

Bảng 4. Kết quả định lượng rotundin trong 3 mẫu bình vôi

STT	Kí hiệu mẫu	Tên khoa học	Nơi thu	Độ ẩm của củ bình vôi tươi (%)	Hàm lượng alkaloid toàn phần trong củ bình vôi tươi (%)	Hàm lượng rotundin trong alkaloid toàn phần (%)	Hàm lượng rotundin trong củ bình vôi tươi (%)
1	BV-SL	<i>Stephania cephalantha</i> Hayata	Sơn La	88	1,02	40,12	0,409
2	BV-TN	<i>Stephania sinica</i>	Tây Nguyên	89	1,09	33,98	0,373
3	BV-HG	<i>Stephania hernandifolia</i>	Hà Giang	87	1,40	18,84	0,265

4. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng hoạt chất rotundin trong alkaloid toàn phần từ củ bình vôi tươi bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng kết hợp đo mật độ quang hấp thụ (TLC-Scanning) với độ lặp lại: RSD = 1,90 % (n = 6), độ đúng, độ thu hồi trung bình đạt 97,15%, giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện của rotundin lần lượt là 0,08 μ g và 0,27 μ g. Khoảng tuyến tính của rotundin được xác định nằm trong khoảng 0,374-1,87 μ g, hệ số tương quan r = 0,9985.

Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng của rotundin trong các mẫu bình vôi tươi thu tại Sơn La, Tây Nguyên, Hà Giang đạt từ 0,265% đến 0,409%. Mẫu thu tại Sơn La cho hàm lượng rotundin cao nhất đạt 0,409% so với khối lượng củ bình vôi tươi. Độ ẩm của các mẫu củ bình vôi tươi được xác định liệt kê trong bảng 4. Từ đó, có thể suy ra hàm lượng rotundin trong củ bình vôi

khô của 3 mẫu BV-SL, BV-TN và BV-HG lần lượt là: 3,40 %; 3,39 % và 2,04 %. Như vậy, so với quy chuẩn hàm lượng rotundin trong dược liệu bình vôi trong Dược điển là không dưới 0,4% thì cả 3 mẫu khảo sát đều đạt yêu cầu chất lượng và chứa hàm lượng rotundin tương đối cao.

Phương pháp định lượng rotundin trong củ bình vôi tươi sử dụng sắc ký lớp mỏng kết hợp đo mật độ quang hấp thụ (TLC-Scanning) có quy trình thực hiện đơn giản, tiết kiệm thời gian và chi phí hơn so với phương pháp định lượng rotundin bằng sắc ký lỏng cao áp đã được đưa ra trong Dược điển Việt Nam IV. Phương pháp này có thể áp dụng để góp phần định hướng cho việc thu mua nguyên liệu để sản xuất rotundin lượng lớn.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của đề tài Hợp tác khoa học với UBND Tỉnh Thái Bình và Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số đề tài VAST.NĐP.07/14-15.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2009). *Dược điển Việt Nam IV*, NXB Y học, Hà Nội, tr 696-697.
2. Tạ Thị Thảo (2010), *Giáo trình môn học thống kê trong hóa phân tích*, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học QGHN Hà Nội.

Tạp chí Dược liệu, tập 19, số 6/2014 (Trang 380 - 384)

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG IN VITRO CÂY CÁT SÂM

Tạ Như Thục Anh*, Dương Thị Phúc Hậu, Trần Thị Liên

Viện Dược liệu

*Email: tntthucanh@gmail.com

(Nhận bài ngày 14 tháng 10 năm 2014)

Tóm tắt

Cát sâm (*Millettia speciosa* Champ.) cây thuốc quý có nguy cơ tuyệt chủng, có tác dụng chống ung thư. Vì vậy, cần có biện pháp bảo tồn cây thuốc này. Chồi được tái sinh trong môi trường MS có bổ sung 0.05 mg/L BA. Chồi dính có kích thước 0,3-0,5cm được cấy vào môi trường có bổ sung Kn, BA, hay α -NAA + Kin để nhân nhanh. Số chồi cao nhất

(7,28chồi/mẫu) đạt được ở môi trường có 1,0 mg/L kinetin và 0,01 mg/L α -NAA. Môi trường tạo rễ được bổ sung IBA hoặc 2,4-D, hoặc α -NAA, rễ bình thành tốt nhất ở môi trường có 1,0 mg/L IBA hay 2,4-D. Cây *in vitro* được làm quen trong nhà lưới và đưa trồng ra ngoài.

Từ khóa: Cát sâm, Nhân nhanh *in vitro*.

Summary

Micropropagation of *Millettia speciosa* Champ.

Millettia speciosa Champ. is an endangered medicinal plant with anticancer properties. Therefore, the need for conservation of this plant is crucial. Shoots were generated on MS medium supplemented with 0.05 mg/L BA. The shoot-tip segments of about 0.3-0.5 cm in length were cultured on MS medium supplemented with Kn, BA, or α -NAA + Kin for multiple shoot induction. Maximum number of shoot buds were obtained on medium containing 1.0 mg/L kinetin and 0.01 mg/L α -NAA (7.28 shoots/explant). The shoots were rooted on MS medium supplemented with IBA or 2,4-D, or α -NAA. Best rooting was obtained on medium containing 1.0 mg/L IBA or 2,4-D. *In vitro* plantlets were acclimatized in green house and successfully transplanted to natural condition

Keywords: *Millettia speciosa* Champ., Micropropagation.

1. Đặt vấn đề

Cát sâm (*Millettia speciosa* Champ.) thường có ở Lào, Trung Quốc và Việt Nam. Ở Việt Nam, chỉ *Millettia* Wight & Arn có 25 loài. Một số loài có chất độc nên thường sử dụng làm thuốc diệt côn trùng. Cát sâm là một trong số ít loài có rễ củ không độc [8,9]. Chúng phân bố rải rác ở các tỉnh miền núi trung du. Vùng phân bố tương đối tập trung ở một số tỉnh như: Bắc Ninh, Bắc Giang, Vĩnh Phúc, Quảng Ninh, Lạng Sơn, Cao Bằng, Bắc Kạn, Tuyên Quang... Độ cao phân bố thường dưới 1000m so với mặt nước biển [2].

Cát sâm là cây thuốc quý, nghiên cứu của Zheng Yuan Sheng (2009) cho biết polysaccharid được chiết xuất và tinh chế từ *Millettia speciosa* Champ. có tác dụng được lý chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, cải thiện suy giảm chức năng v.v. Những năm gần đây, cát sâm thường xuyên bị khai thác và thu mua nhiều tại các tỉnh Quảng Ninh, Bắc Giang, Bắc Kạn... để xuất khẩu. Do khai thác ồ ạt, nguồn cát sâm ở trong nước bị cạn kiệt. Tại Nghĩa Trai - Hưng Yên, những năm 2000 - 2005 hàng năm nhập về và chế biến 60 - 70 tấn/năm củ cát sâm [1].

Cát sâm có thể tái sinh hàng năm bằng hạt hay tái sinh từ phần gốc. Tuy nhiên, tỷ lệ nảy mầm của hạt thấp, hạt khó bảo quản, và thời gian sinh trưởng chậm, khả năng tái sinh từ gốc cho hệ số nhân thấp, canh giâm khó ra rễ, cây giống cho

năng suất thấp [4]. Để phát triển nguồn gen cây thuốc cát sâm vẫn đề cần được quan tâm đầu tiên là công tác giống. Các biện pháp nhân giống truyền thống không đáp ứng nguồn cây giống vì hệ số nhân giống theo phương pháp truyền thống thấp, tỷ lệ hạt nảy mầm không cao. Đối với các loài *Millettia* ssp, cây mọc từ hạt sau một năm rưỡi mới đạt chiều cao 60cm. Phương pháp nhân giống *in vitro* có thể là giải pháp hữu hiệu để giải quyết vấn đề giống cây dược liệu này. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây cát sâm nhằm mục đích sản xuất cây giống và phát triển giống dược liệu quý này.

2. Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Cát sâm được sử dụng để nghiên cứu là các đốt thân và chồi đỉnh của cây cát sâm có nguồn gốc ở Bắc Giang. Lấy các đoạn mẫu có chiều dài từ 2,0-2,5cm, mỗi đoạn chứa từ 1-2 mắt ngủ, rửa bằng nước sạch, tráng lại bằng nước cất, sau đó khử trùng bằng 0,1 % HgCl_2 trong 8-10 phút. Toàn bộ thao tác khử trùng được tiến hành trong điều kiện vô trùng. Chồi sau khi khử trùng được đưa vào nuôi cấy ở môi trường Murashige & Skooge (1962) [5] (MS); 30% đường, có bổ sung cytokinin và auxin theo các tỷ lệ khác nhau, pH môi trường chỉnh đến 5,4 và hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Phòng nuôi cấy có quang chu kỳ 14 giờ sáng/10 giờ tối, cường độ chiếu sáng 2000 lux, nhiệt độ

là $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng làm đối chứng. Số chồi/mẫu và chiều cao chồi được đo đếm sau 10 tuần nuôi cấy.

Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào- Bộ môn Giống & CNSH- Trung tâm nghiên cứu Trồng & Chế

biến cây thuốc - Viện Dược liệu trong thời gian 2013-2014.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Nghiên cứu tái sinh chồi in vitro

Môi trường tái sinh được bổ sung BA ở các nồng độ từ 0,1 - 0,5 mg/l. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến tỷ lệ bật chồi của cát sâm in vitro

CTTN	Tỷ lệ bật chồi (%)			Trạng thái
	15 ngày	30 ngày	45 ngày	
MS	16,7	66,6	93,3	Chồi khỏe
MS + 0,1 mg/l BA	20,0	70,0	96,6	Chồi khỏe, xanh nhạt
MS + 0,2 mg/l BA	40,0	73,3	100	Chồi khỏe, xanh
MS + 0,3 mg/l BA	53,3	86,6	100	Chồi khỏe
MS + 0,5 mg/l BA	60,0	83,3	93,3	Chồi nhỏ, tạo nhiều callus

Như vậy: Sự có mặt của BA trong môi trường rõ ràng đã kích thích hình thành chồi ở các công thức so với đối chứng. Tỷ lệ bật chồi tăng dần với chiều tăng nồng độ BA. Sau 45 ngày tỷ lệ bật chồi đạt 100% ở nồng độ từ 0,2 đến 0,3 mg/l BA. Ở nồng độ 0,5mg/l BA, tại các đầu cắt bắt đầu có hiện tượng tạo callus, callus hình thành nhiều ở các đầu cắt làm hạn chế sinh trưởng của chồi, hình thái chồi bị biến dạng, tỷ lệ bật chồi thấp hơn chỉ đạt tương đương với môi trường không có BA. Chồi tái sinh và sinh trưởng tốt

nhất trong môi trường có bổ sung 0,3 mg/l BA. Sau 10 tuần chồi đạt kích thước từ 3- 5cm.

Các chồi thu được ở môi trường tái sinh được sử dụng để cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh.

3.2. Nghiên cứu nhân nhanh chồi cát sâm in vitro

Môi trường nhân nhanh được bổ sung các chất BA, kinetin riêng lẻ hoặc tổ hợp với α -NAA. Theo nồng độ từ 0,1 - 1,0 mg/l. Đối chứng là môi trường MS không có chất sinh trưởng. Các chỉ tiêu theo dõi được đo đếm sau 10 tuần nuôi cấy (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hệ số nhân của cây cát sâm sau 10 tuần nuôi cấy in vitro

STT	Chỉ tiêu theo dõi	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao (cm)	Chất lượng chồi
	Môi trường			
1	MS	$3,20 \pm 0,15$	$5,20 \pm 0,55$	Chồi khỏe, lá to.
2	MS + 0,1 mg/l BA	$6,75 \pm 0,25$	$5,75 \pm 0,25$	Chồi khỏe, lá nhỏ
3	MS + 0,3 mg/l BA	$6,62 \pm 0,30$	$5,62 \pm 0,30$	Chồi khỏe, lá nhỏ
4	MS + 0,5 mg/l BA	$5,64 \pm 0,45$	$5,45 \pm 0,35$	Chồi khỏe, lá nhỏ
5	MS + 1,0 mg/l BA	$4,12 \pm 0,38$	$3,12 \pm 0,38$	Chồi khỏe, tạo callus
6	MS + 0,1 mg/l Kin	$4,52 \pm 0,52$	$4,25 \pm 0,32$	Chồi mảnh, lá nhỏ
7	MS + 0,3 mg/l Kin	$5,16 \pm 0,36$	$3,86 \pm 0,46$	Chồi mảnh, lá nhỏ
8	MS + 0,5 mg/l Kin	$5,85 \pm 0,38$	$3,25 \pm 0,35$	Chồi mảnh, lá nhỏ
9	MS + 1,0 mg/l Kin	$7,28 \pm 0,40$	$3,18 \pm 0,20$	Chồi mảnh, lá to

Kết quả theo dõi cho thấy tác động của các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau, ảnh hưởng khác nhau đến hình thành chồi *in vitro*. Ở môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng, số chồi/mẫu thấp nhất, chỉ đạt 3,2 chồi/mẫu. Khi có mặt BA số chồi tăng lên 6,75 chồi/mẫu sau đó giảm dần theo chiều tăng của nồng độ BA trong môi trường. Trái lại với tác dụng của BA, khi tăng nồng độ kinetin số chồi cũng tăng theo và đạt cao nhất ở nồng độ 1,0 mg/l. Hệ số nhân ở môi trường này đạt tới 7,28 chồi/mẫu. Môi trường này tỏ rõ hơn tính ưu việt so với môi

trường của các tác giả trước như Pan YingNan et al (2010) [7] chỉ đạt hệ số 4,0 -5,0 chồi/mẫu hay tác giả Huang Bi-lan et al (2010) đạt 7,0 chồi/mẫu cấy ở môi trường MS có 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IBA [3].

Tuy nhiên, nếu môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung các chất thuộc nhóm cytokinin thường tạo mô sẹo ở đầu cắt, chất lượng cây chưa tốt (cây thường vàng và mọc vống). Vì vậy, chúng tôi đã bổ sung α -NAA vào môi trường tạo chồi MK (môi trường MS cơ bản và 1,0 mg/l kinetin) với nồng độ 0,01 ; 0,02 ; 0,03 .

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp Kinetin và α -NAA tới tỷ lệ chồi *in vitro* của cây cát sâm

TT	Thành phần	Chỉ tiêu	Hệ số nhân chồi (số chồi/mẫu)	Trạng thái
1	MK		7,28 ± 0,42	Chồi mảnh, lá nhỏ
2	MK + 0,01mg/l α -NAA		7,61± 0,37	Chồi khỏe, lá to
3	MK + 0,02mg/l α -NAA		7,52 ± 0,74	Chồi khỏe, có callus
4	MK + 0,03mg/l α -NAA		6,56 ± 0,51	Chồi khỏe, nhiều callus

Bổ sung vào môi trường nhân chồi α -NAA có tác dụng tăng hệ số nhân chồi so với môi trường không bổ sung α -NAA. Hệ số nhân đạt cao nhất trong môi trường có bổ sung 1 mg/l kin + 0,01 mg/l α -NAA. Tiếp tục tăng nồng độ α -NAA trong môi trường nuôi cấy sẽ gây tác dụng không mong muốn là hình thành nhiều mô sẹo và giảm số chồi/mẫu. Như vậy, α -NAA là nhân tố cần thiết cho hình thành chồi.

Môi trường thích hợp nhất cho tái sinh chồi và nhân nhanh chồi cát sâm *in vitro* là môi trường được bổ sung kinetin (1 mg/l) và α -NAA (0,1 mg/l).

3.3. Nghiên cứu tạo rễ cây cát sâm *in vitro*

Khi chồi đạt chiều cao từ 3 - 4 cm được chuyển sang môi trường bổ sung chất sinh trưởng là α -NAA hoặc IBA hoặc 2,4-D với nồng độ từ 0,1-2,0 mg/l.

Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

Rễ xuất hiện trên các môi trường có auxin sau 10 tuần nuôi cấy. Cả 3 loại auxin đều có tác dụng kích thích hình thành rễ cắt sâu *in vitro* ở các mức độ khác nhau phụ thuộc vào nồng độ trong môi trường. Ở nồng độ 0,5 mg/l α -NAA không kích thích tạo rễ. Tác dụng kích thích rễ tốt nhất của IBA đạt được ở nồng độ 1,0 mg/l và của 2,4D đạt được ở nồng độ 0,5 mg/l. Ở nồng độ $\geq$ 1,0 mg/l IBA và các công thức chứa 2,4- D callus hình thành ở đầu cắt và gây ảnh hưởng tới chất lượng rễ. Hiện tượng này cũng xảy ra ở một số loài cây thân gỗ [6]. Sự hình thành mô sẹo ở gốc cây đường như làm cho cây con mất khả năng hấp thu dinh dưỡng qua rễ và khả năng sống giảm khi đưa ra ngoài [6].

Bảng 4. Ảnh hưởng của các auxin α -NAA, IBA, 2,4D tới tỷ lệ ra rễ, số lượng rễ, chiều dài rễ của cây cát sâm

Môi trường	Chỉ tiêu theo dõi	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Trạng thái chồi
		10 tuần sau cấy			
1. MS		-	-	-	-
2. MS + 0.5mg/l α -NAA		-	-	-	-

3. MS + 1,0mg/l α -NAA	15	1,3 $\pm$ 0,36	3,1 $\pm$ 0,22	+++
4. MS + 2,0mg/l α -NAA	10	1,2 $\pm$ 0,12	2,7 $\pm$ 0,25	++
5. MS + 0,5mg/l IBA	18	1,8 $\pm$ 0,22	3,5 $\pm$ 0,18	+++
6. MS + 1,0 mg/l IBA	30	2,1 $\pm$ 0,38	3,2 $\pm$ 0,18	+++
7. MS + 2,0 mg/l IBA	5	1,5 $\pm$ 0,26	2,9 $\pm$ 0,22	Tạo mô sẹo
8. MS + 0,5mg/l 2,4-D	25	1,2 $\pm$ 0,08	2,8 $\pm$ 0,25	++
9. MS + 1,0mg/l 2,4-D	20	2,2 $\pm$ 0,21	2,6 $\pm$ 0,18	++
10. MS + 2,0 mg/l 2,4-D	10	2,3 $\pm$ 0,26	2,5 $\pm$ 0,22	+

Chú thích: +++ cây có rễ, xanh đậm;

++ cây có rễ, xanh nhạt,

+ cây vàng;

- cây không rễ.

4. Kết luận

Ở giai đoạn khởi động, chồi cát sẫm tái sinh và sinh trưởng tốt nhất trong môi trường có bổ sung 0,03 mg/l BA. Tỷ lệ bật chồi đạt 100% sau 30 ngày cấy. Sau 10 tuần chồi đạt kích thước từ 3 - 5cm. Các chất điều hòa sinh trưởng BA và kinetin đều có tác dụng kích thích tạo chồi trong môi trường nhân nhanh, tác dụng kích thích hình thành chồi của

kinetin cao hơn so với BA ở cùng nồng độ sử dụng.

Tổ hợp 1 mg/l kinetin + 0,01 mg/l α -NAA trong môi trường cho hệ số nhân đạt cao nhất là 7,28 chồi/mẫu.

NAA, IBA và 2,4-D đều có tác dụng kích thích hình thành rễ. Tỷ lệ ra rễ cao nhất ở môi trường có bổ sung 1,0 mg/l IBA (30%) hay 0,5 mg/l 2,4-D (25%).

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2003), Phát triển dược liệu bền vững trong thế kỷ 21, Tài liệu Hội nghị được liệu toàn quốc lần thứ nhất, tr. 115.
2. Viện Dược liệu (2003), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1, NXB KH&KT.
3. Huang B. L., Xu L., Zhiying L., Qianquan M., Kelie L., Wei C. (2008), Study on tissue culture techniques for stem segment of *Millettia speciosa* Champ, *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 36, 13993-13994.
4. Qiu-Yin H., Dong-Nan H., Shu-Fu C., Bing-Ying X. (2009), Study on *Millettia speciosa* Champ. seed germination. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 37, 16845-16846.
5. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15, 473-497.
6. Norton M. E., Norton C. E. (1986). Change in shoot proliferation with repeated *in vitro* subculture of shoots of woody species of Rosaceae, *Plant Cell Tiss Organ*, 5, 187-197.
7. Pan Y. N., Zhang X. J., Meng P., Yu W. H., Chen S. Z., Tang J., Huang S. M., Zou Y. (2010), Remove from marked records tissue culture of medicinal plant *Millettia speciosa* Champ., *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2010, 41 (6), 523- 525.
8. Wei Y.-Y., Wu F.-J., Zeng H.-S., Lu S.-H., Chen Y. (2010), The overview on the research of radix *Millettia speciosae*, *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 3.
9. Van Valkenburg, J. L. C. H. (2001). *Millettia* Wight & Arn. In: van Valkenburg, J. L. C. H. and Bunyapraphatsara, N. (Editors). Plant Resources of South-East Asia No. 12(2): Medicinal and poisonous plants 2. Backhuys Publisher, Leiden, The Netherlands, pp. 376-380.