

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.114

KHẢ NĂNG GÂY ĐỘC CỦA CỎ SỮA LÁ NHỎ (*Euphorbia thymifolia* L.) TRÊN MÔ HÌNH RUỒI GIẤM (*Drosophila melanogaster*)

Võ Diệp Thúy¹, Huỳnh Hồng Phiến² và Trần Thanh Mến^{2*}

¹Học viên cao học ngành Sinh thái học K27, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thanh Mến (email: ttmen@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 09/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 23/05/2022

Ngày duyệt đăng: 24/05/2022

Title:

Toxicity of *Euphorbia thymifolia* (L.) in *Drosophila melanogaster* model

Từ khóa:

Cỏ sữa lá nhỏ, côn trùng, độc tính, enzyme acetylcholine, ruồi giấm

Keywords:

Acetylcholinesterase, *Drosophila melanogaster*, *Euphorbia thymifolia* L., insects, toxicity

ABSTRACT

Bio-insecticides are now proposed as useful alternatives to synthetic chemical insecticides for pest management. In this study, *Drosophila melanogaster* was used as an ideal model to investigate the toxic potential of extracts from *Euphorbia thymifolia* (L.). Phytochemical analysis indicated the presence of flavonoid, polyphenol, tannin, and alkaloid. The toxic activities of ethanol extract of *E. thymifolia* were evaluated against the 2nd instar larvae of *D. melanogaster*, the result proved efficient toxicity with mortality of 53.33% at the concentration of 150 mg/mL. In addition, the extract also greatly affected the reproduction, and growth of *Drosophila*. Notably, alterations in acetylcholinesterase activity and impairments in negative geotaxis behavior were observed.

TÓM TẮT

Những loại thuốc trừ sâu có nguồn gốc từ thực vật hiện được đề xuất như những lựa chọn thay thế hữu ích cho thuốc trừ sâu hóa học tổng hợp để quản lý côn trùng gây hại. Trong nghiên cứu này, ruồi giấm được sử dụng như một mô hình côn trùng để khảo sát khả năng gây độc của chiết xuất từ cây cỏ sữa lá nhỏ. Cỏ sữa lá nhỏ khi được phân tích thành phần hóa học cho thấy có sự hiện diện của flavonoid, polyphenol, tannin và alkaloid. Hoạt tính gây độc của chiết xuất cỏ sữa lá nhỏ được đánh giá đối với ấu trùng giai đoạn 2 của ruồi giấm và được chứng minh là có hiệu quả gây tử vong 53,33% ở nồng độ 150 mg/mL. Ngoài ra, cao chiết ethanol cỏ sữa lá nhỏ cũng ảnh hưởng đến quá trình sinh sản và sinh trưởng của ruồi giấm. Đáng chú ý, cao chiết cỏ sữa lá nhỏ gây ra những thay đổi trong hoạt động của enzyme acetylcholine và những suy giảm trong hoạt động vận động di chuyển đã được ghi nhận.

1. GIỚI THIỆU

Thực vật và côn trùng gây hại luôn tương tác với nhau. Thực vật cung cấp thức ăn cho côn trùng và là nơi để chúng trú ngụ, sinh sôi. Tuy nhiên, có nhiều loài thực vật phát triển các cơ chế chống chịu khác nhau để kháng lại côn trùng gây hại và gây ảnh hưởng tiêu cực đến sinh lý, sinh trưởng của côn

trùng, bao gồm các ảnh hưởng đến sự tồn tại, phát triển và khả năng sinh sản của chúng (Kogan et al., 1982).

Cỏ sữa lá nhỏ có tên khoa học là *Euphorbia thymifolia* (L.), thường mọc thành đám nhỏ, lẫn trong các loại cỏ thấp, ở ven đường đi, vườn nhà, nương rẫy, kẽ nứt của sân gạch hay tường bao. Nó

được sử dụng để điều trị nhiều bệnh trong dân gian như chữa lỵ trực khuẩn ở trẻ em, mụn nhọt, phụ nữ băng huyết, lợi sữa, viêm ruột, trĩ sán dây, táo bón, chữa ghê cho cừu và trĩ bệnh nấm (Bích và ctv., 2006). Bên cạnh đó, cây còn có khả năng kháng oxy hóa, ức chế enzym α -glucosidase, enzym acetylcholine (AChE)... (Dao và ctv., 2012; Thoa và ctv., 2012; Linh và ctv., 2013), hay có hoạt tính kháng khuẩn (Duyệt và ctv., 2019). Đặc biệt, kết quả của các nghiên cứu khác cũng cho thấy khả năng kháng côn trùng của cỏ sữa lá nhỏ (Sisodiya & Shrivastava, 2018; Shrivastava & Mishra, 2019).

Chi ruồi giấm *Drosophila* - là một chi trong họ *Drosophilidae*, trong chi này có một số loài đã được báo cáo là gây hại đến hoa quả như loài *Drosophila suzukii* gây ra thiệt hại về kinh tế đối với các loại cây ăn quả tươi, dâu tây, mâm xôi và việt quất (Walsh et al., 2011); *D. subpulchrella* cũng gây nguy hại trên quả mâm xôi và việt quất (Atallah, 2014). Ruồi giấm hay còn gọi là ruồi trái cây, có tên khoa học là *Drosophila melanogaster* cũng nằm trong chi này. Với vòng đời ngắn, số lượng con cái lớn trong mỗi thế hệ, kích thước nhỏ, dễ dàng nuôi giữ và có nhiều đặc điểm tương thích với nhiều loài sâu bệnh gây hại, mô hình ruồi giấm đã được sử dụng phổ biến trong các công trình nghiên cứu về di truyền, sinh lý học, bệnh học (Piazza & Wessells, 2011; Pandey & Nichols, 2011) và trong các nghiên cứu về độc tính của thực vật đối với côn trùng (Riaz et al., 2018). Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát tiềm năng kháng côn trùng của cỏ sữa lá nhỏ trên mô hình ruồi giấm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu thí nghiệm: Thân, lá và hoa cỏ sữa lá nhỏ được thu hái tại thành phố Cần Thơ. Mẫu sau khi thu, tiến hành rửa sạch với nước, loại bỏ các phần bị hư, để ráo và cắt nhỏ. Sau đó mẫu được làm khô bằng cách sấy ở nhiệt độ 60°C và nghiền thành bột.

Đối tượng thí nghiệm: Ruồi giấm hoang dại *Drosophila melanogaster* chủng Canton S (CS) được cung cấp từ phòng thí nghiệm Biofunctional Chemistry (Viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản).

Hóa chất: Ethanol 96° (Trung Quốc), nước cất (Việt Nam), gallic acid (Canada), quercetin (Mỹ), Folin-Ciocalteu (Đức), $AlCl_3$ (Trung Quốc), $NaNO_2$ (Trung Quốc), NaOH (Trung Quốc), acid propionic (Trung Quốc), sodium benzoat (Ấn Độ), acetylcholine chloride (Mỹ), fast blue B salt (Trung Quốc) và một số hóa chất khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều chế cao chiết

Điều chế cao tổng ethanol: Mẫu sau khi xay mịn được cho vào các túi vải và được ngâm trong lượng ethanol (96°) vừa đủ ngập mẫu. Sau 24 giờ ngâm, dung dịch được lọc qua giấy lọc để thu lấy dịch chiết và loại bỏ phần bột cặn. Quá trình ngâm và lọc được thực hiện 3 lần. Dịch trích 3 lần lọc được đem có quay và thu được cao tổng ethanol.

2.2.2. Định tính và định lượng thành phần hóa học

Định tính các hợp chất tự nhiên: Thành phần hóa học của cao chiết cỏ sữa lá nhỏ gồm: alkaloid, flavonoid, phenolic, saponin và tanin được định tính bằng các phương pháp định tính các nhóm hợp chất tự nhiên (Phụng, 2007).

Định lượng polyphenol tổng: Hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp của Singleton (1999) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 250 μ L cao chiết trong 250 μ L nước và 250 μ L thuốc thử Follin-Ciocalteu, lắc đều. Sau đó, 250 μ L Na_2CO_3 10% được thêm vào rồi ủ 30 phút ở 40°C trong máy ổn nhiệt. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm. Acid gallic được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Tổng hàm lượng polyphenol của cao chiết được tính dựa vào phương trình đường chuẩn acid gallic và kết quả được biểu thị bằng miligram tương đương acid gallic (GAE) trên mỗi gram trọng lượng cao chiết (mg GAE/g cao chiết).

Định lượng flavonoid tổng: Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp so màu $AlCl_3$ của Bag et al. (2015) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 200 μ L cao chiết hoặc chất chuẩn ở nồng độ khảo sát được pha trong 200 μ L nước cất cho phản ứng với 40 μ L $NaNO_2$ 5% rồi lắc đều, sau đó để yên 5 phút. Bốn mươi μ L $AlCl_3$ 10% tiếp tục được thêm vào hỗn hợp rồi lắc đều. Sau khi ủ hỗn hợp 6 phút thì thêm 400 μ L NaOH 1 M và 120 μ L nước cất vào hỗn hợp. Hỗn hợp phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Quercetin được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao chiết được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin và kết quả được biểu thị bằng miligram tương đương quercetin trên mỗi gam trọng lượng cao chiết (mg QE/g cao chiết).

2.2.3. Khảo sát hoạt tính kháng côn trùng của cao chiết trên ruồi giấm

Khảo sát độc tính của cao chiết trên ấu trùng giai đoạn 2 của ruồi giấm

Ruồi giấm được nuôi ở 25°C với thức ăn tiêu chuẩn. Ba mươi ruồi giấm đực và 10 ruồi giấm cái được lựa chọn cho giao phối với nhau và giữ chúng 1 ngày ở 25°C. Sau đó, chúng được chuyển sang một ống mới với nền thức ăn tiêu chuẩn trong 24 giờ để giữ trứng và có được tuổi ấu trùng đồng bộ. Ấu trùng giai đoạn 2 được thu thập để tiến hành thử nghiệm (Tran et al., 2019)

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của các loại cao chiết lên ấu trùng giai đoạn 2 của ruồi giấm được tiến hành theo phương pháp của Riaz et al. (2018). Cao chiết cỏ sữa lá nhỏ được chuẩn bị thành các dung dịch mẫu với 5 nồng độ: 25, 50, 75, 100 và 150 mg/mL. Thức ăn tiêu chuẩn dùng để nuôi ruồi được bổ sung thêm cao chiết ở các nồng độ khác nhau. Ba mươi ấu trùng giai đoạn 2 được lấy ngẫu nhiên cho vào mỗi lọ thức ăn. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Tỷ lệ chết của ấu trùng (%) được ghi nhận sau 5 ngày khảo sát, từ đó xác định giá trị gây chết 50% (LC₅₀).

Khảo sát ảnh hưởng của các cao chiết đến khả năng sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm

Trong khảo sát này, môi trường thức ăn tiêu chuẩn được sử dụng có bổ sung thêm cao chiết cỏ sữa lá nhỏ với nồng độ 50 mg/mL. Nghiệm thức đối chứng sử dụng môi trường thức ăn tiêu chuẩn nhưng có bổ sung thêm ethanol. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của cao chiết đến khả năng sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm dựa trên phương pháp nghiên cứu của Chowański et al. (2018) có hiệu chỉnh. Sáu ruồi giấm đực và 4 ruồi giấm cái mới nở trong vòng 2 ngày và chưa giao phối được chọn lựa cho giao phối trong 24 giờ. Sau đó, ruồi bố mẹ được loại bỏ, trứng được giữ và để chúng phát triển trong môi trường thử nghiệm. Ruồi trưởng thành trong khảo sát này được ký hiệu là thế hệ “P”. Các chỉ tiêu theo dõi trong thí nghiệm này bao gồm: số ấu trùng hóa nhộng (%), trọng lượng ấu trùng Giai đoạn 3 và nhộng và tổng số ruồi nở sau 14 ngày khảo sát.

Khảo sát ảnh hưởng của các cao chiết lên khả năng vận động di chuyển của ruồi giấm

Dựa trên phương pháp của Valéria et al. (2014) có hiệu chỉnh, Các cao chiết được khảo sát ảnh hưởng lên khả năng di chuyển của ruồi giấm. Hai mươi ruồi đực 14 ngày tuổi được lựa chọn từ thế hệ “P” và cho chúng vào các ống nghiệm plastic rỗng

có đánh dấu sẵn vạch 6 cm tính từ đáy ống nghiệm lên. Sau 30 phút, ruồi thích nghi với điều kiện trong ống nghiệm thì tiến hành gõ đồng loạt các ống của các nghiệm thức sao cho ruồi hoàn toàn rơi xuống đáy của ống. Ghi nhận số lượng ruồi di chuyển qua vạch định sẵn 6 cm trong 10 giây. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Xác định hoạt tính acetylcholinesterase (AChE)

Hai mươi ruồi trưởng thành “P” (10 con cái, 10 con đực) được chọn ngẫu nhiên ở mỗi nghiệm thức, rửa qua với buffer PBS 1X, và cho vào Eppendorf. Tiến hành đồng nhất bằng cách nghiền nhuyễn trong dung dịch đệm sodium phosphate (20 mM, pH 7,0) trên đá lạnh. Dịch nghiền được ly tâm lạnh ở 4°C (8000 vòng trong 20 phút). Phần dịch mẫu ở trên sau ly tâm được chuyển qua một Eppendorf khác để loại bỏ cặn và trữ lạnh cho những thí nghiệm tiếp theo.

Hoạt tính AChE được xác định theo phương pháp của Younes et al. (2011). Hỗn hợp phản ứng gồm 50 µL dịch mẫu (ruồi giấm trưởng thành từ thế hệ “P” được sử dụng để tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế enzyme), 50 µL acetylcholin (2,6 mM) (cơ chất) và 1000 µL dung dịch đệm sodium phosphate (20 mM, pH 7,0), được ủ ở 25°C trong 5 phút. Sau đó, 400 µL muối Fast blue B (0,3%) được thêm vào hỗn hợp để dừng phản ứng. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm.

Phần trăm ức chế hoạt động của enzyme được tính như sau:

$$\% \text{ ức chế enzyme} = \frac{\text{Abs mẫu đối chứng} - \text{Abs mẫu thử nghiệm}}{\text{Abs mẫu đối chứng} - \text{Abs mẫu trắng}} \times 100$$

Thống kê và phân tích số liệu

Các số liệu được đo và ghi lại sau mỗi thí nghiệm. Dùng phần mềm Microsoft Excel và Minitab 16.0 để xử lý, vẽ đồ thị và phân tích thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát thành phần hóa học

3.1.1. Kết quả định tính

Các chất chuyển hóa của thực vật được chia thành hợp chất sơ cấp và thứ cấp. Chất chuyển hóa sơ cấp là những chất tham gia trực tiếp vào quá trình sinh trưởng, phát triển và sinh sản của tất cả các loài thực vật. Các hợp chất tự nhiên từ thực vật có hoạt tính sinh học đối với côn trùng như terpene, flavonoid, alkaloid, polyphenol, cyanogenic glucoside, quinone, amide, aldehyde, thiophene, amino acid, saccharide và polyketide. Các chất chuyển hóa thứ cấp này có vai trò chính trong việc

bảo vệ chống lại côn trùng (Erb & Kliebenstein, 2020; Jurić et al., 2020). Nhiều hợp chất được phân lập từ thực vật và nấm có hoạt tính diệt côn trùng

hiệu quả (Cespedes et al., 2015; Kedia et al., 2015; Cespedes et al., 2016).

Bảng 1. Kết quả định tính các hợp chất tự nhiên có trong cao chiết xuất từ cỏ sữa

	Alkaloid	Flavonoid	Tannin	Phenolic	Saponin
Cỏ sữa	+	+	+	+	-

Chú thích: (+): có hiện diện; (-): không hiện

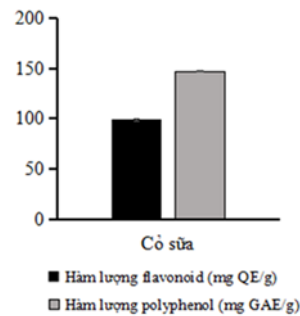
Kết quả Bảng 1 cho thấy thành phần hóa học của cỏ sữa có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như alkaloid, phenolic, flavonoid và tannin. Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu trước đây về sự hiện diện của các nhóm hợp chất flavonoid, phenolic, saponin, carbohydrate, diterpene và glycoside có trong cây cỏ sữa lá nhỏ (Sisodiya & Shrivastava, 2017; Hu et al., 2018; Shrivastava & Mishra, 2019). Trong nghiên cứu của Basma et al. (2011), thành phần hóa học của chiết xuất lá cỏ sữa lá lớn (*E. hirta*) cũng cho thấy sự hiện diện của đường khừ, terpenoid, alkaloid, steroid, tannin, flavanoid và các hợp chất phenolic.

3.1.2. Kết quả định lượng

Các chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật thường được chia thành ba nhóm lớn là terpenoid, phenol và alkaloid, trong đó phenol (polyphenol) là nhóm lớn nhất, đa dạng và phân bố rộng rãi (Singh et al., 2021). Đường chuẩn acid gallic được sử dụng để xác định sự hiện diện của nhóm hợp chất polyphenol có hệ số $R^2 = 0,9975$ và phương trình đường chuẩn $y = 0,0778x + 0,0255$. Flavonoid tổng của cao chiết được xác định tương đương với mg quercetin/g cao chiết (QE) dựa theo phương trình đường chuẩn $y = 0,0046x + 0,0218$ có hệ số $R^2 = 0,9832$. Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số của cao chiết cỏ sữa được tính và được trình bày ở Hình 1.

Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng có chứa trong cao chiết cỏ sữa lần lượt là $147,13 \pm 0,79$ (mg GAE/g cao chiết) và $98,99 \pm 1,26$ (mg QE/g cao chiết). Trong nghiên cứu trước đây của Sisodiya and Shrivastava (2017) cho thấy, hàm lượng polyphenol của chiết xuất nước *E. thymifolia* là 9,98 mg GAE/g cao chiết và flavonoid là 21,2 mg QE/g cao chiết, thấp hơn so với chiết xuất ethanol từ cây cỏ sữa sử dụng trong nghiên cứu. Polyphenol có trong thực vật và các hợp chất liên quan như coumarine hoặc anthraquinone được xem là các hợp chất thứ cấp có vai trò quan trọng chống lại nhiều loài côn trùng gây hại (Abdelkhalek et al., 2020). Phổ tác dụng của chúng lên côn trùng theo phương thức xua đuổi và gây chán ăn. Một loạt côn trùng thuộc các nhóm khác nhau, bao gồm *Rhopalosiphum padi* (L.), Coleoptera, Diptera, Lepidoptera và Orthoptera, tỏ

ra nhạy cảm (Regnault-Roger et al., 2004) với các hợp chất thuộc nhóm polyphenol. Ở cấp độ protein, polyphenol có tác dụng ức chế các enzyme thủy phân, chẳng hạn như pectinase, cellulase và protease.

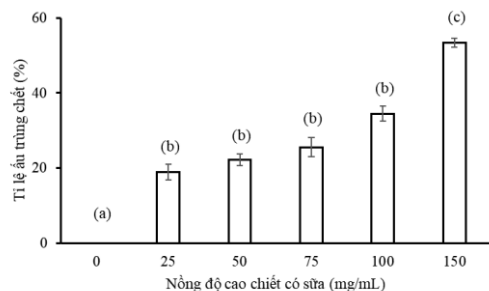


Hình 1. Hàm lượng flavonoid và polyphenol tổng trong cao chiết

(Số liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn)

3.2. Kết quả khảo sát độc tính của cao chiết trên ấu trùng giai đoạn 2 của ruồi giấm

Kết quả khảo sát khả năng gây độc trực tiếp của cỏ sữa được đánh giá thông qua tỉ lệ chết của ruồi giấm được thử nghiệm trên ấu trùng Giai đoạn 2 sau 5 ngày khảo sát, từ đó nồng độ gây chết 50% (LC₅₀) của cao chiết cũng được xác định. Kết quả được trình bày ở Hình 2.



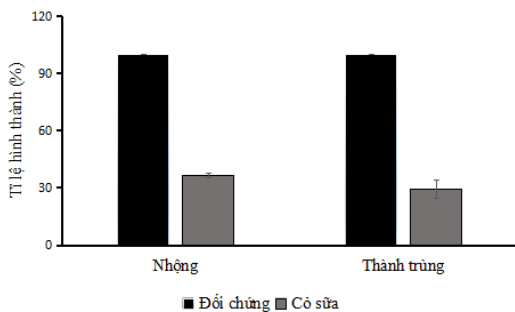
Hình 2. Biểu đồ thể hiện % tỉ lệ ấu trùng giai đoạn 2 chết theo dãy nồng độ khảo sát

(Các giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn có kí hiệu chữ cái khác nhau biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey)

Trong điều kiện có bổ sung, cao chiết cỏ sữa lá nhỏ cho thấy số % ấu trùng chết khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng ở tất cả các nồng độ. Giá trị gây chết 50% (LC₅₀) của cao chiết cỏ sữa được xác định thông qua phương trình hồi quy tuyến tính ($y = 0,3187x + 4,4921$; $R^2 = 0,9503$) với giá trị LC₅₀ = 142,8 mg/mL. Một nghiên cứu đã được tiến hành để đánh giá hiệu quả sàng lọc sơ bộ của chiết xuất methanol từ cỏ sữa lá nhỏ chống lại ấu trùng của sâu hại *Earias fabia* và *Diacrisia obliqua* trên hai loài cây trồng *Abelmoschus esculentus* và *Glycine max* (Shrivastava & Mishra, 2019). Kết quả chứng minh chiết xuất thô methanol của cỏ sữa lá nhỏ có hiệu quả hơn đối với sâu bọ *D. obliqua* có tỷ lệ tử vong là 93,33% so với tỷ lệ tử vong của *E. fabia* là 76,67%.

3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các cao chiết đến khả năng sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm

Các chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật có thể mang lại các đặc tính tương tự như các chất điều hòa sinh trưởng tổng hợp, chẳng hạn như teflubenzuron (Varma & Dubey, 1999; Céspedes et al., 2005). Hoạt động như các chất điều hòa sinh trưởng của côn trùng (IGRs), các hợp chất thực vật ảnh hưởng đến sự sinh sản, phát triển và biến thái của côn trùng (Miresmailli & Isman, 2014; Singh et al., 2021). Nhiều hợp chất hoạt tính sinh học trong chất chiết xuất từ thực vật có thể ảnh hưởng đến sự điều hòa nội tiết của quá trình lột xác và trao đổi chất và do đó hoạt động như chất điều hòa sinh trưởng côn trùng (Kabir et al., 2013).



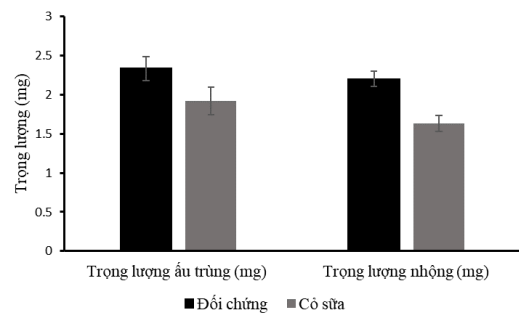
Hình 3. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của cao chiết đến khả năng sinh trưởng, phát triển của ruồi giấm

(Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn)

Chiết xuất từ cỏ sữa được sử dụng để khảo sát với nồng độ 50 mg/mL thức ăn cho thấy các cao chiết đã gây ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm. Số ấu trùng hóa nhộng

được nuôi trong môi trường có bổ sung cao chiết thấp giảm 63,3% so với nghiệm thức đối chứng. Kết quả theo dõi số ruồi con được nở từ ấu trùng sau 14 ngày khảo sát cho thấy cao chiết cũng gây ảnh hưởng đến giai đoạn này. Số ấu trùng hóa nhộng được nở có tỉ lệ thấp nuôi trong môi trường có bổ sung cao chiết thấp hơn 3,39 lần so với nghiệm thức đối chứng.

Các hợp chất thứ cấp thực vật được biết là có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, phát triển và biến thái của côn trùng. Những thay đổi này gây ảnh hưởng đến sinh lý và hành vi của côn trùng, chẳng hạn như giảm trọng lượng của ấu trùng, nhộng và trưởng thành, cũng như kéo dài giai đoạn ấu trùng và nhộng (Singh et al., 2021).



Hình 4. Ảnh hưởng của cao chiết lên trọng lượng ấu trùng và nhộng của ruồi giấm

(Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn)

Kết quả khảo sát Hình 4 cho thấy, trọng lượng ấu trùng ($1,92 \pm 0,17$ mg) và nhộng ($1,63 \pm 0,1$ mg) của nghiệm thức có cao chiết cỏ sữa nhẹ hơn so với nghiệm thức đối chứng lần lượt 17,6 % và 25,91%. Cao chiết cỏ sữa có khả năng ức chế quá trình tiêu hóa và hấp thụ thức ăn trong quá trình phát triển của ấu trùng, gây ra sự giảm trọng lượng, là một trong những nguyên nhân làm ấu trùng ruồi giấm phát triển kém, không thể hóa nhộng và tăng tỉ lệ chết. Sự giảm trọng lượng cơ thể ấu trùng quan sát được phù hợp với phát hiện trước đó trong nghiên cứu của Corio et al. (2013), kết quả đã được báo cáo chứng minh rằng trọng lượng cơ thể ấu trùng của các loài *Drosophila* khác nhau giảm do tác dụng của alkaloid có trong thực vật nơi ấu trùng phát triển đã làm ảnh hưởng đến các quá trình chuyển hóa của chúng khi tiếp xúc. Nghiên cứu gần đây của Shu et al. (2018) về ảnh hưởng của azadirachtin đến sự phát triển *Spodoptera litura* F. cũng cho thấy sự giảm kích thước của ấu trùng khi được xử lý bằng azadirachtin, bên cạnh đó khối lượng ấu trùng này cũng giảm 43,4% so với đối chứng.

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của các cao chiết lên khả năng vận động di chuyển và hoạt động của acetylcholinesterase trên ruồi giấm

Giống như các hợp chất độc hại khác, thuốc trừ sâu có nguồn gốc từ thực vật cũng có thể gây ra

những thay đổi trong hành vi của côn trùng. Chúng kích thích hoặc làm giảm khả năng di chuyển hoặc kiểu bay của côn trùng, và thậm chí gây ra các thay đổi về sinh lý (de Araújo et al., 2017).

Bảng 2. Kết quả đánh giá khả năng ức chế vận động di chuyển và hoạt động enzyme acetylcholine trên ruồi giấm

Nghiệm thức	Số ấu trùng trên vạch 6 cm (con)	Số ấu trùng dưới vạch 6 cm (con)	Hoạt động enzyme acetylcholine (%)
Đối chứng	17,33 ^a ± 1,15	2,67 ^a ± 1,15	100,0 ^a ± 0,00
Cỏ sữa	11,33 ^b ± 0,58	8,67 ^b ± 0,58	62,67 ^b ± 4,33

Ghi chú: Các giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn có kí hiệu chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey.

Kết quả Bảng 2 cho thấy cao chiết có hiệu quả cao ức chế hoạt động di chuyển ở ruồi giấm (*D. melanogaster*). Số lượng ruồi di chuyển qua vạch định mức 6 cm trong 10 giây ở môi trường có chứa cao chiết (56,65%) thấp hơn so với đối chứng (86,65%). Kết quả khảo sát cho kết quả tương đồng được thể hiện trong nghiên cứu của Valéria et al. (2014). Kết quả đã chứng minh rằng việc ruồi tiếp xúc với 50 mg/mL chiết xuất hydroalcoholic từ lá cây *D. furfuracea* (HEDF) trong 7 ngày làm thay đổi hoạt động vận động của ruồi so với đối chứng, những con ruồi được xử lý chủ yếu vẫn ở cuối cột, điều đó chứng tỏ cho thấy chiết xuất ảnh hưởng làm giảm khả năng vận động di chuyển.

Bên cạnh thông số về hành vi vận động, hoạt động của acetylcholinesterase (AChE), enzyme có liên quan đến phản ứng giải phóng chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine của hệ thần kinh trung ương ở côn trùng cũng được đánh giá trong nghiên cứu. Cỏ sữa ở nồng độ 50 mg/mL có khả năng ức chế hoạt động của enzyme AChE đạt 62,67 ± 4,33% tương ứng so với nghiệm thức đối chứng. Sự ức chế AChE làm tổn hại đến quá trình thủy phân chất dẫn truyền thần kinh ACh, dẫn đến sự tích tụ chất dẫn truyền thần kinh này trong khớp thần kinh (Čalić et

al., 2006; Roberts & Aaron, 2007). Nhiều nghiên cứu với các tác nhân độc hại, chẳng hạn như rotenone, paraquat và organophosphorus, cho thấy rằng những tác nhân này có thể dẫn đến sự ức chế AchE, làm mất cân bằng nội môi cholinergic, gây ra nhiều rối loạn thần kinh và hành vi (da Silva et al., 2006). Acetylcholinesterase (AChE) là một loại enzyme quan trọng trong hệ thần kinh của côn trùng thông qua quá trình thủy phân các chất dẫn truyền thần kinh. Khoảng 70% thuốc diệt côn trùng trên thế giới dựa trên các chất ức chế AChE tổng hợp có trên thị trường (organophosphates, carbamat và gần đây là neonicotinoids), bao gồm cả những loại thuốc diệt côn trùng tác động lên các kênh ion natri kiểm soát điện thế (đặc biệt là pyrethrins) (Kabir et al., 2013).

4. KẾT LUẬN

Chiết xuất ethanol từ cây cỏ sữa lá nhỏ có chứa các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học như flavonoid, polyphenol, alkanoid và tannin. Cao chiết cây cỏ sữa lá nhỏ gây độc hiệu quả lên ấu trùng ruồi giấm giai đoạn hai, gây ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển, đặc biệt là gây hạn chế khả năng vận động di chuyển và ức chế hoạt động enzyme acetylcholine ở ruồi giấm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdelkhalek, A., Salem, M. Z., Kordy, A. M., Salem, A. Z., & Behiry, S. I. (2020). Antiviral, antifungal, and insecticidal activities of Eucalyptus bark extract: HPLC analysis of polyphenolic compounds. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104383. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104383>

Atallah, J., Teixeira, L., Salazar, R., Zaragoza, G., & Kopp, A. (2014). The making of a pest: the evolution of a fruit-penetrating ovipositor in

Drosophila suzukii and related species. *Proceedings of the Royal Society B*, 281. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2840>

Bag, G.C., Devi, P.G., & Bhaigyabati, T. (2015). Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three hedychium species of Manipur valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(1), 154-159.

Basma, A. A., Zakaria, Z., Latha, L. Y., & Sasidharan, S. (2011). Antioxidant activity and

- phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(5), 386-390. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60109-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60109-0)
- Bích, Đ. H., Chung, Đ. Q., Churong, B. X., Dong, N. T., Đam, Đ. T., Hiền, P. V., Lộ, V. N., Mai, P. D., Mãn, P. K., Nhu, Đ. T., Tập, N., Toản, T. (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam tập 1*, 2. Hà Nội: NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- Čalić, M., Vrdoljak, A. L., Radić, B., Jelić, D., Jun, D., Kuča, K., & Kovarik, Z. (2006). In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun-and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology*, 219(1-3), 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.11.003>
- Céspedes, C. L., Aqueveque, P. M., Avila, J. G., Alarcon, J., & Kubo, I. (2015). New advances in chemical defenses of plants: Researches in Calceolariaceae. *Phytochem Rev.* 14, 367–380. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9392-y>
- Céspedes, C.L., Salazar, J.R., Martínez, M., & Aranda, E. (2005). Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry*, 66, 2481–2493. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.07.010>
- Chowański, S., Chudzińska, E., Lelario, F., Ventrella, E., Marciniak, P., Miądowicz-Kobielska, M., Spochacz, M., Szymczak, M., Scrano, L., Aurelio, B. S., Adamski, Z. (2018). Insecticidal properties of *Solanum nigrum* and *Armoracia rusticana* extracts on reproduction and development of *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 162, 454-463. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.030>
- Corio, C., Soto, I.M., Carreira, V.P., Padro, J., Betti, M.I.L., & Hasson, E. (2013). An alkaloid fraction extracted from the cactus *Trichocereus terscheckii* affects fitness components in the cactophilic fly *Drosophila buzzatii*. *Biol J Linn Soc Lond*, 109, 342–353. <https://doi.org/10.1111/bij.12036>
- da Silva, A. P., Meotti, F. C., Santos, A. R., & Farina, M. (2006). Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. *Neurotoxicology*, 27(6), 1101-1105. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.04.002>
- Dao, P. T. A., Hai, N. X., Nhan, N. T., Quan, T. L., & Mai, N. T. T. (2012). Study on DPPH free radical scavenging and lipid peroxidation inhibitory activities of Vietnamese medicinal plants. *Natural Product Sciences*, 18, 1-7.
- de Araújo, A. M. N., Faroni, L. R. D. A., de Oliveira, J. V., do Amaral Ferraz Navarro, D. M., Breda, M. O., & de França, S. M. (2017). Lethal and sublethal responses of *Sitophilus zeamais* populations to essential oils. *Journal of Pest Science*, 90(2), 589-600. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0822-z>
- Duyệt, H. N., Cư, P. V., Linh, N. Q., & Huy, H. N. Q. (2019). Sử dụng cây Cỏ sữa lá nhỏ – *Euphorbia thymifolia* Burm (L.) – Để phòng và trị bệnh tiêu chảy do *E. coli* trên lợn con tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự Nhiên*, 128(1E), 125-32. <http://jos.hueuni.edu.vn/index.php/hujos-ns/article/view/5220>
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant physiology*, 184(1), 39-52. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>
- Hu, Y. K., Li, Y. Y., Li, M. J., Li, F., Xu, W., & Zhao, Y. (2018). Chemical constituents of *Euphorbia thymifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(6), 1185-1186. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2590-x>
- Jurić, S., Sopko Stracenski, K., Król-Kilińska, Ž., Žutić, I., Uher, S. F., Đermić, E., Topolovec-Pintarić, S., & Vinceković, M. (2020). The enhancement of plant secondary metabolites content in *Lactuca sativa* L. by encapsulated bioactive agents. *Scientific reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60690-3>
- Kabir, K. E., Choudhary, M. I., Ahmed, S., & Tariq, R. M. (2013). Growth-disrupting, larvicidal and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Ecotoxicology and environmental Safety*, 90, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.028>
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P.K., Singh, P., & Dubey, N.K. (2015). Botanicals as ecofriendly biorational alternatives of synthetic pesticides against *Callosobruchus* spp. (Coleoptera: Bruchidae)—A review. *J Food Sci Technol*, 52:1239–1257. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1167-8>
- Kogan, M., Metcalf, R. L., & Luckmann, W. H. (1982). Introduction to insect pest management. *RL Metcalf and WH Luckman*, 103-146.
- Linh, L. T. M., Hải, N. X., Nhân, N. T., & Mai, N. T. T. (2013). Nghiên cứu hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase của một số dược liệu Việt Nam. *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 18, 133-138.
- Miresmailli, S., & Isman, M. B. (2014). Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. *Trends in plant science*, 19, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.002>

- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 63, 411–463. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>
- Phụng, N. K. P. (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- Piazza, N., & Wessells, R. J. (2011). *Drosophila* models of cardiac disease. *Molecular Biology and Translational Science*, 100, 155–210. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384878-9.00005-4>
- Regnault-Roger, C., Ribodeau, M., Hamraoui, A., Bateau, I., Blanchard, P., Gil-Munoz, M. I., & Barberan, F. T. (2004). Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*, 40(4), 395–408. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(03\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(03)00031-6)
- Riaz, B., Zahoor, M. K., Zahoor, M. A., Majeed, H. N., Javed, I., Ahmad, A., Jabeen, F., Zuhussnain, M., & Sultana, K. (2018). Toxicity, Phytochemical Composition, and Enzyme Inhibitory Activities of Some Indigenous Weed Plant Extracts in Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2325659. <https://doi.org/10.1155/2018/2325659>
- Roberts, D. M., & Aaron, C. K. (2007). Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Bmj*, 334(7594), 629–634. <https://doi.org/10.1136/bmj.39134.566979.BE>
- Shrivastava, R., & Mishra, J. (2019). Screening of methanolic extracts of *Euphorbia thymifolia* for insecticidal biopotency against larvae of *Abelmoschus esculentus* and *Glycine max* pests viz. *Earias fabia* and *Diacrisia oblique*. *The Pharma Innovation Journal*, 8(5), 659–664. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i3.2608>
- Shrivastava, R., & Mishra, J. (2019). Extraction, phytochemical screening, isolation and identification of bioactive compounds from extract of the plant *Euphorbia Thymifolia* Linn. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(3), 107–113.
- Shu, B., Zhang, J., Cui, G., Sun, R., Yi, X., & Zhong, G. (2018). Azadirachtin Affects the Growth of *Spodoptera litura* Fabricius by Inducing Apoptosis in Larval Midgut. *Front Physiol*, 9, 137. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00137>
- Singh, K. D., Mobolade, A. J., Bharali, R., Sahoo, D., & Rajashekar, Y. (2021). Main plant volatiles as stored grain pest management approach: a review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 4, 100127. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100127>
- Singleton R. O. & Vernon L. R. M. L.-R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sisodiya, D., & Shrivastava, P. (2018). Repellent and antifeedant activities of *Euphorbia thymifolia* (Linn.) and *Manilkara hexandra* (Roxb.) against *Rhyzopertha dominica* (Fab.). *International Journal of Research and Analytical Reviews*, 5(3), 257y–260y.
- Sisodiya, D., & Shrivastava, P. (2017). Qualitative and quantitative estimation of bioactive compounds of *Euphorbia thymifolia* L. *Asian J Pharm Edu Res*, 6(3), 34–43.
- Thoa, N. K., Phuong, D. M. T., Hải, N. X., & Mai, N. T. T. (2012). Nghiên cứu hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của cây Cỏ sữa lá nhỏ (*Euphorbia thymifolia*). *Tạp chí Hóa học*, 50, 82–86.
- Tran, D. B., Pham, L. A. T., Nishihara, T., Tran, T. M., & Kamei, K. (2019). The function of lipin in the wing development of *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3288. <https://doi.org/10.3390/ijms20133288>
- Valéria, S. A. P. F., Felipe, S. G., Echeverria, M. G., Raquel, M. K., Kemmerich, M. I., Paula, L. T. A., Galberto, M. C. J., Linde, A. M., Augusti, B. A., Paul, K. J., Luis, F. J., Rose, A. M. I., Posser, T. (2014). Phytochemical Constituents and Toxicity of *Duguetia furfuracea* Hydroalcoholic Extract in *Drosophila melanogaster*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 838101. <https://doi.org/10.1155/2014/838101>
- Varma, J., Dubey, N. (1999). Prospectives of botanical and microbial products as pesticides of tomorrow. *Curr Sci*, 76, 172–179.
- Walsh, D. B., Bolda, M. P., Goodhue, R. E., Dreves, A. J., Lee, J., Bruck, D. J., Walton, V. M., O'Neal, S. D., Zalom, F. G. (2011) *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *Journal of Integrated Pest Management*, 2, G1–G7. <https://doi.org/10.1603/IPM10010>
- Younes, M. W., Othman, S. E., Elkersh, M. A., Youssef, N. S., & Omar, G.A. (2011). Effect of seven plant oils on some biochemical parameters in Khapra beetle *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *Egypt J Exp. Bio*, 7, 53–61.