

# NGHIÊN CỨU TẠO RỄ BẤT ĐỊNH Ở CÂY ĐÌNH LĂNG (*POLYSCIAS FRUTICOSA* L. HARMS) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY *IN VITRO*

## A STUDY ON ADVENTITIOUS ROOT FORMATION OF MING ARALIA (*POLYSCIAS FRUTICOSA* L. HARMS) BY *IN VITRO* CULTURE

Phạm Văn Lộc, Nguyễn Thành Luân, Lương Thùy Ngân, Võ Thị Xuân An

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. HCM; Email: locpv@cntp.edu.vn

**Tóm tắt:** Cây đình lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) là cây thuốc được sử dụng lâu đời trong y học dân tộc. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu tạo mô sẹo và rễ bất định cây Đình lăng. Mẫu lá cây đình lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) được cấy vào môi trường MS có bổ sung 2,4 – D để cảm ứng tạo mô sẹo. Mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật để cảm ứng tạo rễ. Kết quả cho thấy, bổ sung 2,4 – D 2,0mg/l cho tỷ lệ tạo sẹo 100%. Bổ sung NAA 0,1mg/l và IBA 1,0 mg/l cho tỷ lệ tạo rễ cao và số lượng rễ tạo ra nhiều. Kết quả này mở ra triển vọng trong nghiên cứu nuôi cấy rễ cây đình lăng nhằm mục đích thu nhận saponin ở quy mô lớn hơn.

**Từ khóa:** *Polyscias fruticosa* L. Harms; rễ bất định; saponin; NAA; IBA.

### 1. Đặt vấn đề

Đình lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) là cây thuốc được sử dụng lâu đời trong y học dân tộc. Nhiều nghiên cứu cho thấy đình lăng gần giống nhân sâm về thành phần hóa học và tác dụng dược lý. Đình lăng có tác dụng tăng cường thể lực, tăng sức đề kháng. Trong các chất có trong cây đình lăng thì saponin là hợp chất quan trọng. Saponin có khả năng kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư... (Đái Duy Ban, 2008). Hợp chất này có nhiều ở rễ và lá đình lăng (Sliwinska và cs., 2008). Do hàm lượng saponin trong cây đình lăng khá ít nên chưa đáp ứng được nhu cầu dược liệu. Bên cạnh đó, phải mất từ 3 – 5 năm mới thu hoạch rễ đình lăng nếu trồng tự nhiên. Do đó, rất cần sự tham gia của công nghệ sinh học trong cung cấp nguyên liệu để thu nhận hợp chất thứ cấp, trong đó phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật được đánh giá là có tiềm năng. Đã có những sản phẩm do công nghệ sinh học mang lại trong lĩnh vực này như sản xuất taxol từ nuôi cấy tế bào thông đỏ (*Taxus* sp.), sản xuất shikonin từ nuôi cấy tế bào cây *Lithospermum erythrorhizon* (Vũ Bình Dương và cs., 2008). Bên cạnh đó, còn nhiều phương pháp khác can thiệp vào các quá trình sinh lý của thực vật để sản xuất hợp chất thứ cấp như nuôi cấy rễ tơ (hairy root), thủy canh... (Zhou và cs., 2011).

Với mục tiêu thu nhận sinh khối rễ nhằm tạo ra nguồn nguyên liệu trong mục đích thu nhận saponin, trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu khả năng tạo mô sẹo, sự hình thành và phát triển rễ bất định cây đình lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) trong nuôi cấy *in vitro*.

### 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Vật liệu

Nghiên cứu sử dụng lá non cây đình lăng (*Polyscias*

**Abstract:** In this study, the medium for callus and adventitious roots induction of Ming Aralia (*Polyscias fruticosa* L. Harms) was investigated. Leaf explants of *Polyscias fruticosa* L. Harms were cultured on MS medium supplemented with 2,4 – D for callus induction. Its callus was subcultured on MS medium supplement growth regulators for root induction. The results emphasized that the culture of MS medium supplemented with 2,4 – D 2.0mg/l was 100% callus initiation. The highest rate of root initiation and the number of roots were obtained at the optimal combination of NAA 0.1mg/l and IBA 1.0mg/l. Consequently, this will be a potential for further studies on *Polyscias fruticosa* L. Harms so as to observe biological source of saponin supplement on a larger scale.

**Key words:** *Polyscias fruticosa* L. Harms; adventitious roots; saponin; NAA; IBA.

*fruticosa* L. Harm) 3 năm tuổi từ vườn Thực nghiệm Sinh học Trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm Tp.HCM.

#### 2.2. Phương pháp

*Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ 2,4 – D lên sự phát sinh mô sẹo*

Lá non đình lăng sau khi khử trùng ở nồng độ Javel 20% được cắt thành những mẫu nhỏ có diện tích 0,2x0,8÷1cm (cắt bỏ rìa lá). Sau đó cấy vào môi trường MS có bổ sung 2,4 – D với các nồng độ khác nhau (0 ÷ 4,0 mg/l).

*Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NAA khi kết hợp với IBA lên sự tạo rễ từ mô sẹo cây đình lăng*

Mô sẹo 4 tuần tuổi từ các mẫu cây của lá đình lăng trên môi trường MS có bổ sung 2,4 – D 2,0mg/l được cấy chuyển sang môi trường cảm ứng tạo rễ. Môi trường MS có bổ sung IBA 1mg/l và NAA với các nồng độ khác nhau (0 ÷ 1,0 mg/l).

#### 2.3. Điều kiện thí nghiệm

Môi trường sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962). pH môi trường được điều chỉnh = 5,8 trước khi hấp khử trùng. Khử trùng ở 121°C, 1atm trong 20 phút. Thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ: 25 ± 2°C, độ ẩm trung bình: 75 – 80%, cường độ chiếu sáng: 2500-3000 lux. Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học thực vật, Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh.

#### 2.4. Phương pháp định tính và định lượng saponin

Tiến hành định tính saponin qua thử nghiệm tạo bọt, thử Lugol với bột dược liệu (Dược điển Việt Nam - Bộ Y tế, 2009). Đồng thời triển khai sắc ký bản mỏng. Cao chiết đình lăng chứa saponin sau khi được tách chiết

(Trần Công Luận và cs., 2008) hòa tan với 1ml metanol, lấy dịch metanol này thực hiện sắc ký bản mỏng. Hệ dung môi triển khai sắc ký gồm:  $\text{CHCl}_3$ : metanol: nước (65:35:10). Hiện màu bằng acid sulfuric 10% trong cồn, sấy 5 phút ở  $110^\circ\text{C}$ .

Định lượng saponin toàn phần theo phương pháp cân (Trần Công Luận và cs., 2008).

### 2.5. Phân tích và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD). Các số liệu thí nghiệm được phân tích thống kê bằng phần mềm Statgraphics centurion XV.I, sử dụng trắc nghiệm đa biến độ Duncan với độ tin cậy 95%.

## 3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

### 3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D lên sự phát sinh mô sẹo

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D lên sự phát sinh mô sẹo (Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%)

Nghiệm thức	Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Tỉ lệ tạo sẹo (%)
A1	0,0	00,00±0,00 <sup>a</sup>
A2	1,0	87,50±2,50 <sup>b</sup>
A3	2,0	100,00±0,00 <sup>c</sup>
A4	3,0	90,00±4,08 <sup>bc</sup>
A5	4,0	82,50±6,29 <sup>b</sup>

Kết quả theo dõi sự phát sinh mô sẹo sau 30 ngày nuôi cấy được trình bày ở Bảng 1.

Sự hình thành mô sẹo phụ thuộc vào kiểu gen, loại mô và cơ quan, nồng độ và tỷ lệ các chất điều hòa tăng trưởng nội sinh và ngoại sinh), đặc biệt là tỷ lệ auxin/cytokinin (Pierik, 1987). Những mẫu non cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao.

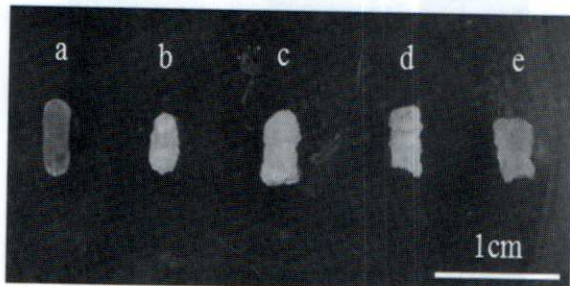
Trong môi trường nuôi cấy, khi nồng độ thấp auxin gây ra sự tạo rễ bất định. Khi nồng độ auxin cao gây ra sự tạo mô sẹo (Torres, 1989). Đa số các mẫu cây song từ đập không có khả năng tạo mô sẹo khi chỉ có auxin mà cần phải có sự phối hợp với cytokinin (Nguyễn Đức Lương và cs., 2002).

Mẫu trên môi trường có bổ sung 2,4-D 1,0mg/l sau 7 ngày bắt đầu cảm ứng. Mẫu cảm ứng tạo sẹo chậm, trong khi đó mẫu đối chứng (không bổ sung 2,4-D) không có sự hình thành sẹo. Điều này cho thấy 2,4-D gây phân biệt hóa các tế bào, tạo khối mô sẹo và lượng auxin nội sinh trong mẫu không đủ cho quá trình hình thành sẹo.

Mẫu trên môi trường có bổ sung 2,4-D 2,0mg/l cảm ứng tạo sẹo sau 4 ngày. Tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo đạt 100%. Mô sẹo có màu vàng nhạt. Sau 30 ngày, sẹo vẫn tiếp tục tăng trưởng.

Các mẫu trên các môi trường có bổ sung 2,4-D 3,0mg/l; 4,0mg/l phù to và cong lên rất nhanh chỉ sau 3 ngày. Tỉ lệ mẫu tạo sẹo từ 80% đến 90%. Trên các môi trường này, mẫu cảm ứng nhanh nhưng sau đó mẫu hóa nâu dần chết sau 30 ngày.

Điều này có thể do sự hiện diện của 2,4-D trong môi trường làm tăng hàm lượng các DNA, RNA, đặc biệt là mRNA trong mẫu cấy. Do đó làm gia tăng quá trình sinh tổng hợp protein, dẫn đến sự gia tăng sinh khối của mẫu cấy. Nhưng khi hàm lượng 2,4-D quá cao nó sẽ làm gia tăng rRNA. Do đó mẫu cấy trở nên sinh trưởng chậm hẳn đi và khối mô sẹo nhanh già (Nguyễn Thị Liễu và cs., 2011).



**Hình 1.** Mô sẹo từ lá đỉnh lã trên môi trường MS bổ sung 2,4-D với các nồng độ khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy  
a) 0mg/l; b) 1,0mg/l; c) 2,0mg/l; d) 3,0mg/l; e) 4,0mg/l

### 3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NAA kết hợp với IBA lên sự tạo rễ từ mô sẹo cây đỉnh lã

Kết quả tạo rễ từ mô sẹo lá đỉnh lã sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 2.

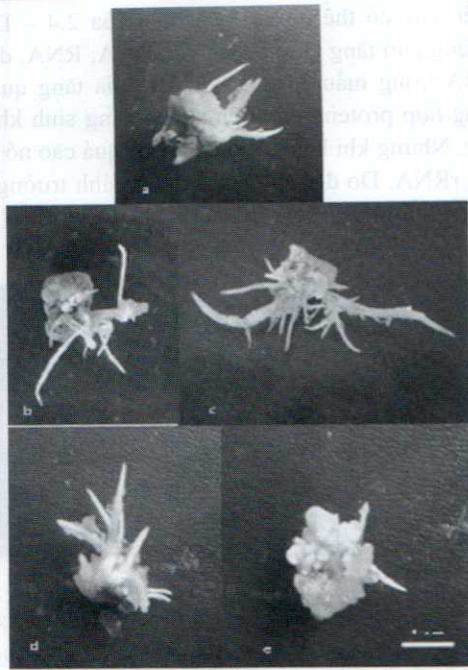
**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nồng độ NAA khi kết hợp với IBA lên sự tạo rễ từ mô sẹo cây đỉnh lã (Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%)

Nồng độ NAA (mg/l)	Tỉ lệ tạo rễ (%)	Số lượng rễ/mẫu
0,0	45,00 ± 6,45 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,25 <sup>a</sup>
0,05	45,00 ± 8,66 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,25 <sup>a</sup>
0,1	72,50 ± 4,79 <sup>b</sup>	6,50 ± 0,65 <sup>b</sup>
0,5	67,50 ± 11,09 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,25 <sup>a</sup>
1,0	42,50 ± 6,29 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,29 <sup>a</sup>

Sau 30 ngày, các mẫu bắt đầu tạo rễ trên tất cả môi trường bổ sung đồng thời IBA và NAA. Có thể NAA cần thiết cho sự tạo sơ khởi rễ và IBA cần thiết cho quá trình kéo dài rễ.

Tỉ lệ tạo rễ trên môi trường có IBA 1,0mg/l; NAA 0,1mg/l cao nhất và khác biệt ý nghĩa với các nghiệm thức khác. Số lượng rễ trên mẫu cũng có sự khác biệt và rễ kéo dài liên tục trong thời gian nuôi cấy.

Sự kéo dài rễ bao gồm sự kéo dài của các tế bào sẵn có và sự tiếp tục phân chia của các tế bào sơ khởi rễ. Auxin trong sự tạo rễ bất định tác động ở hai giai đoạn: giai đoạn đầu cần auxin ở nồng độ cao để tạo sơ khởi rễ và giai đoạn sau cần auxin thấp để kéo dài rễ (Bùi Trang Việt, 2000; Lincoln và Eduardo, 2006).

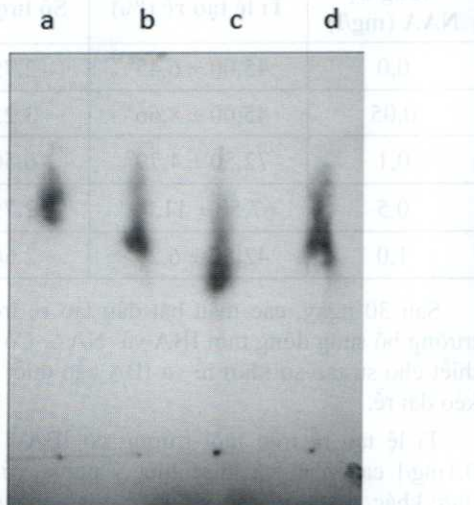


**Hình 2.** Rễ đỉnh lăng tạo từ mô sẹo trên môi trường MS bổ sung NAA với các nồng độ khác nhau khi kết hợp với IBA 1mg/l  
a) 0mg/l; b) 0,05mg/l c) 0,1mg/l; d) 0,5mg/l; e) 1,0mg/l.

### 3.3. Kết quả định tính và định lượng saponin

Kết quả các thử nghiệm tạo bọt, thử Lugol cho thấy có sự hiện diện của saponin trong mẫu rễ *in vitro*.

Đồng thời kết quả sắc ký bản mỏng phát hiện saponin có trong mô sẹo và rễ *in vitro* tương tự trong các mẫu đối chứng là rễ và lá đỉnh lăng *in vivo* (hiện màu với acid sulfuric).



**Hình 3.** Kết quả sắc ký bản mỏng

a) Lá *in vivo* b) Rễ *in vivo* c) Sẹo *in vitro* d) Rễ *in vitro*

Phân tích định lượng cho thấy hàm lượng saponin của rễ *in vitro* là 1,67% (tính trên khối lượng khô) bằng

83,5% so với rễ *in vivo* (1,99%). Kết quả này tương đương với nghiên cứu trên đối tượng rễ sâm Triều Tiên (*Panax ginseng*) khi nuôi cấy bằng bioreactor là 1,6% (tính trên khối lượng khô) (Ligang và cs., 2007); 1% (tính trên khối lượng khô) (Sung và cs., 2000).

### 4. Kết luận

Từ kết quả trên, chúng tôi nhận thấy môi trường MS bổ sung 2,4 – D 2,0mg/l phù hợp cho tạo mô sẹo từ mẫu lá đỉnh lăng. Mô sẹo trên môi trường này khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung đồng thời NAA và IBA cho phát sinh rễ bất định. IBA nồng độ 1 mg/l và NAA nồng độ 0,1 mg/l cho tỷ lệ phát sinh rễ và số lượng rễ tạo ra trên mẫu cao nhất. Rễ *in vitro* đỉnh lăng có hàm lượng saponin tương đương với rễ tự nhiên. Điều này mở ra khả năng sản xuất sinh khối rễ đỉnh lăng để thu nhận các chất có hoạt tính sinh học bằng công nghệ tế bào.

### Tài liệu tham khảo

- [1] Đái Duy Ban, Các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học phòng chống một số bệnh cho người và vật nuôi, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 2008.
- [2] Bộ Y tế, Dược điển Việt Nam IV, Nhà xuất bản Y học, 2009.
- [3] Vũ Bình Dương, Nguyễn Văn Long, Hoàng Văn Lương, Lê Bách Quang, Nguyễn Văn Minh, “Công nghệ sinh khối tế bào thực vật, hướng mới trong sản xuất nguyên liệu làm thuốc”, *Kỹ yếu hội thảo khai thác, phát triển và xây dựng thương hiệu sâm Ngọc Linh Panax vietnamensis Ha et Grushv., Araliaceae*, 2008.
- [4] Ligang Z., Xiaodong C., Ruifen Z., Youliang P, Shoujing Z., Jianyong W., “Stimulation of saponin production in Panax ginseng hairy roots by two oligosaccharides from Paris polyphylla var. yunnanensis”, *Biotechnol. Lett.*, 29, 2007, 631–634.
- [5] Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Văn Kết, “Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis Ha et Grushv.*) trong nghiên cứu *in vitro*”, *Tạp chí khoa học ĐHQG Hà Nội*, 27, 2011, 30-36.
- [6] Lincoln T. and Eduardo Z., *Plant Physiology, 4th Edition, Macmillan Publishers*, 2006.
- [7] Trần Công Luận, Lê Tiền Dũng, Võ Thụy Lữ Tâm, Lê Thị Phương Anh, Trần Thu Hoa, “Ứng dụng kỹ thuật MARMS để phân tích sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis Ha et Grushv.*) và các loài sâm khác”, *Kỹ yếu hội thảo khai thác, phát triển và xây dựng thương hiệu sâm Ngọc Linh Panax vietnamensis Ha et Grushv., Araliaceae*, 2008.
- [8] Zhou M.L., Zhu X.M., Shao J.R., Tang Y.X., Wu Y.M., “Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture”, *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 90(4), 2011, 1229-1239.
- [9] Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên, *Công nghệ tế bào*, NXB Đại học Quốc gia Tp.HCM, 2011.
- [10] Pierick R.L.M., *In vitro culture of higher plants*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2006.
- [11] Sliwinska A., Olszowska O., Furmanowa M. and Nosov A., “Rapid multiplication of *Polyscias filicifolia* by secondary somatic embryogenesis”, *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 44, 2008, 69–77.
- [12] Sung M.C., Sung H.S., Seung R.Y., Oh W.K., Jeong H.S., Kee Y.P., “Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system”, *Plant cell, tissue and organ culture*, 62(3), 2000, 187-193.
- [13] Torres K.C., *Tissue culture techniques for horticultural crops*, Chapman & Hall, 1989.
- [14] Bùi Trang Việt, *Sinh lý thực vật đại cương (Phần II. Phát triển)*, NXB ĐHQG Quốc gia Tp. HCM, 2000.

(BBT nhận bài: 28/10/2013, phản biện xong: 12/12/2013)