

heroin exposure; drug and assay consideration and detection times, *J. Anal. Toxicol.* 15, 1-7.

3. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), New York, 2009

4. J. Gerostamoulos, K. Crump, I. M. McIntyre and O. H. Drummer (1993), Simultaneous determination of 6-monoacetylmorphine, morphine and codeine in urine using high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and electrochemical detection, *J Chromatography*, 617, 152-156.

Bước đầu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây đỉnh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms)

Hà Bích Hồng¹, Vũ Thị Thơm², Vũ Đức Lợi²
Lê Anh Tuấn², Nguyễn Thanh Hải^{2*}

¹ Đại học Lâm nghiệp

² Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

* E-mail: haipharm@yahoo.com

Summary

In-vitro propagation of *Polyscias fruticosa* (L. Harms) was studied on cleaning the explants, shoot regeneration and shoot multiplication. The initial materials from the plant underwent cleansing with 0.05% HgCl₂ for 10 minutes. The renewable rate of the shoots was relatively high, reaching 73.33%, mainly by shoot regeneration of apical meristems and from the dormant buds, 1st and 2nd from the top down. Regeneration shoots from clean *in-vitro* explants were subcultured into the creating multiple shoots medium (MS* + 2 mg/l BAP + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar). The creation rate of multiple shoots was 100% and the shoot multiplication averaged at 7.13 shoots per explant after 6 weeks.

Key words: *Polyscias fruticosa* L. Harms, multiple shoot, *in vitro*, multiplier shoots.

Đặt vấn đề

Cây đỉnh lăng lá nhỏ có tên khoa học là *Polyscias fruticosa* L. Harms, thuộc họ Ngũ gia bì (Araliaceae), là một cây thuốc quý được sử dụng nhiều để làm thuốc ở Việt Nam. Đỉnh lăng lá cây dạng bụi cao 1-2 m, vỏ thân màu trắng nhạt, nhẵn, có phân cành thấp, thân có mang những vết sẹo, lá hình chữ V và những nốt lồi vỏ, vỏ mùi thơm nhẹ; có chứa các alkaloid, glucosid, saponin, flavonoid, tannin, vitamin B1 các acid amin trong đó có lysin, systemin, và methionin Đây là các thành phần cần được chú ý nghiên cứu đánh giá và so sánh trong quá trình nghiên cứu phát triển giống^[1,2,4,6].

Đỉnh lăng được trồng bằng phương pháp giâm hom, thu hoạch sau 3 - 5 năm Phương pháp này đơn giản và thuận lợi để phát triển trong nhân dân nhưng có những hạn chế như: khó thu được lượng hom lớn để trồng trên diện rộng; không chọn được giống tốt do số hom thu được từ một cây có hạn. Nhu cầu thị trường ngày càng cao, đòi hỏi phải phát triển các vùng trồng qui mô lớn. Chính vì thế, nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây đỉnh lăng với hệ số nhân chồi cao là hết sức cần thiết nhằm đáp ứng được yêu cầu này. Đã có đề tài nghiên cứu trong nước theo hướng này, nhưng hệ số chồi còn ít và thời gian nuôi cấy kéo dài^[6]

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Bài báo này công bố một số kết quả bước đầu nhân giống cây đinh lăng bằng phương pháp nuôi cấy mô *in vitro* tạo hệ số nhân chồi cao thời gian nhân chồi ngắn.

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu, thiết bị nghiên cứu

- Chồi non và đoạn thân mang chồi ngủ của cây đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms).

- Cồn 70°; NaClO (tinh khiết); HgCl₂ (tinh khiết); H₂O₂; Môi trường tái sinh chồi MS (Murashige và Skoog); agar; nước cất; BAP: 6-benzyladenin; IBA: 3-indole butyric acid.

- Tủ nuôi cấy vô khuẩn.

Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng đỉnh sinh trưởng và đoạn thân mang mắt ngủ làm nguồn vật liệu khởi đầu (hình 1A).

tiến hành cắt bỏ lá và tách bỏ các bẹ lá khỏi phần thân. Tiếp theo, các mẫu trên được làm sạch sơ bộ bên ngoài bằng xà phòng và nước máy. Chuyển mẫu vào túi cây vô trùng, tiến hành rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần, sau đó rửa bằng cồn 70° trong 3 phút, loại bỏ cồn và rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Sử dụng 3 loại hóa chất là NaClO 50% , HgCl₂ 0,1% và 0,05% , H₂O₂ 10% với các thời gian khử trùng mẫu khác nhau (bảng 02), rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần và cấy vào môi trường tái sinh chồi MS (bảng 01). Khi mẫu tái sinh và bật chồi, sau 2 - 3 tuần thì cắt các chồi mới tái sinh và cấy chuyển sang môi trường tạo đa chồi NT (bảng 01)

Trong nghiên cứu này, các môi trường nuôi cấy được bổ sung 8 g/l agar; chỉnh pH đến 5,8; khử trùng ở nhiệt độ 118°C trong 20 phút. Mẫu cấy được nuôi trong phòng ở chế độ chiếu sáng 3000 lux, 16 giờ/ ngày; nhiệt độ 25 ± 2°C.

Bảng 1: Thành phần các loại môi trường nuôi cấy

Môi trường	Ký hiệu	Thành phần môi trường
Tái sinh chồi <i>in vitro</i>	MS0 - MS6	MS + 30g/l sucrose + 8g/l agar + (0 ÷ 2mg/l) BAP + (0 + 0,5mg/l) IBA
Tạo đa chồi	NT1-NT12	MS + (0,1 + 1,5mg/l) BAP + (0 - 1,0mg/l) IBA + (0 + 1,0mg/l) Kinetin + 30g/l sucrose + 8g/l agar

Ghi chú: MS: Murashige và Skoog; BAP: 6-benzyladenin; IBA: 3-indole butyric acid

Thực nghiệm và kết quả

Nghiên cứu tạo mẫu sạch tái sinh *in vitro*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nguồn vật liệu khởi đầu là chồi và hai loại hóa

chất khử trùng là HgCl₂ (0,05% và 0,1%) và NaClO 60%, kết quả cho thấy tỷ lệ mẫu sạch tái sinh tương đối cao đối với hóa chất khử trùng là HgCl₂ 0,05% (bảng 2).

Bảng 2: Ảnh hưởng của loại hóa chất và thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch, mẫu sạch tái sinh

CTTN	Hóa chất	Thời gian (phút)	Tổng số mẫu cây (mẫu)	Số mẫu sạch (mẫu)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Số mẫu tái sinh (mẫu)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
KT1	NaClO 60%	10	30	17	56,67	10	40,00
KT2	NaClO 60%	15	30	19	63,33	5	16,67
KT3	HgCl ₂ 0,1%	5	30	16	53,33	10	33,33
KT4	HgCl ₂ 0,1%	10	30	27	90,00	7	23,33
KT5	HgCl ₂ 0,1%	15	30	27	90,00	0	0,00

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

KT6	HgCl ₂ 0,1%	10	30	28	93,33	0	0,00
	H ₂ O ₂ 10%	10					
KT7	HgCl ₂ 0,05%	10	30	27	90,00	22	73,33
KT8	HgCl ₂ 0,05%	15	30	27	90,00	18	60,00

Kết quả trong bảng 2 thấy đối với hóa chất khử trùng là HgCl₂ 0,1% cho tỷ lệ mẫu sạch tương đối cao ở các thời gian khử trùng nhưng tỷ lệ mẫu tái sinh lại giảm khi tăng thời gian khử trùng, với thời gian khử trùng là 15 phút thì không có mẫu tái sinh. Sử dụng NaClO 60% trong thời gian 10 và 15 phút cho hiệu quả tạo mẫu sạch tái sinh lần lượt đạt 40% và 16,67%. Qua tham khảo một số nghiên cứu, chúng tôi sử dụng kết hợp HgCl₂ 0,1% trong thời gian 10 phút và H₂O₂ 10% trong thời gian 10 phút thu được tỷ lệ mẫu sạch cao nhất đạt (93,33%) nhưng lại không có mẫu tái sinh, các mẫu đều hóa nâu và chết. Khi giảm nồng độ HgCl₂ xuống còn 0,05% thì hiệu quả tạo mẫu sạch được cải thiện đáng kể. Với thời gian khử trùng là 10 và 15 phút đều cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 90% nhưng

kết quả tái sinh chồi lại tốt hơn (đạt 73,33%) ở thời gian khử trùng 10 phút. Đây là một kết quả tương đối cao đối với những nghiên cứu tạo mẫu sạch với nguồn vật liệu ban đầu là chồi.

Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi

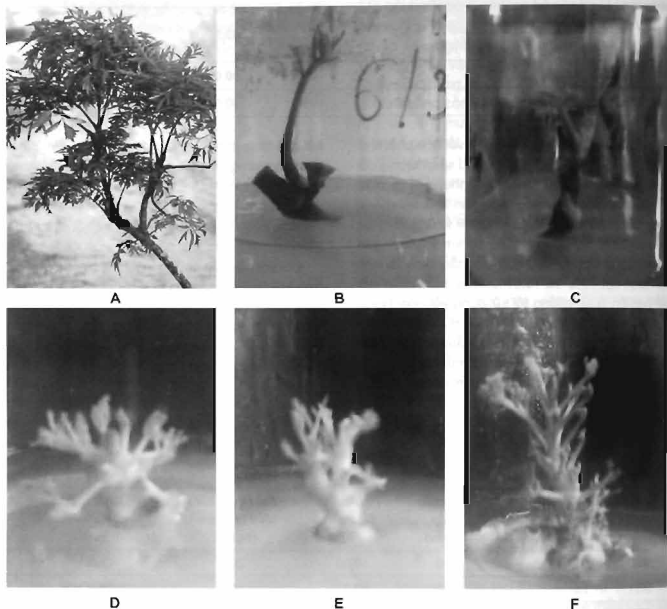
Đối với hầu hết những loài cây, môi trường cơ bản MS là môi trường thích hợp cho sự tái sinh chồi. Các mẫu sạch *in vitro* sẽ bắt đầu tái sinh từ đỉnh sinh trưởng hoặc là các mắt ngủ, nhưng do đỉnh lũng là loài cây lâu năm nên khả năng tái sinh tương đối chậm. Để giảm bớt thời gian trong một quy trình nhân giống, chúng tôi bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng vào môi trường cơ bản MS nhằm tìm ra môi trường tái sinh chồi tốt nhất, nhanh nhất cho cây đỉnh lũng (bảng 3)

Bảng 3: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi

CTMT	BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	Số mẫu cây (mẫu)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Thời gian bắt đầu tái sinh (ngày)	Chất lượng chồi
MS0	-	-	30	80,00	20	Chồi nhỏ
MS1	1,0	-	30	83,33	15	Chồi mập
MS2	1,0	0,3	30	90,00	15	Chồi mập
MS3	1,0	0,5	30	86,67	15	Chồi mập
MS4	2,0	-	30	90,00	15	Chồi mập
MS5	2,0	0,3	30	93,33	10	Chồi mập
MS6	2,0	0,5	30	100,00	10	Chồi xanh, khỏe và mập

Kết quả cho thấy các công thức môi trường khác nhau cho tỷ lệ mẫu tái sinh và chất lượng chồi khác nhau, tuy nhiên sự khác biệt là không nhiều. Ở công thức MS0 (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng) tỷ lệ mẫu tái sinh là thấp nhất, đạt 80% và sau 20 ngày mẫu mới bắt đầu tái sinh chồi, kích thước chồi nhỏ. Khi bổ sung BAP vào môi trường nuôi cấy (công thức MS1 và MS4) thì tỷ lệ mẫu tái sinh tăng lên đáng kể (đạt 90% ở công thức MS4) và thời gian bắt đầu tái sinh chồi cũng giảm (15 ngày ở cả

hai công thức), chất lượng chồi có xu hướng tốt hơn so với công thức môi trường không bổ sung BAP (hình 1B). Với kết quả khá quan trọng, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu sự ảnh hưởng phối hợp giữa BAP và IBA đến hiệu quả tái sinh chồi (công thức MS2, MS3, MS5, MS6). Tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất thu được trên môi trường MS6 (MS có bổ sung 2 mg/l BAP và 0,5 mg/l IBA), 100% mẫu tái sinh chồi và chỉ sau 10 ngày chồi bắt đầu tái sinh, các chồi mới đều xanh, mập mạp (hình 1C).



Hình 1: Hình ảnh chồi của các giai đoạn chính trong nghiên cứu nhân giống in vitro cây đinh lăng A: Các chồi sử dụng để tạo mẫu sạch; B: Chồi tái sinh trong môi trường MS4 (MS + 2,0 mg/l BAP); C: Chồi tái sinh trên môi trường MS6 (MS + 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA); D, E, F: Sự phát sinh đa chồi trên môi trường NT4, NT2, NT10

Kết quả nghiên cứu tạo đa chồi

Thí nghiệm kích thích tạo đa chồi được tiến hành với 10 công thức môi trường về ảnh hưởng riêng rẽ của BAP (1,0 + 3,0 mg/l), ảnh hưởng phối hợp của BAP với IBA (0,3 + 1,0 mg/l) và ảnh hưởng phối hợp của BAP với kinetin (0,3 + 1,0 mg/l). Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy các chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu tạo đa chồi và số chồi trung bình/mẫu cấy. Các công thức NT1 đến NT3 nghiên cứu ảnh hưởng riêng rẽ của BAP cho thấy ở nồng độ 2 mg/l BAP cho hiệu quả tạo đa chồi tốt nhất, có 83,33% mẫu tạo đa chồi với số chồi

trung bình/ mẫu tương đối cao là 4,25 chồi (bảng 4, hình 1E). Khi sử dụng BAP kết hợp với IBA hoặc BAP kết hợp với Kinetin đều cho kết quả tạo đa chồi thấp và chất lượng chồi kém. Với sự kết hợp của 2 mg/l BAP và 0,3 mg/l IBA cho tỷ lệ mẫu tạo đa chồi là 66,67%, có 2,87 chồi/ mẫu cấy (hình 1E), còn sự kết hợp giữa BAP và kinetin thì hiệu quả tạo đa chồi không tốt và gần như nhau ở tất cả các công thức. Để cải thiện tỷ lệ mẫu tạo đa chồi và hệ số nhân chồi, chúng tôi thí nghiệm thay đổi hàm lượng các chất trong môi trường cơ bản MS, cụ thể tăng hàm lượng các chất khoáng đa lượng lên gấp 1,5 lần so với môi trường MS

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

và bổ sung 2 mg/l BAP. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy 100% mẫu tạo đa chồi với số chồi trung bình/mẫu cấy đạt 7,13 chồi (bảng 4, hình 1F).

Bảng 4: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo đa chồi

CTMT	MTDD	Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Tỷ lệ mẫu tạo đa chồi (%)	Số chồi TB/mẫu (chồi)	Chất lượng chồi
		BAP	IBA	Kinelin			
NT1	MS	1,0	-	-	53,33	1,40	Kém
NT2	MS	2,0	-	-	83,33	4,25	Trung bình
NT3	MS	3,0	-	-	60,00	2,80	Trung bình
NT4	MS	2,0	0,3	-	66,67	2,87	Trung bình
NT5	MS	2,0	0,5	-	56,67	1,8	Kém
NT6	MS	2,0	1,0	-	50,00	1,53	Kém
NT7	MS	2,0	-	0,3	56,67	1,6	Kém
NT8	MS	2,0	-	0,5	56,67	1,4	Kém
NT9	MS	2,0	-	1,0	50,00	1,4	Kém
NT10	1,5MS	2,0	-	-	100,00	7,13	Tốt

Bàn luận

Trong nghiên cứu tạo mẫu sạch, hiện nay có rất nhiều phương pháp nhưng phương pháp được sử dụng phổ biến và đem lại hiệu quả cao là sử dụng hoá chất như HgCl₂ và NaClO. Tùy thuộc nồng độ và thời gian khử trùng khác nhau mà thu được lượng mẫu sạch cao nhất, nguồn mẫu ban đầu cũng ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả tạo mẫu sạch. Nếu nguồn mẫu ban đầu là chồi hay đoạn thân thì phương pháp khử trùng thường phức tạp hơn do những mẫu này tiếp xúc với môi trường nên mang rất nhiều nguồn bệnh như nấm, vi khuẩn. Nguồn mẫu là hạt thì phương pháp khử trùng đơn giản hơn do hạt được bao phủ bởi lớp vỏ cứng, tránh được nhiều nguồn bệnh. Tác giả Lê Thiên Thư (2005) cho rằng môi trường cơ bản MS có bổ sung 30 g/l sucrose và 7 g/l agar là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của chồi ngủ, từ chồi ngủ xuất hiện hai là mới sau 3 tuần nuôi cấy^[9]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chồi ngủ được nuôi trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l BAP và 0,5 mg/l IBA nên chỉ sau 10 ngày chồi bắt đầu tái sinh, xuất hiện là mới xanh tốt. Sự giảm thời gian của một giai đoạn nuôi cấy rất có ý nghĩa đối với một quy trình nhân giống *in vitro*.

Đã có một số nghiên cứu nuôi cấy mô trên đối tượng cây đinh lăng nhưng chủ yếu là theo hướng nuôi cấy tế bào để thu nhận saponin^[8,10]. Theo tác giả Trần Thị Liên (2005) thì môi trường

MS có bổ sung 2,0 mg/l BAP kích thích hình thành chồi tốt nhất, đạt 4,1 chồi/mẫu cấy sau 8 tuần nuôi cấy^[6]. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xác định được môi trường dinh dưỡng tốt nhất để nhân nhanh chồi, đồng thời rút ngắn thời gian nhân giống là môi trường 1,5 MS (hàm lượng các chất đa lượng tăng gấp 1,5 lần so với môi trường MS), kết hợp với 2,0 mg/l BAP, với hệ số nhân chồi đạt 7,13 chỉ sau 6 tuần nuôi cấy. Đinh lăng không tạo nhiều chồi từ mảnh mẫu cấy giống như những loài cây khác mà từ mỗi chồi mới hình thành lại xuất hiện rất nhiều chồi nách và có thể tách các chồi nách mới này để tiếp tục nhân lên với số lượng lớn, do đó mà hệ số nhân chồi tương đối cao đạt 7,13 chồi/mẫu cấy, gần gấp đôi so với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Liên và cộng sự (2005).

Đề tài đang được tiếp tục nghiên cứu đánh giá và so sánh trồng cây đinh lăng trên diện rộng bằng phương pháp giâm hom hiện tại với phương pháp sử dụng chồi thu được từ thực nghiệm nêu trên.

Kết luận

Đã bước đầu xây dựng được quy trình nhân giống cây đinh lăng lá nhỏ bằng phương pháp nuôi cấy mô - tế bào. Với những kết quả nghiên cứu này, có thể hoàn thiện thành một quy trình nhân giống đinh lăng với hệ số nhân chồi cao, chất lượng cây con tốt và đáp ứng nhu cầu về nguồn nguyên liệu cho ngành sản xuất dược

phẩm. Sử dụng nguồn vật liệu ban đầu là chồi, qua quá trình khử trùng, sau 2 tuần cho tỷ lệ mẫu sạch tái sinh cao nhất là 73,33%. Các mẫu sạch được tái sinh tốt nhất và nhanh nhất trên môi trường MS có bổ sung BAP 2 mg/l và IBA 0,5 mg/l. Trong môi trường tạo đa chồi (tăng các chất khoáng đa lượng trong môi trường MS lên 1,5 lần và bổ sung 2 mg/l BAP), 100% mẫu cấy tạo đa chồi và số chồi trung bình đạt 7,13 chồi/mẫu, chất lượng chồi tốt sau 6 tuần nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Đề tài này được thực hiện bằng nguồn kinh phí đề tài KHCN nhóm B của Đại học Quốc gia Hà Nội.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2002), *Dược điển Việt Nam III*, Nhà xuất bản Y học, trang PL 98, 128, 129
2. Đỗ Tất Lợi (1986), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, trang 268.
3. Lê Thiên Thư, Võ Thị Bạch Mai (2005), "Nghiên cứu về sự phát sinh hình thái trong nuôi cấy *in vitro* cây đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms", *Tạp chí phát triển KH&CN*, Đại học Quốc gia TP. HCM, Tập 8, Số 011-2005, trang 47-51.

4. Nguyễn Thị Thu Hương, Lương Kim Bích, Nguyễn Thới Nhâm (1987-2000), "Tác dụng dược lý của cao toàn phần chiết xuất từ rễ và lá đinh lăng", *Công trình nghiên cứu khoa học 1987-2000, Viện Dược liệu*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 241-244.

5. Nguyễn Như Khanh (2002), *Sinh học phát triển thực vật*, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, trang 77-81, 130.

6. Trần Thị Liên, Nguyễn Văn Thuận, Đoàn Thị Thanh Nhân, (2005), "Nghiên cứu nhân nhanh cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) bằng phương pháp *in vitro*", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 14, trang 39-44

7. Ngô Ứng Long (1977), "Tác dụng tăng lực và bổ chung của đinh lăng", *Tóm tắt công trình Đinh lăng 1964-1974*, Nội san Đại học Quân Y, trang 41-45.

8. Phạm Thị Tố Liên, Võ Thị Bạch Mai, "Bước đầu nghiên cứu tạo dịch treo tế bào cây đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms", *Tạp chí phát triển KH&CN*, Đại học Quốc gia TP. HCM, Tập 10, Số 07-2007, trang 11-16.

9. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, quyển II, Nhà xuất bản Trẻ, trang 668.

10. Marthur, A., Y N Shukla, et al (1994), "Saponin production in callus and cell suspension culture of *Panax quinquefolium*", *Phytochemistry Oxford*, 35 (5), 1221-1225

Hai hợp chất mới từ phần trên mặt đất cây đơn kim (*Bidens pilosa* L.)

Phạm Văn Vượng¹, Phạm Thanh Kỳ²
Nguyễn Thị Bích Thu³, Phan Văn Kiệt⁴

¹ Bệnh Viện Quân Y 17 - Quân Khu 5

² Đại học Dược Hà Nội, ³ Viện Dược liệu

⁴ Viện Hóa sinh Biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

* E-mail: vuongds17@gmail.com

Summary

From the aerial parts of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae), two new phytochemical compounds were isolated by combination of various chromatography methods. They were identified as sodium 3,5-dimethoxy-4-O- α -L-rhamnosyl-benzoate (BP19) and (R,R)-4-(hydroxymethyl)-5-[3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (BP20) by HR-ESI-MS, 1D-NMR and 2D-NMR.

Keywords: *Bidens pilosa* L., new compounds.