.967	4	4113.9917	52.453	.0000
Within groups	784.327	10	78.4327		
Total (corrected)	17240.294	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for SEOHPN.tls by SEOHPN.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
0	3	.950000	.000000	5.1131421	-7.108068	9.008068
1	3	89.040000	.000000	5.1131421	80.981932	97.098068
2	3	89.040000	.000000	5.1131421	80.981932	97.098068
3	3	77.606667	11.433333	5.1131421	69.548599	85.664735
4	3	54.740000	.000000	5.1131421	46.681932	62.798068
Total	15	62.275333	2.286667	2.2866667	58.671656	65.879011

Tests for Homogeneity of Variances

 Cochran's C test: 1 P = 0
 Bartlett's test: B = 0 P(0) = 0
 Hartley's test: 0

Multiple range analysis for SEOHPN.tls by SEOHPN.nt

 Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

 0 3 .950000 X
 4 3 54.740000 X
 3 3 77.606667 X
 1 3 89.040000 X
 2 3 89.040000 X

contrast	difference	limits
0 - 1	-88.0900	16.1161 *
0 - 2	-88.0900	16.1161 *
0 - 3	-76.6567	16.1161 *
0 - 4	-53.7900	16.1161 *
1 - 2	0.00000	16.1161
1 - 3	11.4333	16.1161
1 - 4	34.3000	16.1161 *
2 - 3	11.4333	16.1161

* denotes a statistically significant difference.

3. Phụ lục 3

- ❖ Bảng giá trị đã được biến đổi dùng phương pháp arcsin của tỉ lệ mẫu cây tạo cụm chồi cây lô hội

Nghiem thức	Số liệu thực (%)			Số liệu biến đổi		
B ₀	33,33	33,33	33,33	35,26	35,26	35,26
B ₁	100,00	100,00	66,67	89,04	89,04	54,74
B ₂	100,00	100,00	66,67	89,04	89,04	54,74
B ₃	100,00	100,00	66,67	89,04	89,04	54,74
B ₄	66,67	66,67	66,67	54,74	54,74	54,74

❖ Bảng phân tích thống kê tỉ lệ mẫu cây tạo cụm chồi cây lô hội

One-Way Analysis of Variance

Data: CNHADAM.tlmctc

Level codes: CNHADAM.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	4396.7066	4	1099.1766	4.671	.0219
Within groups	2352.9800	10	235.2980		
Total (corrected)	6749.6866	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for CNHADAM.tlmctc by CNHADAM.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
0	3	35.260000	.000000	8.8562219	21.303017	49.216983
1	3	77.606667	11.433333	8.8562219	63.649683	91.563650
2	3	77.606667	11.433333	8.8562219	63.649683	91.563650
3	3	77.606667	11.433333	8.8562219	63.649683	91.563650
4	3	54.740000	.000000	8.8562219	40.783017	68.696983
Total	15	64.564000	3.960623	3.9606228	58.322247	70.805753

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.333333 P = 0.987654

Bartlett's test: B = 1.10379E6 P(115.153) = 0

Hartley's test: 5.1784E30

Multiple range analysis for CNHADAM.tlmctc by CNHADAM.nt

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
0	3	35.260000	X
4	3	54.740000	XX
1	3	77.606667	X
2	3	77.606667	X
3	3	77.606667	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-42.3467	27.9140 *
0 - 2	-42.3467	27.9140 *
0 - 3	-42.3467	27.9140 *
0 - 4	-19.4800	27.9140
1 - 2	0.00000	27.9140
1 - 3	0.00000	27.9140
1 - 4	22.8667	27.9140
2 - 3	0.00000	27.9140

* denotes a statistically significant difference.

4. Phụ lục 4: Bảng phân tích thống kê số chồi trung bình/mẫu cây cây lô hội

One-Way Analysis of Variance

Data: CHOINDAM.sctbtmc

Level codes: CHOINDAM.nt

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD
Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	409.28664	4	102.32166	272.089	.0000
Within groups	3.76060	10	.37606		
Total (corrected)	413.04724	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for CHOINDAM.sctbtmc by CHOINDAM.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
0	3	2.110000	.0585947	.3540527	1.552030	2.667970
1	3	10.000000	.2886751	.3540527	9.442030	10.557970
2	3	17.000000	.5773503	.3540527	16.442030	17.557970
3	3	15.500000	.2886751	.3540527	14.942030	16.057970
4	3	11.700000	.3511885	.3540527	11.142030	12.257970
Total	15	11.262000	.1583372	.1583372	11.012468	11.511532

Tests for Homogeneity of Variances

 Cochran's C test: 0.53183 P = 0.240206
 Bartlett's test: B = 1.99468 P(5.75403) = 0.218286
 Hartley's test: 97.0874

Multiple range analysis for CHOINDAM.sctbtmc by CHOINDAM.nt

 Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
0	3	2.110000	X
1	3	10.000000	X
4	3	11.700000	X
3	3	15.500000	X
2	3	17.000000	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-7.89000	1.11594 *
0 - 2	-14.8900	1.11594 *
0 - 3	-13.3900	1.11594 *
0 - 4	-9.59000	1.11594 *
1 - 2	-7.00000	1.11594 *
1 - 3	-5.50000	1.11594 *
1 - 4	-1.70000	1.11594 *
2 - 3	1.50000	1.11594 *

* denotes a statistically significant difference.

5. Phụ lục 5: Bảng phân tích thống kê chiều cao trung bình của chồi lô hội *in vitro*

One-Way Analysis of Variance

 Data: CHOINDAM.cctb

Level codes: CHOINDAM.nt

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD
 Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	19.796640	4	4.9491600	903.131	.0000
Within groups	.054800	10	.0054800		
Total (corrected)	19.851440	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for CHOINDAM.cctb by CHOINDAM.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
0	3	4.0200000	.0305505	.0427395	3.9526446	4.0873554
1	3	2.3500000	.0404145	.0427395	2.2826446	2.4173554
2	3	2.4100000	.0472582	.0427395	2.3426446	2.4773554
3	3	1.0300000	.0351188	.0427395	.9626446	1.0973554
4	3	.8300000	.0556776	.0427395	.7626446	.8973554
Total	15	2.1280000	.0191137	.0191137	2.0978777	2.1581223

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.339416 P = 0.952099
 Bartlett's test: B = 1.09335 P(0.743694) = 0.945833
 Hartley's test: 3.32143

Multiple range analysis for CHOINDAM.cctb by CHOINDAM.nt

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
4	3	.8300000	X
3	3	1.0300000	X
1	3	2.3500000	X
2	3	2.4100000	X
0	3	4.0200000	X

contrast	difference	limits
0 - 1	1.67000	0.13471 *
0 - 2	1.61000	0.13471 *
0 - 3	2.99000	0.13471 *
0 - 4	3.19000	0.13471 *
1 - 2	-0.06000	0.13471
1 - 3	1.32000	0.13471 *
1 - 4	1.52000	0.13471 *
2 - 3	1.38000	0.13471 *

* denotes a statistically significant difference.

6. Phụ lục 6

- ❖ Bảng giá trị đã được biến đổi dùng phương pháp arcsin của tỉ lệ mẫu cây tạo cụm chồi cây hoa phân

Nghiem thức	Số liệu thực (%)			Số liệu biến đổi		
	B ₀	0,00	0,00	0,00	0,95	0,95
B ₁	100,00	66,67	66,67	89,04	54,74	54,74
B ₂	66,67	66,67	66,67	54,74	54,74	54,74
B ₃	100,00	100,00	100,00	89,04	89,04	89,04
B ₄	100,00	100,00	100,00	89,04	89,04	89,04

- ❖ Bảng phân tích thống kê tỉ lệ mẫu cây tạo cụm chồi cây hoa phân *in vitro*.

One-Way Analysis of Variance

Data: HOAPHAN.tlmctc

Level codes: HOAPHAN.nt

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	10209.800	4	2552.4499	8.136	.0035
Within groups	3137.307	10	313.7307		
Total (corrected)	13347.106	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for HOAPHAN.tlmctc by HOAPHAN.nt

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
0	3	.950000	.000000	10.226284	-15.166136	17.066136
1	3	66.173333	11.433333	10.226284	50.057197	82.289469
2	3	66.173333	11.433333	10.226284	50.057197	82.289469
3	3	66.173333	11.433333	10.226284	50.057197	82.289469
4	3	66.173333	11.433333	10.226284	50.057197	82.289469
Total	15	53.128667	4.573333	4.573333	45.921312	60.336022

Tests for Homogeneity of Variances

 Cochran's C test: 0.25 P = 1
 Bartlett's test: B = 5.8668E6 P(129.873) = 0
 Hartley's test: 2.12107E34

Multiple range analysis for HOAPHAN.tlmctc by HOAPHAN.nt

 Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
0	3	.950000	X
1	3	66.173333	X
2	3	66.173333	X
3	3	66.173333	X
4	3	66.173333	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-65.2233	32.2323 *
0 - 2	-65.2233	32.2323 *
0 - 3	-65.2233	32.2323 *
0 - 4	-65.2233	32.2323 *
1 - 2	0.00000	32.2323
1 - 3	0.00000	32.2323
1 - 4	0.00000	32.2323
2 - 3	0.00000	32.2323

* denotes a statistically significant difference.

7. Phụ lục 7: Bảng phân tích thống kê số chồi trung bình/mẫu cây cây hoa phân *in vitro*.

One-Way Analysis of Variance

 Data: CHHPHAN.SCTBTMC

Level codes: CHHPHAN.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	7.2621600	4	1.8155400	39.349	.0000
Within groups	.4614000	10	.0461400		
Total (corrected)	7.7235600	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for CHHPHAN.SCTBTMC by CHHPHAN.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
0	3	1.0000000	.0000000	.1240161	.8045565	1.1954435
1	3	2.2000000	.0577350	.1240161	2.0045565	2.3954435
2	3	3.1700000	.0152753	.1240161	2.9745565	3.3654435
3	3	2.2000000	.1732051	.1240161	2.0045565	2.3954435

4	3	2.4000000	.2081666	.1240161	2.2045565	2.5954435

Total	15	2.1940000	.0554617	.0554617	2.1065950	2.2814050

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.563502 P = 0.181509
Bartlett's test: B = 2.66768 P(8.12034) = 0.043589
Hartley's test: 185.714

Multiple range analysis for CHHPHAN.SCTBTMC by CHHPHAN.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
0	3	1.0000000	X
1	3	2.2000000	X
3	3	2.2000000	X
4	3	2.4000000	X
2	3	3.1700000	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-1.20000	0.39089 *
0 - 2	-2.17000	0.39089 *
0 - 3	-1.20000	0.39089 *
0 - 4	-1.40000	0.39089 *
1 - 2	-0.97000	0.39089 *
1 - 3	0.00000	0.39089
1 - 4	-0.20000	0.39089
2 - 3	0.97000	0.39089 *

* denotes a statistically significant difference.

8. Phụ lục 8: Bảng phân tích thống kê chiều cao trung bình của chồi hoa phần *in vitro*

One-Way Analysis of Variance

Data: CHPHAN.CCTB

Level codes: CHPHAN.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD
Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	2.0283600	4	.5070900	178.553	.0000
Within groups	.0284000	10	.0028400		

Total (corrected)	2.0567600	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for CHPHAN.CCTB by CHPHAN.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
0	3	.5000000	.0000000	.0307679	.4515112	.5484888
1	3	1.6000000	.0577350	.0307679	1.5515112	1.6484888

2	3	1.1400000	.0305505	.0307679	1.0915112	1.1884888
3	3	1.1300000	.0057735	.0307679	1.0815112	1.1784888
4	3	.8100000	.0208167	.0307679	.7615112	.8584888

Total	15	1.0360000	.0137598	.0137598	1.0143151	1.0576849

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.704225 P = 0.0382661
Bartlett's test: B = 2.12795 P(6.24961) = 0.100078
Hartley's test: 100

Multiple range analysis for CHPHAN.CCTB by CHPHAN.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
0	3	.5000000	X
4	3	.8100000	X
3	3	1.1300000	X
2	3	1.1400000	X
1	3	1.6000000	X

contrast	difference	limits
0 - 1	-1.10000	0.09698 *
0 - 2	-0.64000	0.09698 *
0 - 3	-0.63000	0.09698 *
0 - 4	-0.31000	0.09698 *
1 - 2	0.46000	0.09698 *
1 - 3	0.47000	0.09698 *
1 - 4	0.79000	0.09698 *
2 - 3	0.01000	0.09698

* denotes a statistically significant difference.