



XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN NHANH CÂY ĐÌNH LĂNG CÓ HÀM LƯỢNG SAPONIN CAO BẰNG PHƯƠNG PHÁP *in vitro*

Phạm Thị Thị, Đoàn Thị Quỳnh Hương, Dương Ngọc Kiều Thi, Phạm Văn Thắng và Nguyễn Thoại Ân

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao

Thông tin chung:

Ngày nhận: 14/09/2015

Ngày chấp nhận: 25/07/2016

Title:

Protocol establishment for *in vitro* propagation of high saponin containing *Polyscias* spp.

Từ khóa:

Oleanolic acid, đỉnh lăng *in vitro*, HPLC, *Polyscias fruticosa* (L.), Saponin, tái sinh chồi, tăng sinh chồi

Keywords:

Oleanolic acid, HPLC, micropropagation, *Polyscias fruticosa* (L.), saponin, shoot proliferation, shoot regenerations

ABSTRACT

Polyscias spp. is a plant which contains the saponin compounds used in traditional medicine. Saponin compounds used as anti-oxidant, anti-stress substances and treatment of depressive symptoms. Because of limit of saponin materials, micropropagation of *Polyscias* spp. (high saponin content) is necessary to supply stably a large amount of plantlets. Results showed that *Polyscias fruticosa* L. containing high contents of triterpen saponins and oleanolic acid (77.17 g/g) was used as the experimental material sources for micropropagation. The best medium for shoot regeneration was MS + 2 mg/l BAP + 10g/l agar + 30 g/l sucrose. The most appropriate medium for shoot proliferation was MS + 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l IBA + 10 g/l agar + 30 g/l sucrose. The appropriate medium for growth of shoots was MS + 1 mg/l NAA + 10 g/l agar + 30 g/l sucrose. Plantlets (4 ÷ 5 cm in height, 2 ÷ 3 roots, 2 ÷ 3 cm in root length) were grown in nursery conditions. After 4 weeks, the growth of plantlets was good in the natural environment with survival rate of 90% and the presence of oleanolic acid in *in vitro* *Polyscias* spp.

TÓM TẮT

Đình lăng (*Polyscias* spp.) là cây trồng chứa saponin thường sử dụng trong y học cổ truyền. Hợp chất saponin trong cây có tác dụng chống oxy hóa, chống stress và các triệu chứng trầm cảm. Do nguồn nguyên liệu còn khá hạn chế nên nhân giống cây Đình lăng (có hàm lượng saponin cao) bằng phương pháp *in vitro* nhằm cung cấp nguồn cây giống phong phú và ổn định. Kết quả cho thấy, trong cây Đình lăng lá nhỏ (*P. fruticosa* (L.)) có sự hiện diện của saponin triterpen và hàm lượng oleanolic acid trung bình đạt 77,17 µg/g đã được sử dụng làm nguồn nguyên liệu ban đầu. Môi trường tái sinh chồi tốt nhất là MS + 2 mg/l BAP + 10 g/l Agar + 30 g/l đường sucrose. Môi trường tăng sinh chồi tốt nhất là MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA + 10 g/l Agar + 30 g/l đường sucrose. Sự phát triển chồi thành cây hoàn chỉnh thích hợp trên môi trường MS + 1 mg/l NAA + 10 g/l Agar + 30 g/l đường sucrose. Sau khi cây đủ tiêu chuẩn (chiều cao 4 ÷ 5 cm, số rễ 2 ÷ 3 rễ, chiều dài rễ đạt 2 ÷ 3 cm) được trồng trong điều kiện vườn ươm, theo dõi sau 4 tuần, cây có khả năng thích ứng tốt với điều kiện môi trường tự nhiên, có tỷ lệ sống trên 90% và có sự hiện diện của oleanolic acid trong cây Đình lăng *in vitro*.

Trích dẫn: Phạm Thị Thị, Đoàn Thị Quỳnh Hương, Dương Ngọc Kiều Thi, Phạm Văn Thắng và Nguyễn Thoại Ân, 2016. Xây dựng quy trình nhân nhanh cây đình lăng có hàm lượng saponin cao bằng phương pháp *in vitro*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 44b: 104-112.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Đình lăng là loại cây đã được con người trồng trọt và sử dụng từ rất lâu đời. Ở Việt Nam và nhiều nước trên thế giới, đình lăng được sử dụng làm gia vị của một số món ăn. Ngoài việc được sử dụng trong thực phẩm, đình lăng còn được sử dụng như một vị thuốc trong y học cổ truyền. Trong đình lăng có 2 hợp chất chính và quan trọng là polyacetylen và saponin (Vo *et al.*, 1998; Chaboud *et al.*, 1995). Hợp chất saponin, đặc biệt là triterpen có tác dụng tích cực chống oxy hóa, chống stress và các triệu chứng trầm cảm (Lutowski *et al.*, 1992; Bensita *et al.*, 1998). Hợp chất polyacetylen có vai trò chống ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn và kháng nấm (Lutowski *et al.*, 1992). Trong đó, hai hợp chất polyacetylen panaxynol và hepadeca 1,8 (e) - dien - 4,6 diyn - 3,10 diol trong cây đình lăng cũng có chủ yếu trong nhân sâm, điều này cho thấy có khả năng sử dụng đình lăng để thay thế cho nhân sâm. Hiện nay, nhu cầu về hợp chất này ở dược phẩm đang tăng cao. Trong khi đó, một trong các nguyên nhân khiến cho các chế phẩm chứa Đình lăng còn khá ít trên thị trường là do nguồn nguyên liệu còn khá hạn chế, nguồn cung cấp cây giống chủ yếu là giâm cành, chất lượng cây giống lại không cao, nếu trồng theo phương pháp tự nhiên thì mất 3 - 5 năm mới thu hoạch rễ và hàm lượng saponin triterpen tự nhiên trong cây không đủ đáp ứng nhu cầu về dược liệu. Việc đáp ứng nhanh và bền vững nguồn cây giống có chất lượng tốt đang là yêu cầu cấp bách.

Mục tiêu của nghiên cứu:

- Phục vụ cho việc cung cấp nguồn cây giống Đình lăng phong phú và ổn định.
- Ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô trên đối tượng cây Đình lăng, một trong những cây dược liệu có giá trị kinh tế cao. Xây dựng quy trình nhân nhanh cây Đình lăng có hàm lượng saponin cao bằng phương pháp *in vitro* cho hệ số nhân chồi cao, chất lượng cây con tốt, là tiền đề cho những nghiên cứu sâu hơn trên cây Đình lăng và một số cây dược liệu khác.
- Có thể ứng dụng nhân nhanh cây Đình lăng để sản xuất đại trà và sử dụng cây Đình lăng *in vitro* để làm nguồn cung cấp dược liệu ban đầu.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Giống Đình lăng, mẫu lá Đình lăng ngoài đồng 3 năm tuổi của các giống Đình lăng tại khu vực Xã Phạm Văn Cội, huyện Cù Chi, Tp. HCM.

Cây Đình lăng thuộc bộ Apiales, họ: Araliaceae, chi: Polyscias, loài gồm có:

- Đình lăng lá nhỏ *Polyscias fruticosa* (L.) Harms
- Đình lăng lá tròn *Polyscias balfouriana* Baill
- Đình lăng đĩa *Polyscias scutellarius* (Burm f) Merr
- Đình lăng răng *Polyscias serrata* Balf
- Đình lăng trổ còn gọi là Đình lăng viền bạc *Polyscias guilfoylei* (Cogn Marche) Baill
- Đình lăng lá to còn gọi là Đình lăng ráng *Polyscias filicifolia* (Merr) Baill

Đình lăng lá nhỏ có hai loại chính: Đình lăng nếp (lá nhỏ, xoắn, thân nhẵn, củ to, rễ nhiều và mềm, vỏ bì dày cho năng suất cao và chất lượng tốt) và Đình lăng tẻ (lá xẻ thùy to, vỏ thân xù xì, màu xanh nhạt, củ nhỏ, rễ ít và cứng, vỏ bì mỏng, năng suất thấp).

Môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962), Benzyl Amino Purine (BAP) (Sigma Aldrich), Indo Butyric Acid (IBA) (Sigma Aldrich), Naphthalen Acetic Acid (NAA) (Sigma Aldrich), agar (Việt Nam), đường (Việt Nam), cồn 70% (Việt Nam), HgCl₂ 0,1% (Sigma Aldrich)

Tủ cấy và nồi hấp vô trùng (Shinseng), đèn cồn, đĩa, dao và kẹp cây.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Khảo sát hàm lượng saponin của cây giống ban đầu

Mẫu lá được chọn đồng nhất trên cùng 1 giống và có đánh số thứ tự các cây lấy mẫu. Sau khi lấy mẫu, đem rửa sạch, cắt nhỏ, phơi khô cho ráo nước và đem sấy khô ở nhiệt độ 40°C (mẫu không mất hoạt tính) cho đến khi trọng lượng không đổi. Cho mẫu vào máy nghiền ở ray nhỏ đường kính 0,1 mm, trộn đều các mẫu cho đồng nhất. Bột được bảo quản trong hộp kín, tránh bị ẩm mốc để tiến hành các nghiên cứu. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), một yếu tố, với 5 nghiệm thức, chọn ngẫu nhiên 3 cây trong 20 cây mẫu. Sau khi thu mẫu, định tính xác định saponin bằng phản ứng tạo bọt để xác định sự có mặt của saponin. Từ kết quả thu được, sau đó dùng phản ứng (Liebermann - Burchard) tạo màu để xác định nhóm saponin trong mẫu. Và định lượng hàm lượng saponin bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) tại phòng thí nghiệm Trường Đại học Khoa học Tự

nhiên- TP.HCM. Xác định sự có mặt của saponin trong cây in vitro. Xác định saponin nhóm triterpen hay steroid. Định lượng hàm lượng oleanolic acid trong saponin.

Hòa tan một lượng cần tương ứng với 1 g dược liệu vào 5 ml nước nóng. Lọc vào một ống nghiệm 1,6 cm x1,6 cm và để nguội, thêm nước cho vừa đủ 10 ml, dùng ngón tay cái bịt miệng ống nghiệm và lắc mạnh, dứt khoát theo chiều dọc ống nghiệm trong 1 phút (= 30 lần lắc). Để yên ống nghiệm, quan sát lớp bọt và đánh giá kết quả dựa vào Bảng 1.

Bảng 1: Độ bền của lớp bọt

Độ bền của lớp bọt (phút)	Kí hiệu
15	+
30	++
60	+++

2.2.2 Nhân nhanh in vitro

– Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BAP lên sự tái sinh chồi Đinh lăng

Chọn những mẫu đồng nhất ở khu vực vườn ươm cây giống thí nghiệm rửa sạch dưới vòi nước máy trong 30 phút để loại bỏ cát và bụi còn bám trên mẫu, rồi dùng nước rửa chén pha loãng 1% chà sạch phần thân bị hóa nâu và rửa lại bằng nước sạch. Sau đó, lắc mẫu trong nước rửa chén 1% trong 30 phút và rửa sạch với nước cất. Đem mẫu vào tủ cây lau cồn 70⁰ và rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Sau đó ngâm mẫu trong HgCl₂ 0,1% và lắc mẫu trong 5 phút. Rửa mẫu bằng nước cất vô trùng. Rồi cấy mẫu vào bình chứa môi trường có bổ sung BAP với các nồng độ từ 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2; 2,5 và 3 mg/l. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (Complete Randomized Desigh, CRD), với 7 nghiệm thức (NT). Cây 3 mẫu/bình tam giác, 3 bình tam giác /NT và lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu theo dõi là số chồi tái sinh (chồi/cụm), chiều cao chồi (cm), trọng lượng chồi (g) sau 8 tuần nuôi cấy.

– Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IBA lên sự tăng trưởng chồi

Mẫu chồi tái sinh sau khi thực hiện xong thí nghiệm 1, chọn ra những mẫu đồng nhất có kích thước 2 cm được sử dụng làm vật liệu ban đầu để bố trí thí nghiệm tiếp theo. Cây mẫu vào bình chứa môi trường có bổ sung nồng độ IBA ở các nồng độ (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 2,5 mg/l). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu CRD, với 6 NT. Cây 3 chồi/bình tam giác, 3 bình tam giác/NT và được lặp lại 3 lần.

Tiến hành lấy số liệu sau 8 tuần nuôi cấy: Chiều cao chồi (cm), số chồi, trọng lượng chồi (g).

– Khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin thích hợp lên sự tái sinh rễ

Mẫu sau khi thực hiện xong thí nghiệm 1, chọn ra những mẫu đồng nhất có kích thước 3 cm được sử dụng làm vật liệu ban đầu để bố trí thí nghiệm tiếp theo. Cây mẫu vào bình chứa môi trường có bổ sung loại và nồng độ auxin gồm NAA và IBA sử dụng đơn từ 0,5; 1; 2; 3; 4 và 5 mg/l. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu CRD, với 12 nghiệm thức. Cây 3 chồi/ bình tam giác, 3 bình tam giác /NT và được lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), số lá, chiều dài lá (cm), số rễ, chiều dài rễ (mm), trọng lượng rễ (g) sau 8 tuần nuôi cấy.

– Khảo sát tỷ lệ sống của cây Đinh lăng in vitro ở giai đoạn vườn ươm

Các cây con có đủ tiêu chuẩn như có chiều cao 4 ÷ 5 cm, có 3 lá trở lên, có 2 ÷ 3 rễ và chiều dài rễ đạt 2 ÷ 3 cm. Sau đó, huấn luyện ngoài tự nhiên khoảng 1 tuần, gập cây và rửa sạch agar bám xung quanh rễ, trồng trên giá thể đất trong nhà lưới có mái che. Trong tuần lễ đầu, phun sương nước cho cây con nhiều lần (2 ÷ 3 lần) trong ngày để giữ ẩm cho cây, tuần kế tiếp kết hợp phun vitamin B1 2 lần/tuần. Ở tuần tiếp theo sẽ sử dụng phân bón NPK 30 - 10 - 10, tiến hành phun 2 lần/tuần. Theo dõi tỉ lệ sống và sự phát triển của cây con trong vườn ươm sau 30 ngày nuôi cấy.

– Xác định hàm lượng saponin của cây Đinh lăng in vitro

Sau khi thu mẫu, định tính xác định saponin bằng phản ứng tạo bọt để xác định sự có mặt của saponin. Từ kết quả thu được, sau đó dùng phản ứng (Liebermann – Burchard) tạo màu để xác định nhóm saponin trong mẫu. Và định lượng hàm lượng saponin bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp. Xác định sự có mặt của saponin trong cây in vitro. Xác định saponin nhóm triterpen hay steroid. Định lượng hàm lượng oleanolic acid trong saponin.

2.3 Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm được thực hiện trong các điều kiện sau: chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2.000 lux, nhiệt độ phòng 26 ± 2⁰C; độ ẩm trung bình: 75 - 80%.

2.4 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng chương trình MSTATC.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khảo sát hàm lượng saponin của cây giống Đinh lăng ban đầu

Từ kết quả Bảng 2 cho thấy, sau khi định tính được chất của cây giống Đinh lăng ban đầu bằng

phản ứng tạo bọt thì giống Đinh lăng lá nhỏ có bọt bền nhất sau 60 phút, kết quả cũng trùng khớp với nghiên cứu của Bensita *et al.* (1998). Tiếp theo là giống Đinh lăng lá tròn và Đinh lăng lá trở có bọt bền trong 30 phút, giống Đinh lăng lá to và Đinh lăng lá đĩa có bọt bền thấp nhất trong 15 phút.

Bảng 2: Kết quả định tính và định lượng của hàm lượng saponin trong cây giống Đinh lăng ban đầu

Tên mẫu	Định tính		Định lượng
	Phản ứng tạo bọt (cm)	Phản ứng màu (cm)	HPLC - UV (µg/g)
Đinh lăng lá to (<i>Polyscias filicifolia</i> (Merr) Baill)	+	Xanh lá cây	14,43 ^d
Đinh lăng lá nhỏ (<i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms)	+++	Đỏ	77,17 ^a
Đinh lăng lá tròn (<i>Polyscias balfouriana</i> Baill)	++	Đỏ	67,33 ^b
Đinh lăng lá trở (<i>Polycias guilfoylei</i> (Cogn Marche) Baill)	++	Đỏ	64,0 ^c
Đinh lăng lá đĩa (<i>Polyscias scutellarius</i> (Burm f) Merr)	+	Xanh lá cây	80,40 ^a

CV (%) = 1,98; F_{tính} = 1480.70**

Ghi chú: +: bọt bền trong 15 phút; ++: bọt bền trong 30 phút; +++: bọt bền trong 60 phút; xanh lá cây: saponin steroid; đỏ: saponin triterpen

Sau khi xác định về sự hiện diện của hợp chất saponin có trong 5 giống Đinh lăng, kết quả định tính bằng phản ứng màu cho thấy, ở giống Đinh lăng lá to và Đinh lăng lá đĩa có màu xanh lá cây nên sơ bộ kết luận được liệu có saponin steroid. Ba giống Đinh lăng còn lại gồm: Đinh lăng lá nhỏ, Đinh lăng lá tròn, Đinh lăng lá trở có màu đỏ nên sơ bộ kết luận có saponin triterpen. Kết quả cũng trùng khớp với nghiên cứu của Bensita *et al.* (1998), qua kiểm tra định lượng từ dược chất của mẫu lá và rễ Đinh lăng lá nhỏ kết luận có sự hiện diện của saponin triterpen.

Kết quả định lượng bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp cho thấy, giống Đinh lăng lá đĩa có hàm lượng oleanolic acid cao nhất đạt 80,40 µg/g không có sự khác biệt thống kê so với giống Đinh lăng lá nhỏ đạt 77,17 µg/g, nhưng có sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Giống Đinh lăng lá to có hàm lượng oleanolic acid thấp nhất đạt 14,43 µg/g.

Như vậy, qua các kết quả thu được chọn giống Đinh lăng lá nhỏ làm nguồn vật liệu ban đầu để khảo sát các thí nghiệm tiếp theo. Vì giống Đinh lăng lá nhỏ trồng phổ biến ở khu vực Cù Chi và

thành phố Hồ Chí Minh để thu hái lá tươi bán thành phẩm lúc cây có rễ còn nhỏ.

3.2 Nhân nhanh *in vitro*

– Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BAP lên sự tái sinh chồi Đinh lăng

– Theo kết quả Bảng 3, trên môi trường MS có bổ sung nồng độ BAP tăng dần từ 1,2 mg/l; 1,4 mg/l; 1,6 mg/l và 1,8 mg/l thì số chồi, chiều cao chồi và trọng lượng chồi cũng tăng theo nồng độ BAP.

– Môi trường MS có bổ sung 2 mg/l có ảnh hưởng sự tái sinh chồi Đinh lăng rõ rệt nhất cho sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê, từ một đốt thân ban đầu sau 8 tuần nuôi cấy thì chồi bắt đầu đâm úng và tăng lên 2,8 chồi, trọng lượng chồi đạt 6,10 g, chồi có màu sắc xanh tốt. Trong môi trường này, chồi cao hơn và đồng đều hơn so với các nghiệm thức còn lại. Ngoài ra, theo ghi nhận cho thấy thời gian (không có trong bảng kết quả) tái sinh chồi ở nghiệm thức này là nhanh nhất. Kết quả cũng trùng khớp với nghiên cứu của Trần Thị Liên và *ctv.* (2005), cây Đinh lăng trên môi trường khoáng MS + 2 mg/l BAP + 20 g/l đường sinh trưởng mạnh.

Bảng 3: Ảnh hưởng của nồng độ BAP lên sự tái sinh chồi Đinh lăng

Nghiệm thức	BAP (mg/l)	Số chồi	Chiều cao chồi (cm)	Trọng lượng chồi (g)
B1	1,2	1,13 ^d	3,35 ^{bc}	2,73 ^d
B2	1,4	1,33 ^{cd}	4,63 ^{ab}	3,98 ^c
B3	1,6	1,60 ^c	5,33^a	4,84 ^b
B4	1,8	2,20 ^b	5,80^a	5,05 ^b
B5	2	2,80^a	5,95^a	6,10^a
B6	2,5	1,20 ^d	3,60 ^{bc}	3,99 ^c
B7	3	0,67 ^c	2,73 ^c	0,83 ^c
F _{tính}		54,42**	13,56**	2,28*
CV (%)		10,82	13,37	15,36

Ghi chú: **: sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức 0,01; *: sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05. Trong cùng 1 cột các số có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê

– Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IBA lên sự tăng trưởng chồi Đinh lăng

Qua kết quả thí nghiệm ghi nhận được khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IBA cho số chồi cao nhất đạt 2,27 chồi có màu xanh non, sinh trưởng khỏe và có sự hình thành rễ tốt. Nghiệm thức I1 (đôi chứng) không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng IBA có số chồi thấp nhất đạt

1 chồi. Và số chồi tăng dần khi nghiệm thức I2 có bổ sung 0,1 mg/l IBA cho số chồi đạt 1,8 chồi. Số chồi càng giảm khi tăng nồng độ IBA lên cao. Ở nghiệm thức có bổ sung 2,5 mg/l IBA cho số chồi thấp, trạng thái chồi kém, lá có màu vàng, đoạn thân có màu nâu. Nguyên nhân do hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng cao gây ức chế khả năng phát triển chồi của cây Đinh lăng in vitro.

Bảng 4: Ảnh hưởng của nồng độ IBA lên sự tăng trưởng chồi Đinh lăng

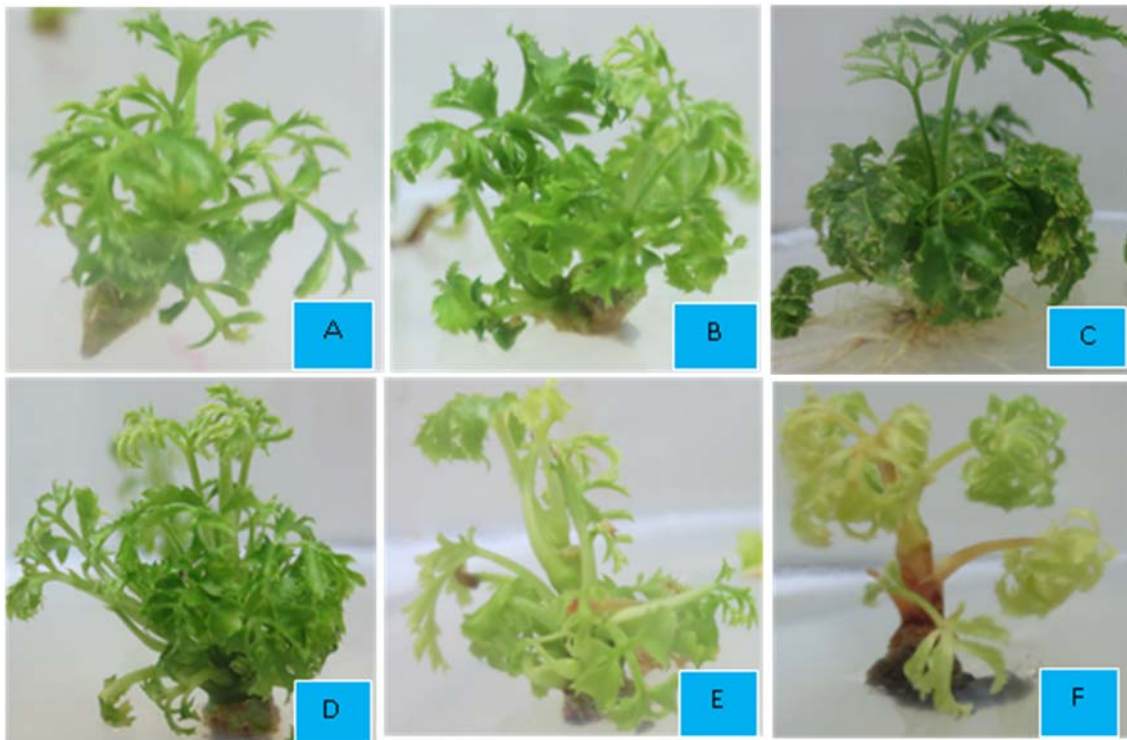
Nghiệm thức	IBA (mg/l)	Số chồi	Chiều cao chồi (cm)	Trọng lượng chồi (g)
I1 (Đ/C)	0	1,00 ^b	1,17 ^d	1,78 ^b
I2	0,1	1,80 ^{ab}	3,10 ^{ab}	4,37 ^{ab}
I3	0,5	2,27^a	3,23^a	6,27^a
I4	1,0	1,50 ^{ab}	2,80 ^{ab}	4,07 ^{ab}
I5	2	1,47 ^{ab}	2,17 ^{bc}	2,14 ^b
I6	2,5	1,27 ^b	1,60 ^{cd}	1,84 ^b
F _{tính}		3,59 *	12,26 **	6,74 **
CV (%)		25,94	17,76	35,26

Ghi chú: **: sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức 0,01; *: sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05. Trong cùng 1 cột các số có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê

Về chiều cao chồi, ở nghiệm thức I3 có bổ sung 0,5 mg/l IBA cao nhất đạt 3,23 cm. Nghiệm thức I1 đôi chứng có chiều cao chồi thấp nhất đạt 1,17 cm. Ở nghiệm thức 2 có bổ sung 0,1 mg/l IBA lên thì chiều cao chồi đạt 3,10 cm, nhưng khi tăng nồng độ IBA cao quá thì không thích hợp cho cây phát triển nên chiều cao cây ở các nghiệm thức I4, nghiệm thức I5 và nghiệm thức I6 với các nồng độ IBA bổ sung vào là 1 mg/l; 2 mg/l và 2,5 mg/l phát

triển thấp hơn tương ứng chiều cao cây đạt 2,80 cm; 2,17 cm và 1,27 cm.

Về trọng lượng chồi, Ở nghiệm thức I3 khi bổ sung 0,5 mg/l IBA thì trọng lượng chồi cho kết quả cao nhất đạt 6,27 g. Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng IBA càng tăng thì trọng lượng chồi càng giảm so với nghiệm thức I3.



Hình 1: Sự tăng trưởng chồi Đinh lăng ở các nồng độ IBA khác nhau

(A): 0 mg/l IBA; (B): 0,1 mg/l IBA; (C): 0,5 mg/l IBA; (D): 1 mg/l IBA;
(E): 2 mg/l IBA; (F): 2,5 mg/l IBA

– Khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin thích hợp lên sự tái sinh rễ

cao cây, số lá, số rễ, chiều dài rễ, trọng lượng rễ tốt nhất cho sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê so với các nghiệm thức nuôi cây còn lại.

Kết quả Bảng 5 cho thấy rằng ở nghiệm thức 2 có bổ sung 1 mg/l NAA thu được các chỉ tiêu chiều

Bảng 5: Ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin thích hợp lên sự tái sinh rễ

Nghiệm thức	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Chiều dài lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng rễ (g)
1	0,5		7,22 ^{ab}	4,97 ^{abcd}	4,47 ^{bc}	19,56 ^b	1,67 ^{cd}	2,01 ^b
2	1		8,39^a	6,28^a	4,56 ^b	45,22^a	2,86^a	5,12^a
3	2	0	6,42 ^{bc}	5,44 ^{ab}	3,72 ^{cde}	50,56^a	2,53 ^{ab}	4,70^a
4	3		5,17 ^{cdef}	5,33 ^{abc}	3,61 ^{de}	21,44 ^b	2,14 ^{bc}	1,69 ^{bc}
5	4		4,72 ^{def}	4,11 ^{bcd}	3,22 ^{def}	12,89 ^{bed}	1,69 ^{cd}	1,47 ^{bc}
6	5		4,19 ^f	3,89 ^{cd}	3,08 ^{ef}	6,67 ^{cde}	1,41 ^d	0,90 ^{bc}
7		0,5	8,07^a	3,78 ^d	5,83^a	0,20 ^e	0,25 ^c	1,24 ^{bc}
8		1	6,07 ^{bcd}	3,83 ^d	4,63 ^b	2,61 ^e	0,26 ^c	0,61 ^{bc}
9		2	5,97 ^{bcd}	4,50 ^{bcd}	3,89 ^{bcd}	2,84 ^{de}	0,28 ^e	0,57 ^{bc}
10		3	5,43 ^{cdef}	4,17 ^{bcd}	3,00 ^{ef}	5,83 ^{cde}	0,42 ^e	0,48 ^c
11		4	4,63 ^{ef}	3,66 ^d	2,72 ^f	14,2 ^{bc}	0,65 ^e	0,42 ^c
12		5	4,50 ^f	3,56 ^d	2,61 ^f	7,17 ^{cde}	0,26 ^e	0,37 ^c
F tính			15,77 ^{**}	5,35 ^{**}	22,99 ^{**}	40,89 ^{**}	44,42 ^{**}	18,20 ^{**}
CV (%)			10,35	14,44	9,09	28,24	20,99	40,41

Ghi chú: **: sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở mức 0,01. Trong cùng 1 cột các số có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê

Kết quả của đề tài trùng khớp với Santos et al. (2007), trên môi trường khoáng MS có bổ sung 1 mg/l NAA cho số rễ và chiều dài rễ tốt nhất; tuy ở thí nghiệm này không sử dụng than hoạt tính nhưng kết quả của đề tài giống so với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Liên và ctv. (2005), trên môi trường khoáng MS + 1 mg/l NAA + 20 g/l đường + 0,5 g than hoạt tính cây tạo rễ tốt nhất. Ở các nghiệm thức sử dụng chất điều hòa sinh trưởng

thực vật IBA thì kết quả không trùng khớp so với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Liên và ctv. (2005) môi trường MS có bổ sung 1 mg/l IBA kết hợp 0,5 g than hoạt tính là môi trường thích hợp cho quá trình tạo rễ in vitro, có thể giải thích do điều kiện địa lý của vùng lấy mẫu, thời gian lấy mẫu và ở thí nghiệm của tác giả có bổ sung thêm than hoạt tính.



Hình 2: Cây Đinh lăng in vitro ở các nồng độ auxin khác nhau

(A): NAA 0,5 mg/l; (B): NAA 5 mg/l; (C): IBA 0,5 mg/l; (D): IBA 5 mg/l

– Khảo sát tỷ lệ sống của cây Đinh lăng in vitro ở giai đoạn vườn ươm

Các cây Đinh lăng in vitro có rễ phát triển đầy đủ, rễ khỏe, cây cao từ 4 – 5 cm đem ra trồng trong điều kiện vườn ươm. Kết quả được ghi nhận sau 4 tuần trồng cho thấy, có 90% cây con Đinh lăng phát triển bình thường. Cây con sinh trưởng tốt, hình dạng cây và sự sinh trưởng bình thường, không có biến dị về hình thái.

3.3 Xác định hàm lượng saponin của cây Đinh lăng in vitro

Kết quả Bảng 6 nhận thấy, phương pháp định tính bằng phản ứng tạo bọt mẫu Đinh lăng lá nhỏ in vitro có bọt bền trong 15 phút với chiều cao 1 cm,

điều này cho thấy trong cây in vitro có chứa hợp chất saponin. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Trần Châu Đỗ Mai Anh và ctv. (2007), giữa nguồn nguyên liệu mẫu thu hái từ Đinh lăng lá nhỏ 5 năm tuổi nuôi trồng bằng phương pháp tự nhiên và nguồn mẫu từ phương pháp nuôi cây mô thực vật vẫn bảo toàn đặc tính ban đầu của cây ngoài tự nhiên.

Kết quả định tính bằng phản ứng màu cho thấy, Đinh lăng lá nhỏ in vitro có màu đỏ nên sơ bộ kết luận được chất có saponin triterpen. Và định lượng bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp hàm lượng oleanolic acid trung bình đạt 14,7 µg/g ở giai đoạn 4 tháng tuổi.

Bảng 6: Khảo sát hàm lượng saponin của cây giống Đinh lăng lá nhỏ *in vitro*

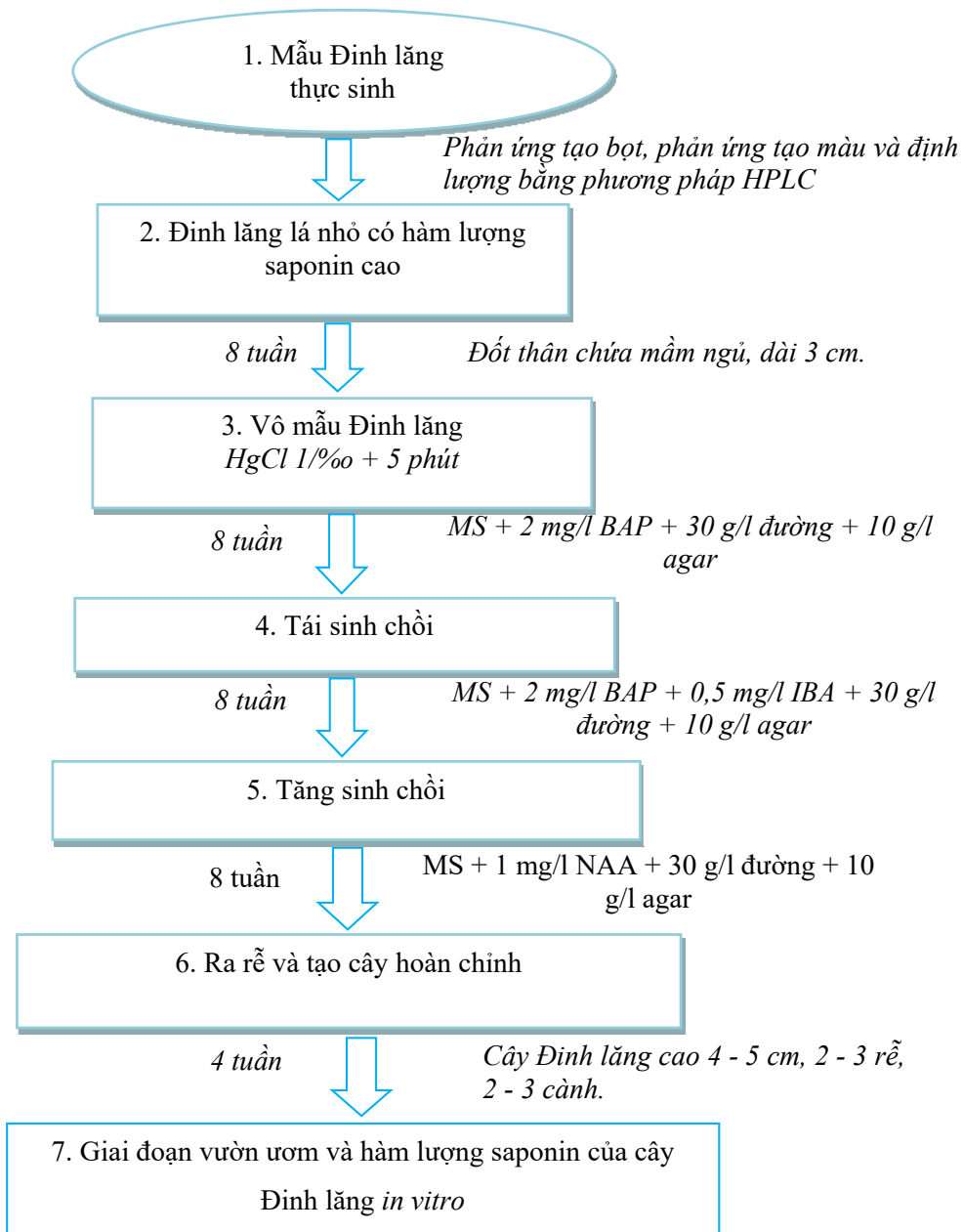
Tên mẫu	Định tính		Định lượng
	Phản ứng tạo bọt (cm)	Phản ứng màu (cm)	HPLC - UV (µg/g)
Đinh lăng lá nhỏ (<i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms)	+	Đỏ	14,7

Ghi chú: +: bọt bền trong 15 phút; xanh lá cây: saponin steroid; đỏ: saponin triterpen

4 KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu xây dựng quy trình nhân nhanh cây Đinh lăng có hàm lượng saponin cao bằng

phương pháp nhân giống *in vitro* chúng tôi đã rút ra được những kết luận sau:



TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bensita, M., Bernard, N.P., Venkataswamy R., and Divakar, C.M., 1998. Department of pharmacognosy, college of pharmacy, Sri Ramakrishna institute of paramedical science Coimbatore. Vol. No18 (2), pages 165-172.
- Bensita, M.B., Nilani, P., and Sandhya, S.M., 1999. Studies on the adaptogenic and antibacterial properties of *Polyscias fruticosa* L. Harms. *Ancient Science of life*, January & April, page 231-246.
- Chaboud, A., Rougny, A., Proliac, A., Raynaud, J., Cabalion, P., 1995. A new triterpenoid saponin from *Polyscias fruticosa*, Fr. *Pharmazie*, 50 (5), page 371-379.
- Lutomski, J., Luan, T. C., Hoa, T.T., 1992. Polyacetylenes in the Araliaceae family, Part IV. The antibacterial and antifungal activities of two main polyacetylenes from *Panax vietnamensis* Ha et Grushv and *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. *Herba Pol.*38, page 137-140.
- Nguyễn Trần Châu Đỗ Mai Anh và Nguyễn Phương Dung, 2007. Nghiên cứu một số tác dụng dược lý thực nghiệm của sản phẩm nuôi cấy mô từ cây Đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms họ Araliaceae. *Tạp chí Nghiên cứu Y học – Khoa Y học Cổ truyền – Đại học Y dược Tp.HCM*, tập 11, số 2, trang 126-131.
- Santos, R.C., Gimenez M.D.G., Rodriguez M.T.S. and Vazquez, R.P., 2007. Antihistaminic and antieicosanoid effects of oleanolic and ursolic acid fraction from *Helichrysum picardii*. *Pharmazie* 62, page 459-462.
- Trần Thị Liên, Nguyễn Văn Thuận và Đoàn Thị Thanh Nhân, 2005. Nghiên cứu nhân nhanh cây Đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms. *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*, kỳ 2, tháng 7.
- Vo., D.H., Yamamura, S., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Nham, N.T. , Chau, H.M., 1998. Olean saponins from *Polyscias fruticosa* L. Harms. *Phytochemistry* 47, page 451-457.