



DOI:10.22144/ctujos.2025.206

HIỆU QUẢ CỦA THẢO DƯỢC LÁ BÀNG VÀ LÁ SEN TRONG VIỆC GIẢM STRESS VÀ TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* GÂY BỆNH Ở CÁ CẢNH

Thị Hoa Rô¹, Đoàn Minh Phụng^{1,2}, Đinh Thị Thủy², Trần Ngọc Quốc Tường¹,
Trần Phạm Vũ Linh¹, Nguyễn Trọng Nghĩa¹ và Nguyễn Thành Vũ^{*}

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Kỹ Thuật - Công nghệ, Đại học Văn Hiến, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): nthanhvushtp@tphcm.gov.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 19/03/2025

Sửa bài (Revised): 09/04/2025

Duyệt đăng (Accepted): 14/07/2025

Title: Efficacy of *Terminalia catappa* and *Nelumbo nucifera* extracts in reducing oxidative stress and enhancing resistance to pathogenic bacteria in ornamental fish

Author(s): Thi Hoa Rol¹, Doan Minh Phung^{1,2}, Dinh Thi Thuy², Tran Ngoc Quoc Tuong¹, Tran Pham Vu Linh¹, Nguyen Trong Nghia¹ and Nguyen Thanh Vu^{1*}

Affiliation(s): ¹Department of Aquacultural Biotechnology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Viet Nam; ²Department of Engineering and Technology, Van Hien University, Viet Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của cao chiết từ lá bàng (*Terminalia catappa*) và lá sen (*Nelumbo nucifera*) trong việc giảm stress oxy hóa và tăng cường khả năng đề kháng với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* ở cá cảnh. Phương pháp nghiên cứu được dùng như sau: chiết xuất bằng ethanol 70%, xác định nồng độ an toàn, phối trộn với các tỉ lệ khác nhau, sau đó đánh giá khả năng chống stress oxy hóa (sử dụng H₂O₂) và kháng khuẩn trên ba loài cá cảnh phổ biến: cá ngựa vằn (*Danio rerio*), cá cầu vồng (*Melanotaeniidae*), cá cảnh bướm (*Gymnocorymbus ternetzi*). Kết quả cho thấy nồng độ an toàn của cao chiết lá bàng và lá sen lần lượt là 100 µg/mL và 75 µg/mL. Tỉ lệ phối trộn là 75% lá bàng : 25% lá sen (75 LB : 25 LS) cho tỷ lệ sống (TLS) >80% khi cá chịu stress oxy hóa và >40% khi cá bị cảm nhiễm với *E. ictaluri*. Hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng của hỗn hợp này lần lượt là 458,34 ± 25,34 mg GAE/g và 332,41 ± 19,21 mg QE/g, cao hơn so với cao chiết riêng lẻ. Như vậy, hỗn hợp cao chiết lá bàng và lá sen có tiềm năng ứng dụng để hỗ trợ giảm bớt việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản cảnh, góp phần hướng tới mô hình nuôi cá bền vững và an toàn.

Từ khóa: Cá cảnh, *Edwardsiella ictaluri*, lá bàng, lá sen, oxy hóa

ABSTRACT

This study evaluated the efficacy of *Terminalia catappa* and *Nelumbo nucifera* extracts in reducing oxidative stress and enhancing resistance against *Edwardsiella ictaluri* infection in ornamental fish. Methods included 70% ethanol extraction, determination of safe concentrations (SC), blending at various ratios, and assessment of antioxidant (via H₂O₂) and antibacterial activities on three common ornamental fish species (*Danio rerio*, *Melanotaeniidae*, and *Gymnocorymbus ternetzi*). Results showed that the SCs of *T. catappa* and *N. nucifera* extracts were 100 µg/mL and 75 µg/mL, respectively. A 75:25 blend (*T. catappa* : *N. nucifera*) achieved survival rates over 80% under oxidative stress conditions and over 40% upon *E. ictaluri* infection. Total phenolic and flavonoid contents of the blend were 458.34 ± 25.34 mg GAE/g and 332.41 ± 19.21 mg QE/g, respectively, surpassing those of individual extracts. These findings highlight the potential of this herbal blend as an alternative to reduce antibiotics usage in ornamental aquaculture, contributing to sustainable and safe fish farming practices.

Keywords: *Edwardsiella ictaluri*, *Nelumbo nucifera*, ornamental fish, oxidative stress, *Terminalia catappa*

1. GIỚI THIỆU

Cá cảnh là một trong những đối tượng nuôi thủy sản được ưa chuộng do đa dạng chủng loại và giá trị thẩm mỹ. Tuy nhiên, chúng thường dễ bị stress bởi những biến động về nhiệt độ, chất lượng nước, mật độ nuôi cao,... dẫn đến suy giảm miễn dịch, tăng nguy cơ nhiễm bệnh và tử vong (Phan & Vu, 2010; Nguyen et al., 2022;). Để hạn chế tổn thất, người nuôi thường sử dụng hóa chất và kháng sinh trong phòng trị bệnh, song lạm dụng kháng sinh có thể gây hại cho sức khỏe cá và môi trường thủy vực (Nguyen et al., 2023).

Vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* được chọn vì đây là một trong những tác nhân gây bệnh phổ biến và nguy hiểm nhất trong nuôi trồng thủy sản, đặc biệt ở cá cảnh, gây thiệt hại kinh tế lớn (Novita et al., 2020). Trong quá trình nuôi cá cảnh tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố (TP) Hồ Chí Minh, các triệu chứng lở loét trên cá được quan sát thấy, qua phân lập, chủng *E. ictaluri* (GenBank accession: PV478261) được xác định là tác nhân gây bệnh. Chủng này đã được so sánh với chủng chuẩn ATCC 33202 để xác nhận đặc tính, xác định được *E. ictaluri* là tác nhân gây bệnh. Do đó, nghiên cứu này có ý nghĩa khoa học và ứng dụng thực tiễn cao.

Gần đây, xu hướng sử dụng các chế phẩm có nguồn gốc tự nhiên, nhất là thảo dược, nhận được nhiều quan tâm nhằm hướng đến nuôi trồng thủy sản bền vững. Trong số đó, lá bàng (*T. catappa*) và lá sen (*N. nucifera*) là những nguồn dược liệu phổ biến ở Việt Nam, chứa nhiều hoạt chất như tannin, flavonoid, alkaloid, phenolic,... có khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm (Dang et al., 2022; Nguyen et al., 2023). Tuy nhiên, những nghiên cứu chi tiết về hiệu quả của hai loại thảo dược này trong việc giảm stress oxy hóa và ức chế vi khuẩn trên cá cảnh còn hạn chế.

Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả của cao chiết lá bàng và lá sen trong giảm stress oxy hóa và tăng cường khả năng đề kháng với vi khuẩn *E. ictaluri* ở ba loài cá cảnh phổ biến (cá ngựa vằn, cá cầu vồng, cá cánh bướm). Kết quả thu được là cơ sở phát triển các sản phẩm thảo dược an toàn, thay thế hoặc bổ sung cho hóa chất, kháng sinh trong nuôi cá cảnh, góp phần xây dựng mô hình nuôi trồng thủy sản bền vững tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu thực vật

Lá bàng (*T. catappa*) được thu hái tại khu vực Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, Việt Nam vào tháng 7 năm 2023. Lá sen (*N. nucifera*) được thu mua tại Công ty TNHH TM & DV Thanh Bình, 119/24, Bùi Quang Là, Phường 12, Quận Gò Vấp, TP Hồ Chí Minh. Nguyên liệu được làm sạch, phơi khô râm mát, nghiền thành bột.

Chủng vi khuẩn gây bệnh

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (GenBank accession: PV478261) được phân lập từ cá ngựa vằn bị lở loét tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh. Trình tự gen của chủng này đã được xác định và đăng ký tại GenBank. Chủng vi khuẩn này đã được so sánh với chủng chuẩn ATCC 33202 (GA 77-52 [CDC 1976-78, DSM 13697]) để xác nhận đặc tính.

Đối tượng cá nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện trên ba loài cá cảnh phổ biến 3,5 ngày tuổi (dpf) gồm: cá ngựa vằn – 0,5 mg/con (*Danio rerio*), cá cầu vồng 01 tháng tuổi – 60 mg/con (*Melanotaeniidae*) và cá cánh bướm trưởng thành – 2,8 g/con (*Gymnocorymbus ternetzi*). Các cá thể sử dụng trong nghiên cứu được lựa chọn dựa trên các tiêu chí khỏe mạnh, không dị tật và bệnh lý, được nuôi dưỡng tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết xuất cao thảo dược

Phương pháp chiết xuất dựa theo Vongsak et al. (2013) với điều chỉnh nhỏ. Cụ thể, 25 g bột lá bàng hoặc lá sen ngâm trong 1 L ethanol 70% ở nhiệt độ phòng (~28°C) trong 72 giờ, khuấy 2–3 lần/ngày. Dung dịch sau đó được lọc qua giấy lọc (kích thước lỗ 2,5 µm), cô quay chân không (Buchi R-300), sấy khô, bảo quản ở 4°C.

2.2.2. Xác định nồng độ an toàn (NDAT)

Dải nồng độ 75 – 1000 µg/mL (tùy loài cá) được tiến hành khảo sát. Mỗi nghiệm thức gồm 10 cá, lặp lại 3 lần. Tỷ lệ sống (TLS) được ghi nhận mỗi 12 giờ trong vòng 72 giờ. Nồng độ an toàn là nồng độ cao nhất cho TLS = 100% sau 72 giờ (Nguyen et al., 2024).

2.2.3. Khảo sát tỉ lệ phối trộn lá bàng : lá sen

Sau khi xác định NDAT riêng lẻ, lá bàng và lá sen được tiến hành phối trộn theo ba tỉ lệ: 25 LB : 75 LS, 50 LB : 50 LS, 75 LB : 25 LS. Cách bố trí thí nghiệm và theo dõi TLS tương tự như trên. Tỉ lệ phối trộn có TLS cao nhất được chọn để khảo sát tiếp.

2.2.4. Đánh giá khả năng kháng stress oxy hóa

Cá được xử lý trước với cao chiết thảo dược trong 12 giờ, sau đó rút hết toàn bộ cao chiết ra và phơi nhiễm với H_2O_2 ở hai nồng độ 0,5 mM (mức stress nhẹ) và 1,5 mM (mức stress mạnh). Đây là các nồng độ tham chiếu từ các nghiên cứu trước (Novita et al., 2020). Thí nghiệm có đối chứng âm (chỉ cảm ứng H_2O_2 , không thảo dược) và đối chứng dương (không cảm ứng). TLS được ghi nhận mỗi 12 giờ, kéo dài 48 giờ, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

2.2.5. Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *E. ictaluri*

Cá được tiến hành cảm nhiễm với *E. ictaluri* mật độ 2×10^8 CFU/mL (xác định bằng đo mật độ quang OD₆₀₀ và quy đổi về CFU/mL) theo Novita et al. (2020). Cá được xử lý trước bằng cao chiết thảo dược hoặc không (đối chứng). Tỷ lệ sống được theo dõi liên tục 10 ngày, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

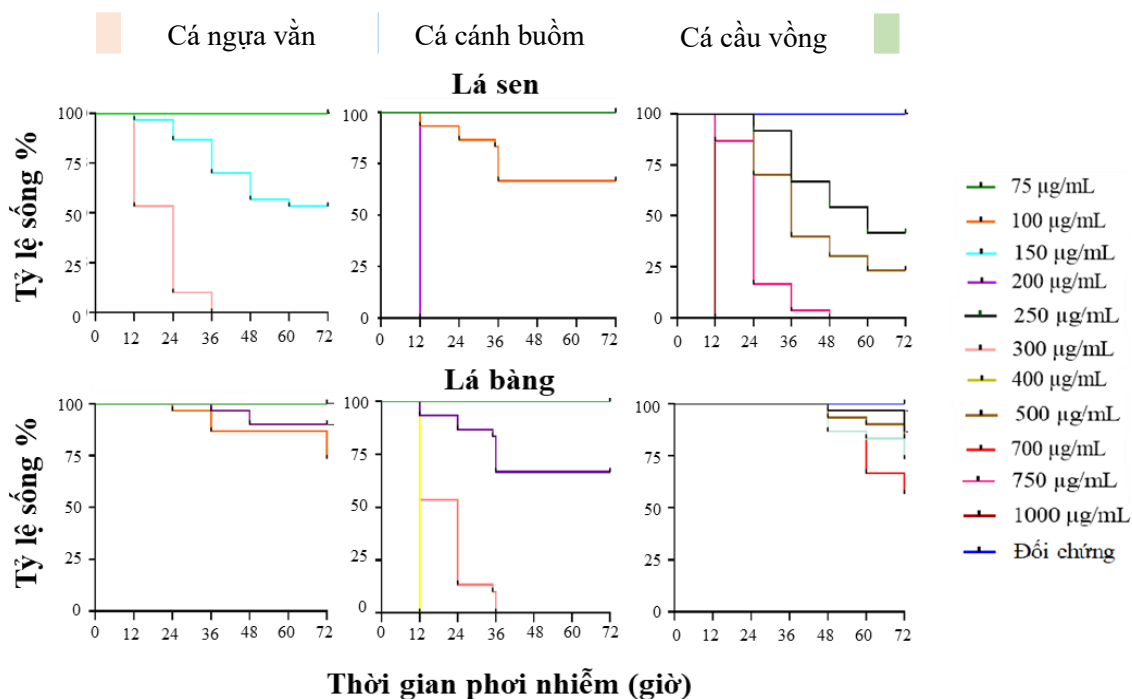
2.2.6. Phân tích số liệu thống kê

Kết quả được biểu diễn dưới dạng biểu đồ Kaplan–Meier, kiểm định Log-rank test với $P < 0,05$ được xem là khác biệt có ý nghĩa. Phần mềm xử lý thống kê: GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, USA).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nồng độ an toàn (NĐAT) của cao chiết lá bàng và lá sen

Kết quả xác định NĐAT cho thấy, đối với cao chiết LB, nồng độ an toàn trên cá ngựa vằn 3,5 ngày tuổi là 100 $\mu\text{g/mL}$, trên cá cầu vồng 1 tháng tuổi là ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$, còn trên cá cánh bướm trưởng thành là ≤ 400 $\mu\text{g/mL}$. Đối với LS, NĐAT trên cá ngựa vằn là ≤ 75 $\mu\text{g/mL}$, cá cầu vồng 1 tháng tuổi ≤ 200 $\mu\text{g/mL}$ và cá cánh bướm trưởng thành ≤ 75 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả này tương đồng với kết quả của Nguyen et al. (2020) cho thấy việc xác định chính xác NĐAT rất quan trọng để đảm bảo hiệu quả và an toàn khi ứng dụng trên cá cảnh.

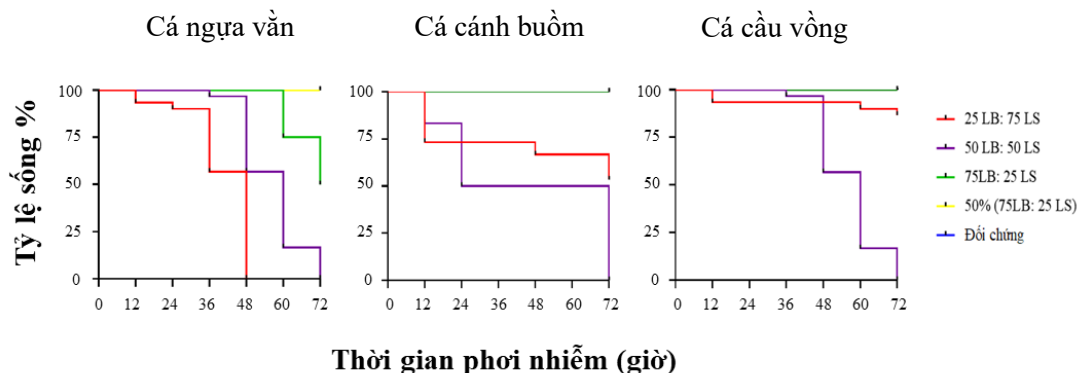


Hình 1. Tỷ lệ sống của cá ngựa vằn, cá cầu vồng và cá cánh bướm khi tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của cao chiết lá bàng và lá sen

3.2. Khảo sát tỉ lệ an toàn khi phối trộn lá bàng và lá sen

Ở các tỉ lệ phối trộn 25 LB : 75 LS, 50 LB : 50 LS, 75 LB : 25 LS, kết quả cho thấy tỉ lệ 75 LB : 25 LS cho TLS cao nhất (100% trên cá cánh bướm, cá

cầu vồng; 93,34% trên cá ngựa vằn 3,5 ngày tuổi). Kết quả này có thể nhờ tương tác hiệp đồng giữa các hoạt chất trong lá bàng và lá sen, giúp gia tăng hiệu quả và giảm độc tính (Nguyen et al., 2023). Do đó, tỉ lệ 75 LB : 25 LS được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



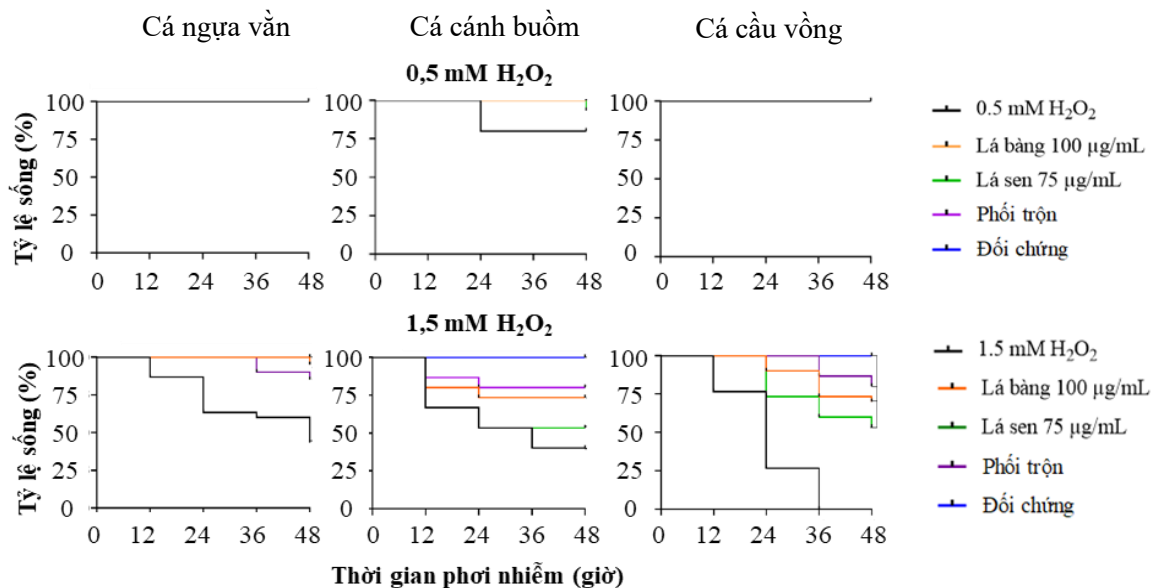
Hình 2. Tỷ lệ sống của cá tiếp xúc với các tỷ lệ phối trộn khác nhau giữa cao chiết lá bàng và lá sen

3.3. Khả năng kháng stress oxy hóa

Khi cảm ứng cá với H_2O_2 , tất cả nghiệm thức (LB, LS và phối trộn 75 LB : 25 LS) đều cho TLS = 100% ở nồng độ 0,5 mM (mức stress nhẹ). Với H_2O_2 1,5 mM (mức stress cao hơn), hỗn hợp phối trộn (75 LB : 25 LS) cho TLS trên 80% ở cả ba loài cá, trong khi dùng riêng lẻ cho tỷ lệ sống thấp hơn.

Kết quả này cho thấy việc phối trộn lá bàng và lá sen có thể mang lại hiệu quả bảo vệ tế bào tốt hơn so với dùng đơn lẻ từng loại. Tuy chưa có phân tích

cụ thể về thành phần phytochemical để khẳng định cơ chế hiệp đồng giữa các nhóm chất như: tannin, flavonoid, phenolic hay alkaloid trong hỗn hợp (Chyau et al., 2006), song hiệu quả quan sát được cho thấy sự hỗ trợ chức năng sinh học tiềm năng giữa hai loại cao chiết. Điều này cần được làm rõ hơn trong các nghiên cứu tiếp theo thông qua phân tích định tính – định lượng các hợp chất hoạt tính sinh học chính và các cơ chế tác động ở cấp độ tế bào.

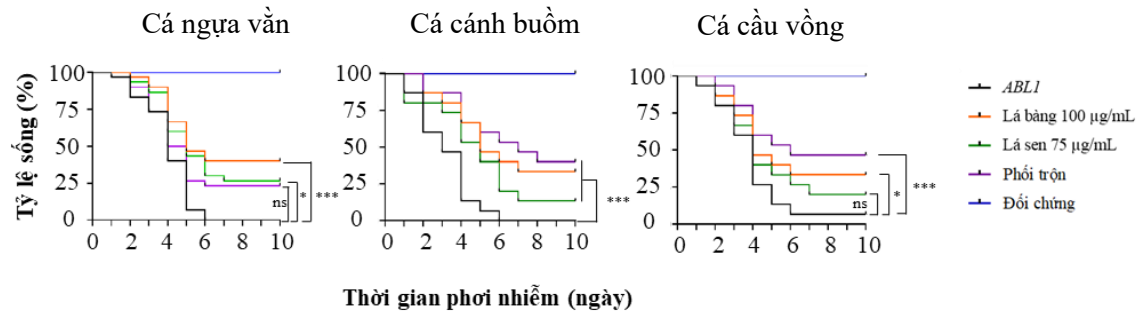


Hình 3. Tỷ lệ sống của cá sau khi xử lý bằng cao chiết thảo dược và cảm ứng stress oxy hóa với H_2O_2

3.4. Khả năng kháng vi khuẩn *E. ictaluri*

Trong thí nghiệm cảm nhiễm với *E. ictaluri* (GenBank accession: PV478261), tỉ lệ phối trộn 75 LB : 25 LS đạt TLS 46,72% trên cá ngựa vằn, 40,72% trên cá cầu vồng và 40,06% trên cá cánh bướm sau 10 ngày. Hiệu quả cao này nhiều khả năng

xuất phát từ tác dụng hiệp lực của các hợp chất kháng khuẩn trong lá bàng và lá sen (Novita et al., 2020). Kết quả cho thấy tiềm năng của hỗn hợp cao chiết này để thay thế kháng sinh nhằm giảm thiểu rủi ro môi trường và thúc đẩy nuôi trồng thủy sản cảnh bền vững (Nguyen et al., 2023).



Hình 4. Tỷ lệ sống của cá sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* (ABLI) và được xử lý bằng cao chiết thảo dược.

3.5. Hàm lượng phenolic và flavonoid

Kết quả định lượng cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về hàm lượng phenolic và flavonoid tổng giữa các mẫu cao chiết riêng lẻ và hỗn hợp. Cụ thể: Hàm lượng phenolic tổng cao nhất được ghi nhận ở cao chiết lá sen (LS) với giá trị $756,79 \pm 8,56$ mg GAE/g, tiếp theo là hỗn hợp 75% lá bàng : 25% lá sen (75 LB : 25 LS) với $458,34 \pm 25,34$ mg GAE/g và thấp nhất ở lá bàng (LB) với $319,66 \pm 46,14$ mg GAE/g. Hàm lượng flavonoid tổng cũng ghi nhận xu hướng tương tự, với LS đạt $485,03 \pm 14,01$ mg QE/g, hỗn hợp 75 LB : 25 LS là $332,41 \pm 19,21$ mg QE/g và LB là $256,94 \pm 3,84$ mg QE/g (Bảng 1).

Kết quả trên cho thấy cao chiết lá sen có hàm lượng hợp chất sinh học chống oxy hóa vượt trội so

với lá bàng. Đáng chú ý, hỗn hợp hai loại cao chiết theo tỉ lệ 75:25 đã cải thiện đáng kể hàm lượng phenolic và flavonoid so với cao chiết lá bàng đơn lẻ, dù không đạt mức của lá sen nguyên chất. Điều này phản ánh hiệu ứng hiệp đồng giữa các thành phần hoạt tính sinh học trong hai loại lá khi kết hợp, từ đó góp phần giải thích hiệu quả vượt trội của hỗn hợp trong các thí nghiệm *in vivo* về khả năng chống stress oxy hóa và tăng cường sức đề kháng với vi khuẩn. Việc phối trộn hợp lý giữa các nguồn dược liệu có hoạt tính sinh học khác nhau không chỉ giúp nâng cao hiệu quả mà còn có thể tối ưu hóa chi phí và giảm thiểu nguy cơ gây độc, là hướng đi tiềm năng trong phát triển các sản phẩm thay thế kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản cảnh.

Bảng 1. Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng trong các mẫu cao chiết

Mẫu cao chiết	Hàm lượng phenolic tổng (mg GAE/g)	Hàm lượng flavonoid tổng (mg QE/g)
Lá bàng (LB)	$319,66 \pm 46,14$	$256,94 \pm 3,84$
Lá sen (LS)	$756,79 \pm 8,56$	$485,03 \pm 14,01$
75% LB : 25% LS (Hỗn hợp)	$458,34 \pm 25,34$	$332,41 \pm 19,21$

4. KẾT LUẬN

Nồng độ an toàn (NĐAT) của lá bàng và lá sen được xác định trong nghiên cứu lần lượt là 100 µg/mL và 75 µg/mL trên ba loài cá cảnh (cá ngựa vằn, cá cầu vồng, cá cánh bướm). Đồng thời, hỗn hợp phối trộn lá bàng : lá sen ở tỉ lệ 75 : 25 cho hiệu quả cao trong kháng stress oxy hóa (TLS >80%) và kháng vi khuẩn *E. ictaluri* (TLS >40%). Kết quả này gợi ý tiềm năng áp dụng hỗn hợp lá bàng và lá sen trong nuôi cá cảnh để ứng dụng hỗ trợ một phần để giảm bớt việc sử dụng hóa chất và kháng sinh, góp

phần phát triển mô hình nuôi thủy sản cảnh an toàn, bền vững.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả cảm ơn sự hỗ trợ của Nguyễn Hoàng Thụy Vy và Trương Thị Thủy Hằng. Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài nghiên cứu khoa học sinh viên của Đại học Văn Hiến (mã số SH2024-031) và Nghiệp vụ thường xuyên của Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh (mã số TSTX01/2024).

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Chyau, C. C., Ko, P. T., & Mau, J. L. (2006). Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. *LWT – Food Science and Technology*, 39(10), 1099–1108. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2005.07.016>
- Dang, Q. T., Duong, T. B. N., Tra, T. K. T., Nguyen, T. S., Huynh, H. A. T., Pham, D. V., & Do, C. M. V. T. (2022). Establishing a standardized extraction process to control nuciferin content from lotus leaves (*Nelumbo nucifera Gaertn*) collected in Dong Thap Province. *Vietnam Medical Journal*, 520(1A). (in Vietnamese). <https://doi.org/10.51298/VMJ.V520I1.3753>
- Nguyen, V. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, Phi. P., Duong, Que. N., Luu, H. T., Le, H. L. P., Ngo, T. h. P., Tong, N. X., Pham, L. T., Nguyen. V. H. T., & Dinh, T. T., (2022). Keap1/Nrf2-independent antioxidative activity of *Phyllanthus amarus* extract in zebrafish. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20(4), 653–661. <https://doi.org/10.15625/1811-4989/17475>
- Nguyen, V. T., Vo, T. T. M., Le, H. L. P., P., Thi, R. H., Ngo, T. H. P., Tong, N. N., Pham, L. T., & Dinh, T. T. (2024). Exploring the Phytochemical Diversity and Antioxidant Potential of the Vietnamese *Smilax glabra* Roxb: Insights from UPLC-QTOF-MS/MS and Zebrafish Model Studies. *Appl Biochem Biotechnol* 196, 7307–7324. <https://doi.org/10.1007/s12010-024-04930-6>
- Novita, H., Novitaningrum, A. D., Madusari, B. D., Nugraha, M. F. I., Rajamuddin, M. A., Yunita, R., Enggarini, W., & Reflinur. (2020). Antibacterial activity of *Anadendrum microstachyum* and *Selaginella plana* against two pathogenic bacteria (*Edwardsiella ictaluri* and *Streptococcus agalactiae*) causing freshwater fish diseases. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 535(1), 012025. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/535/1/012025>
- Phan, D. T., & Vu, C. L. (2010). Some technical parameters for broodstock, nursery, and farming of major ornamental fish species in Ho Chi Minh City. In *Proceedings of the Workshop “The Role of Ornamental Fish in Ho Chi Minh City”* (pp. 235–240). (in Vietnamese).
- Nguyen, T. H., Doan, H. T. T., & Tran, N. V. (2023). Biological products from *Terminalia catappa* leaves as antibiotic substitutes in aquaculture. Retrieved from (in Vietnamese). <https://vjst.vn/vn/tin-tuc/7776/che-pham-sinh-hoc-tu-la-bang-thay-the-khang-sinh-trong-nuoi-thuy-san.aspx>
- Vongsak, B., Sithisarn, P., & Gritsanapan, W. (2013). Bioactive contents and free radical scavenging activity of *Moringa oleifera* leaf extract under different storage conditions. *Industrial Crops and Products*, 49, 419–421. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.05.018>