

NGHIÊN CỨU VI NHÂN GIỐNG CÂY LƯỢC VÀNG (*Callisia fragrans* Lindl.) VÀ SỰ TÍCH LŨY OLEANOLIC AXIT TRONG MÔ NUÔI CẤY

Nguyễn Hoàng Yên Thy^{1,*}, Bùi Thanh Hòa¹,

Phạm Hồng Diệp¹, Trần Văn Minh¹

TÓM TẮT

Cây Lược vàng là một trong những nguồn dược liệu để chữa trị các bệnh như: Nhiễm trùng, thoái hóa khớp, bỏng... Cây có chứa các hoạt chất có giá trị trong việc ức chế sự phát triển các tế bào ung thư, giúp tăng sức đề kháng tế bào và kích thích quá trình tái sinh tế bào. Vì vậy, cần thiết nghiên cứu nhằm bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu quý vùng nhiệt đới. Nghiên cứu xây dựng quy trình vi nhân giống *in vitro* cây lược vàng và phân tích hoạt chất oleanolic axit tích lũy. Chồi nảy mầm từ đốt thân cây thực sinh được sử dụng làm mẫu nuôi cấy. Trên môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA, cho tỷ lệ tái sinh chồi từ đốt thân là 82%. Nuôi cấy tạo cụm chồi trên môi trường có bổ sung 1 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA cho 1,46 chồi/mẫu. Nhân nhanh chồi trên môi trường có bổ sung 1 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA cho 5,87 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy. Chồi được nuôi cấy tạo rễ trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/l IBA có số rễ trung bình đạt 30 rễ/chồi, chiều dài rễ trung bình 3 cm trong 4 tuần nuôi cấy. Thuần hóa chồi trên giá thể đất sạch có tỉ lệ cây sống cao, sinh trưởng tốt, chiều cao cây đạt hơn 15 cm sau 2 tháng chăm sóc. Môi trường cơ bản MS có bổ sung kết hợp 2 mg/l 2,4D + 1 mg/l kinetin cho kết quả tạo mô sẹo tốt nhất, đạt tỷ lệ 76% sau 18 ngày nuôi cấy. Mô sẹo được cấy truyền trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l kinetin cho ra chỉ số sinh trưởng đạt 4,49. Phân tích hoạt chất cho thấy, có sự tích tụ saponin trong mô sẹo và chồi *in vitro*

Từ khóa: Cây Lược vàng, chồi non, cụm chồi, nuôi cấy chồi đỉnh, nuôi cấy mô sẹo, oleanolic axit, vi nhân giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Callisia fragrans (Lindl.) thuộc họ Commelinaceae (họ Thái Lài), hay còn gọi là cây Lược vàng, được trồng làm cây cảnh và dùng làm thuốc, có chứa nhiều thành phần hoạt tính sinh học khác nhau như: Flavonoid, axit phenolic và anthraquinone [1]. Các hoạt chất trong cây điều trị bệnh tim mạch, ung thư, bỏng và thoái hóa khớp [2]. Hai flavonoid chính được tìm thấy trong *C. fragrans* là quercetin (6,51%) và kaempferol (0,22%) [1]. Flavonoid có hoạt tính chống viêm đã được sử dụng để điều trị ung thư và ngăn ngừa tỷ lệ tử vong do tim mạch [3]. Ngoài ra, các hợp chất axit phenolic cũng là thành phần chống ung thư

trong các ứng dụng sản xuất dược phẩm [4]. Polyphenol không chỉ xuất hiện trong các phương pháp điều trị ung thư mà còn ngăn da người khỏi bị cháy nắng do hấp thụ tia UV [5]. Hơn nữa, ecdysteroid và axit amin có thể làm giảm lượng cholesterol trong máu, điều trị ung thư và chữa lành vết thương hở [6].

Bộ phận chính của cây Lược vàng được sử dụng có giá trị dược liệu là lá. Do nhu cầu về cây thuốc ngày càng tăng mạnh, dẫn đến áp lực khai thác liên tục lên tài nguyên thiên nhiên. Sự mất đa dạng sinh học do phá rừng và độc canh là nguyên nhân chính dẫn đến sự suy thoái của họ Thái Lài nói chung [7]. Trong khi đó, cây Lược vàng là cây thân thảo lâu năm và gặp nhiều trở ngại từ khâu gieo trồng đến thu hoạch trong thời gian dài. Những khó khăn trong quá trình trồng trọt như: Dịch bệnh, khả năng sinh tổng hợp, tích lũy hoạt

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

* Email: ythynguyen@yahoo.com; tvminh@hcmiu.edu.vn

chất phụ thuộc vào điều kiện sinh thái, canh tác, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật. Từ thực tế trên, nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Lược vàng nhằm bảo tồn, phát triển và nghiên cứu sự tích lũy oleanolic axit trong tế bào.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu ban đầu là các đốt thân được lấy từ cây Lược vàng một năm tuổi tại huyện Củ Chi, thành phố Hồ Chí Minh.

Môi trường dinh dưỡng cơ bản MS [8], có bổ sung 10% nước dừa, 20 g/l sucrose và 8 g/l agar được điều chỉnh pH = 5,8 - 6 trước khi hấp khử trùng. Có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (hormone): NAA (α -Naphthalenacetic acid), 2,4D (2,4-Dichloro-phenoxyacetic acid), IBA (Indol butyric acid), BA (6-Benzylaminopurine), Kinetin (N^6 -Furfuryladenine). Nguồn hóa chất: Công ty Sigma, Mỹ.

Điều kiện nuôi cấy: Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: 16 giờ chiếu sáng/8 giờ tối, cường độ ánh sáng 37,04 $\mu\text{mol/s/m}^2$, nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng mẫu

Thân cây được rửa bằng xà phòng loãng và rửa lại bằng nước sạch 2 - 3 lần. Các đốt thân được cắt rời và được khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút; khử trùng tiếp bằng hypochlorite sodium 5% có thêm 1 - 2 giọt tween 20 trong 30 phút; rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 1 phút. Sau đó, các đốt thân được cắt hai đầu và được cấy vào môi trường MS [8] có bổ sung BA (0 - 0,1 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 mg/l) để kích thích sự nảy mầm của chồi.

2.2.2. Nuôi cấy tái sinh chồi *in vitro*

Các đốt thân được cấy trên môi trường MS bổ sung BA (0 - 0,1 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 mg/l) để kích thích sự nảy mầm của chồi bên; thời gian nuôi cấy 4 tuần.

2.2.3. Nuôi cấy tạo cụm chồi *in vitro*

Chồi cây thu được sau khi nảy mầm (chiều cao 2 - 2,5 cm) được cắt ra và cấy trên môi trường MS bổ sung BA (0 - 0,5 - 1 - 2 - 3 mg/l) phối hợp

với các nồng độ khác nhau của NAA (0 - 0,25 - 0,5 mg/l); thời gian nuôi cấy 4 tuần.

2.2.4. Nhân nhanh chồi *in vitro*

Cụm chồi (2 - 3 chồi/cụm chồi) được đặt trên môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BA (0,5 - 1 - 2 - 3 mg/l), NAA (0 - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 0,75 mg/l) và IBA (0 - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 0,75 mg/l) riêng lẻ và kết hợp ở các nồng độ khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, các chồi đạt chiều cao trên 0,5 cm sẽ được thu giữ liệu hệ số nhân chồi.

Hệ số nhân chồi = Số chồi (sau 4 tuần)/Số chồi ban đầu

2.2.5. Nuôi cấy tạo rễ cho chồi *in vitro*

Các chồi có chiều cao 3,5 - 4 cm, sinh trưởng và phát triển tốt, được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung NAA (0 - 0,1 - 0,5 - 1 mg/l) và IBA (0 - 0,1 - 0,5 - 1 mg/l) kích thích tạo rễ; thời gian nuôi cấy 4 tuần.

2.2.6. Thuần hóa chồi trên vườn ươm

Chồi *in vitro* hoàn chỉnh, chồi có chiều cao 5 cm, có 4 tầng lá, bộ rễ tốt được chuyển ra điều kiện môi trường ngoài phòng thí nghiệm trong 3 ngày để thích nghi với nhiệt độ bên ngoài. Sau đó, cây được lấy ra khỏi bình, rửa sạch môi trường dinh dưỡng dính trên rễ và trồng vào chậu nhựa có chứa giá thể xơ dừa đã tiệt trùng và đất sạch; số liệu được ghi nhận sau 8 tuần.

2.2.7. Nuôi cấy tạo mô sẹo

Lá chồi *in vitro* được cắt ra thành các ô vuông có độ dài 1 cm^2 và được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung kinetin 1 mg/l và kết hợp với NAA (1 - 2 - 3 mg/l) và 2,4D (1 - 2 - 3 mg/l) tạo mô sẹo; thời gian nuôi cấy 4 tuần.

2.2.8. Cấy truyền mô sẹo trên agar

Mô sẹo xốp có màu trắng được tách khỏi lá. Khối lượng ban đầu mô sẹo được nuôi cấy là 0,1 g/cụm. Mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa, 2 g than hoạt tính, kinetin (0,1 - 0,5 - 1 mg/l), 2,4D (0,1 - 0,5 - 1 - 2 - 3 mg/l) và kết hợp giữa kinetin và 2,4D; thời gian nuôi cấy 4 tuần. Chỉ số sinh trưởng được thu nhận và tính theo công thức: $GI = W_f / W_i$.

Trong đó: W_f là khối lượng tế bào tại thời điểm 4 tuần sau nuôi cấy; W_i là khối lượng tế bào ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy - 0,1 g/cụm.

2.2.9. Phân tích hoạt chất oleanolic axit [9, 10]

Mẫu mô sẹo (sau 4 tuần nuôi cấy), mẫu chồi *in vitro* (sau 5 tháng), chồi *ex vitro* (sau 2 tháng) được phân tích oleanolic axit. Mẫu được sấy đến khối lượng không đổi ở 50°C để xác định khối lượng khô. Hàm lượng oleanolic axit tổng được xác định bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo Norhidayah và cs (2015) [10] có điều chỉnh phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

Điều kiện chạy HPLC: Nhiệt độ cột 30°C, cột Zorbax Eclipse-XDB C18 (5 μ m, 4,6 $\times$ 150 mm); tốc độ dòng chảy 1 ml/phút; detector đọc ở bước sóng 220 nm; pha tĩnh là silica gel và pha động là kênh A (H₂O) và kênh B (acetonitrile); chương trình pha động đồng đẳng 95% B. Quy trình phân tích HPLC được thực hiện trên hệ thống máy Agilent series 1200, với UV-VIS detector. Hàm lượng saponin tổng được tính dựa trên đường chuẩn oleanolic axit (OA). Kết quả biểu thị bằng số μ g (OA)/mg mẫu.

2.3. Bố thí thí nghiệm và phân tích số liệu

Các thí nghiệm trong phòng thí nghiệm được bố trí nhắc lại 3 lần mỗi nghiệm thức, mỗi lần 10 mẫu. Các chỉ tiêu được quan sát và thu số liệu sau

4 tuần nuôi cấy. Thí nghiệm thích nghi chồi ở môi trường bên ngoài được bố trí nhắc lại 3 lần mỗi công thức, mỗi lần 10 mẫu. Các chỉ tiêu được quan sát và thu số liệu sau 8 tuần. Số liệu được phân tích ANOVA bằng phần mềm SPSS v.22 với mức xác suất $p=0,05$.

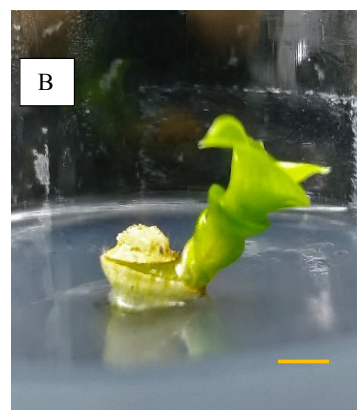
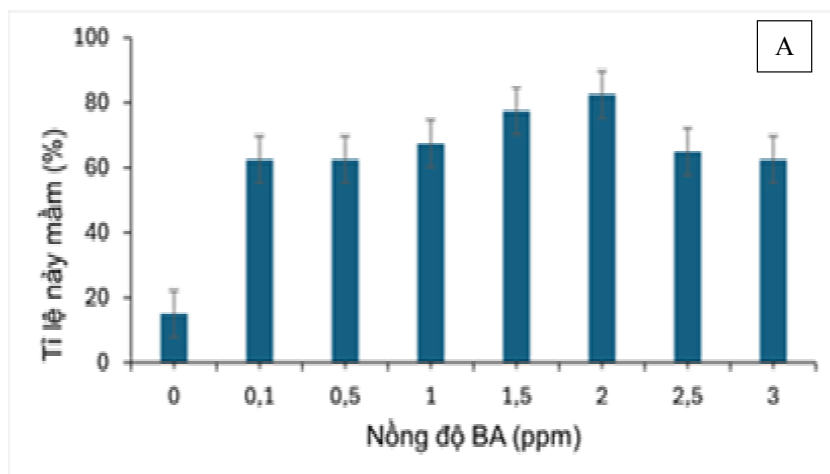
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nhân nhanh chồi *in vitro*

3.1.1. Nuôi cấy tái sinh chồi *in vitro*

Môi trường MS có bổ sung BA có nồng độ khác nhau được sử dụng nuôi cấy kích thích bật chồi từ đốt thân của mẫu nuôi cấy. Hình 1 cho thấy, sau 4 tuần nuôi cấy, tỉ lệ chồi nảy mầm cao ở trên môi trường bổ sung 2 mg/l BA là 82% so với đối chứng không có BA là 15% (Hình 1A). Có một số mẫu tạo mô sẹo trên bề mặt cắt của thân (Hình 1B). Môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA là thích hợp cho quá trình kích thích phát sinh chồi từ đốt thân.

Kết quả được ghi nhận trên cây hoa violet tím Ba Tư (*Persian violet*) [11]. BA tham gia vào quá trình điều hòa phân chia tế bào, hình thành chồi ngẫu nhiên và giảm ưu thế ngọn [12].



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến tỷ lệ nảy mầm của đốt thân sau 4 tuần nuôi cấy (A); hình thái nảy mầm của chồi trong môi trường nuôi cấy có chứa BA (Bar 0,5 cm (B))

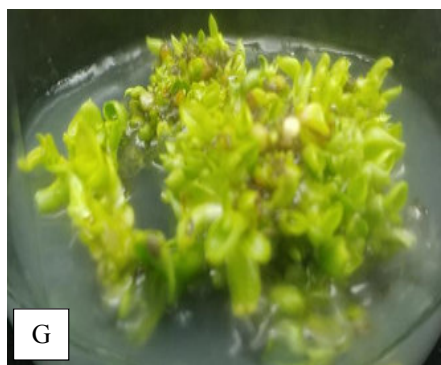
3.1.2. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và NAA đến tạo cụm chồi *in vitro*

Chồi có kích thước 1 cm được sử dụng làm mẫu cấy và nuôi cấy trên môi trường MS có nồng độ BA (0 - 1 - 2 - 3 mg/l) và NAA (0 - 0,25 - 0,5 mg/l) khác

nhau. Bảng 1 cho thấy, hệ số nhân chồi đạt cao nhất 1,2 chồi/mẫu, chiều cao thân chồi 0,62 cm ở nghiệm thức có bổ sung 1 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA (Hình 2). Tác động của BA và NAA đến quá trình nhân chồi cũng đã được Al-Drisi và cs (2022) [13] công bố.

Bảng 1. Ảnh hưởng của sự kết hợp BA và NAA đến tạo cụm chồi *in vitro* (sau 4 tuần nuôi cấy)

BA (ppm)	NAA (ppm)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)
0	0	$0,11 \pm 0,11$ e	$0,120 \pm 0,080$ e
0,5	0,25	$1,06 \pm 0,03$ bc	$0,420 \pm 0,020$ bc
1	0,25	$1,27 \pm 0,20$ ab	$0,630 \pm 0,008$ a
2	0,25	$0,80 \pm 0,05$ cd	$0,514 \pm 0,030$ ab
3	0,25	$0,73 \pm 0,03$ cd	$0,395 \pm 0,007$ bcd
0,5	0,5	$1,20 \pm 0,10$ ab	$0,420 \pm 0,020$ bcd
1	0,5	$1,46 \pm 0,12$ a	$0,590 \pm 0,008$ a
2	0,5	$0,60 \pm 0,05$ d	$0,375 \pm 0,007$ cd
3	0,5	$0,60 \pm 0,05$ d	$0,280 \pm 0,009$ d



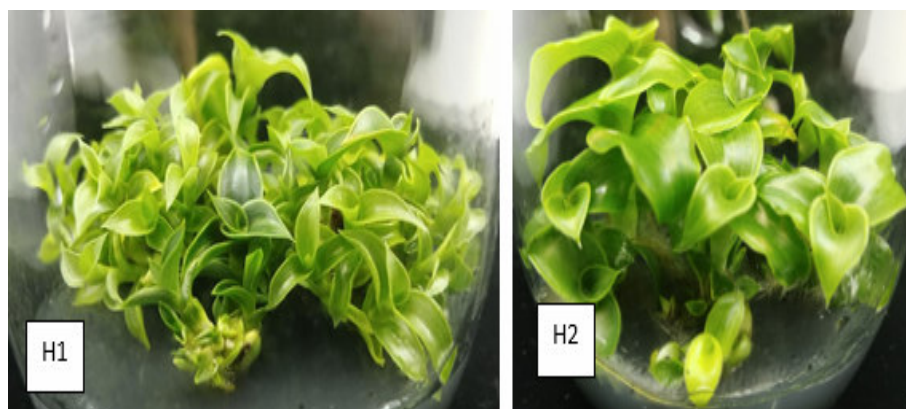
Hình 2. Phản ứng tạo cụm chồi của cây Lược vàng ở 1 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA (G) sau 4 tuần nuôi cấy (Bar A đến I - 1 cm)

3.1.3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA + NAA và BA + IBA đến nhân chồi *in vitro*

Cụm chồi (có 2 - 3 chồi nhỏ) được cấy truyền sang môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA kết hợp với NAA hoặc IBA. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, môi trường MS có 1 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA đạt hệ số nhân chồi cao nhất là 4,44 và môi trường bổ sung 1 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA cho hệ số nhân chồi đạt cao nhất 5,87 lần (Bảng 2, hình 3). Kết quả được ghi nhận sự kết hợp BA và IBA có hiệu quả trong việc nhân chồi cây môn lưỡng sắc (*Caladium bicolor*) [14].

Bảng 2. Ảnh hưởng của sự kết hợp BA + NAA và BA + IBA đến nhân cụm chồi (sau 4 tuần nuôi cấy)

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Hệ số nhân chồi
0	0		$1,10 \pm 0,10$ d
1	0,10		$2,71 \pm 0,17$ c
1	0,25		$3,08 \pm 0,19$ c
1	0,50		$4,44 \pm 0,24$ ab
1	0,75		$2,98 \pm 0,48$ c
1		0,10	$3,84 \pm 0,18$ bc
1		0,25	$4,38 \pm 0,82$ abc
1		0,50	$5,87 \pm 0,86$ a
1		0,75	$3,65 \pm 0,27$ bc



Hình 3. Phản ứng nhân chồi của cây Lược vàng ở 1 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA sau 2 tuần (H1) và sau 4 tuần nuôi cấy (H2) (Bar A đến I - 1 cm)

3.1.4. Nuôi cấy tạo rễ cho chồi *in vitro*

Chồi đơn, có chiều cao thân 2,5 - 3,5 cm, được tách ra từ những cụm chồi. Mẫu được cấy trên môi trường không và có bổ sung NAA, IBA đều ra rễ. Trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l IBA (Bảng 3) cho kết quả số lượng rễ cao nhất (30 rễ/chồi),

dài rễ 3,03 cm và môi trường có bổ sung 1 mg/l NAA cho số rễ 27 rễ/chồi, dài rễ 1,26 cm (Hình 4). Bộ rễ hình thành trên môi trường bổ sung IBA có hình dạng mảnh và nhiều rễ con, điều này cũng đã được ghi nhận trên loài hoa hoàng lan T. Yakawa (*D. trankimianum* T. Yukawa) [15].

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến sự tạo rễ *in vitro* (sau 4 tuần nuôi cấy)

NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Số rễ	Chiều dài (cm)
0	0	6,00 ± 0,57 c	4,56 ± 0,72 a
0,1		12,33 ± 1,45 c	2,46 ± 0,14 ab
0,5		25,00 ± 2,08 bc	3,56 ± 0,89 ab
1		27,00 ± 5,00 ab	1,26 ± 0,17 b
	0,1	12,33 ± 0,33 c	4,00 ± 0,76 ab
	0,5	17,00 ± 2,00 ab	3,00 ± 0,57 ab
	1	30,00 ± 3,60 a	3,03 ± 0,51 ab



Hình 4. Phản ứng tạo rễ của cây Lược vàng trên môi trường có bổ sung 1 mg/l IBA (*) (Bar - 1 cm)

3.1.5. Thuần hóa chồi trên vườn ươm

Giá thể để trồng cây là một yếu tố rất quan trọng trong việc tạo điều kiện thích nghi cho cây ngoài vườn ươm. Chồi *in vitro* đạt chiều cao từ 3,0 - 3,5 cm, có 4 - 5 lá, bộ rễ khỏe, sinh trưởng tốt, được cấy chuyển ra ngoài nhà lưới. Chồi cây Lược vàng sinh trưởng, phát triển tốt trên hầu hết các giá thể. Trên giá thể xơ dừa, có chiều cao chồi 9,02 cm sau 2 tháng (Bảng 4, hình 5). Chồi được trồng trong đất sạch có thân chồi cao hơn, lá dài hơn và có màu xanh đặc trưng. Chồi được trồng trong xơ dừa ít dinh dưỡng có thân chồi nhỏ hơn, lá có màu vàng nhạt nhưng có rễ phát triển và dài hơn do xơ

dừa thoáng và nhẹ (Hình 5). Nghiên cứu của Ara thuần hóa chồi cây mô trong nhà lưới và cs (2013) [16] cũng sử dụng giá thể đất sạch để

Bảng 4. Thuần hóa cây Lược vàng (sau 8 tuần)

Tuần	Đất xơ dừa		Đất sạch	
	Chiều cao thân (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều cao thân (cm)	Chiều dài lá (cm)
W1	3,5 ± 0,15	2,96 ± 0,13	3,00 ± 0,12	2,94 ± 0,11
W2	3,92 ± 0,13	3,09 ± 0,14	4,20 ± 0,12	3,50 ± 0,14
W3	5,37 ± 0,21	3,47 ± 0,13	6,61 ± 0,10	5,20 ± 0,19
W4	6,49 ± 0,26	4,37 ± 0,14	7,94 ± 0,15	6,11 ± 0,20
W5	7,31 ± 0,20	5,30 ± 0,13	11,22 ± 0,24	6,67 ± 0,21
W6	7,95 ± 0,17	5,31 ± 0,13	13,01 ± 0,20	6,95 ± 0,19
W7	8,43 ± 0,16	5,38 ± 0,13	14,49 ± 0,22	7,64 ± 0,21
W8	9,02 ± 0,10	5,39 ± 0,11	15,09 ± 0,30	7,99 ± 0,26



Hình 5. Chồi Lược vàng được trồng trong khay xơ dừa (B) sau 2 tháng (Bar - 1 cm)

3.2. Nuôi cấy mô sẹo

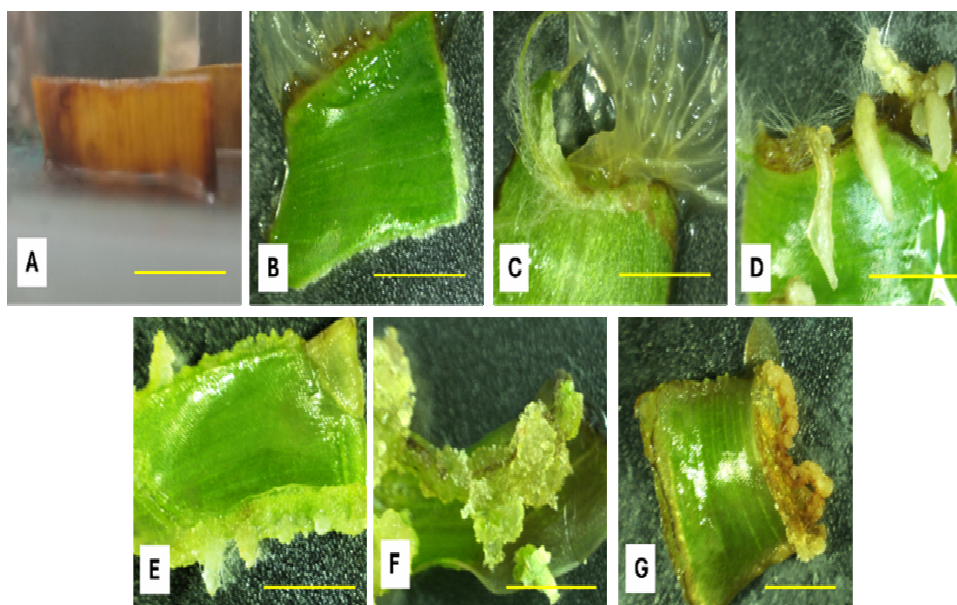
3.2.1. Nuôi cấy tạo mô sẹo

Lá *in vitro* được cắt thành từng đoạn hình vuông khoảng 1 cm². Mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung NAA và 2,4D có các nồng độ khác nhau. Nghiệm thức có bổ sung 2,4D thích hợp cho sự tạo mô sẹo từ lá Lược vàng. Nồng độ 1 - 2 mg/l 2,4D là thích hợp cho ra kết quả tạo mô sẹo tươi xốp, có màu trắng, không trong suốt (Bảng 5). Nồng độ 2,4D cao (3 mg/l) mô sẹo bị hóa nâu. Môi trường có NAA kích thích mô sẹo tạo rễ tốt hơn là cho sinh trưởng mô sẹo (Bảng 5). Thời gian tạo mô sẹo trên môi trường bổ sung 1 - 2 mg/l 2,4D và NAA cho kết quả 21 - 18 ngày.

Kết quả cũng được ghi nhận ở loài hoa cửu lý hương (*Ruta Chalepensis*) [17], cây chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam) [18, 19], cây riềng (*Pimpinella alpina*) [20].

Bảng 5. Ảnh hưởng của NAA và 2,4D đến sự tạo mô sẹo (sau 4 tuần)

NAA (mg/l)	2,4D (mg/l)	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Thời gian tạo mô sẹo (ngày)
0	0	-	-
1		7,30 ± 3,09	21,04 ± 2,09
2		7,30 ± 3,09	18,42 ± 1,30
3		5,70 ± 3,00	16,45 ± 1,27
	1	62,90 ± 6,94	21,58 ± 2,14
	2	76,80 ± 5,58	18,20 ± 1,58
	3	87,70 ± 5,15	15,43 ± 0,61



Hình 6. Sự tạo thành mô sẹo từ lá *in vitro* của cây Lược vàng với nồng độ kinetin 1 ppm và các tổ hợp auxin (NAA + 2,4D) khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy. Mẫu cấy trên môi trường không chứa chất điều hòa sinh trưởng (A); 1 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA (B); 1 mg/l kinetin + 2 mg/l NAA (C); 1 mg/l kinetin + 3 mg/l NAA (D); 1 mg/l kinetin + 1 mg/l 2,4D (E); 1 mg/l kinetin + 2 mg/l 2,4D (F); 1 mg/l kinetin + 3 mg/l 2,4D (G). Bar a đến g - 0,5 cm

3.2.2. Cấy truyền mô sẹo

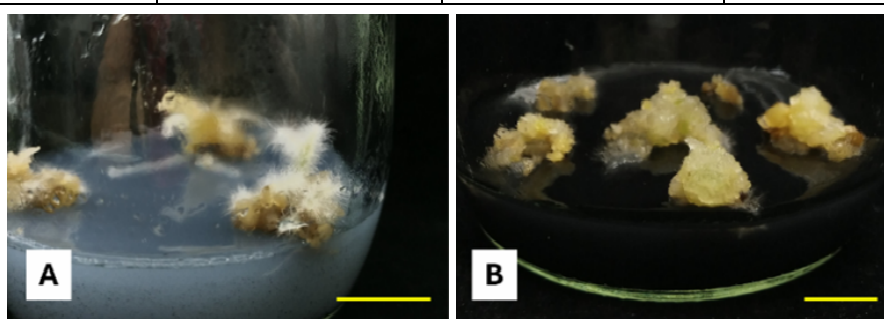
Sự phát triển của mô sẹo phụ thuộc vào tốc độ tăng trưởng và thành phần môi trường nuôi cấy. Với nồng độ thích hợp giữa auxin và cytokinin kích thích sự tăng sinh mô sẹo [21]. Bảng 6 cho thấy,

môi trường MS bổ sung 1 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l kinetin, mô sẹo có mức tăng trưởng cao 4,49; các mô sẹo đều xốp và có màu vàng nhạt sau 4 tuần nuôi cấy. Kết quả này cũng được ghi nhận ở loài cây họ măng tây (*Chlorophytum borivilianum*) [22].

Bảng 6. Ảnh hưởng của 2,4D và kinetin đến sự tăng sinh mô sẹo (sau 4 tuần)

2,4D (ppm)	Kinetin (ppm)	Khối lượng mô sẹo (g)	Tăng sinh mô sẹo
0	0	Ra rễ	-
0	0,1	Hóa nâu	-
0	0,5	Hóa nâu	-
0	1	Hóa nâu	-
0	2	Hóa nâu	-
0,1	0	$0,150 \pm 0,02$ ef	$1,50 \pm 0,04$ de
0,5	0	$0,137 \pm 0,04$ de	$1,37 \pm 0,46$ cd
1	0	$0,391 \pm 0,07$ bc	$3,91 \pm 0,58$ ab
2	0	$0,326 \pm 0,08$ ab	$3,26 \pm 0,47$ abc

0,1	0,1	$0,145 \pm 0,02$ de	$1,45 \pm 0,05$ cde
0,5	0,5	$0,286 \pm 0,04$ cd	$2,86 \pm 0,50$ abcd
1	0,5	$0,449 \pm 0,02$ de	$4,49 \pm 0,70$ a
2	0,5	$0,325 \pm 0,03$ de	$3,25 \pm 0,49$ abc
3	0,5	$0,299 \pm 0,03$ de	$2,99 \pm 0,44$ abc
1	1	$0,437 \pm 0,06$ a	$4,37 \pm 0,93$ a
2	1	$0,394 \pm 0,03$ a	$3,94 \pm 0,73$ ab
3	1	$0,322 \pm 0,05$ ab	$3,22 \pm 1,13$ bcd

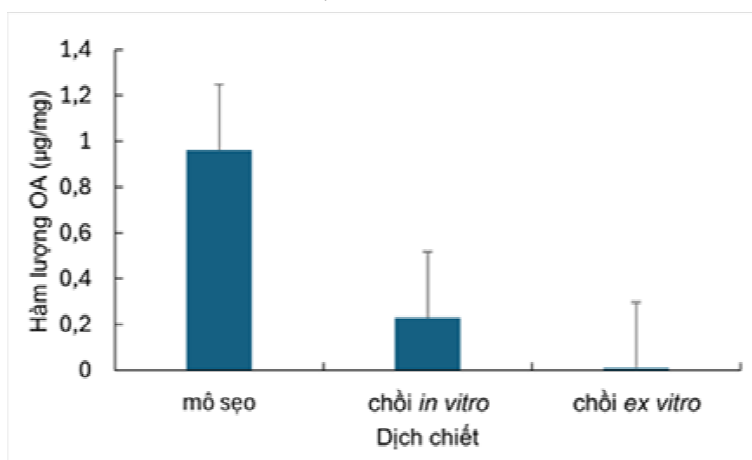


Hình 7. Cấy truyền mô sẹo Lược vàng sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường 2,4D kết hợp kinetin. Mẫu mô sẹo ra rễ trên môi trường không bổ sung 2,4D hay kinetin (A); mẫu mô sẹo tăng sinh tốt trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l kinetin (B) (Bar A, B - 1 cm)

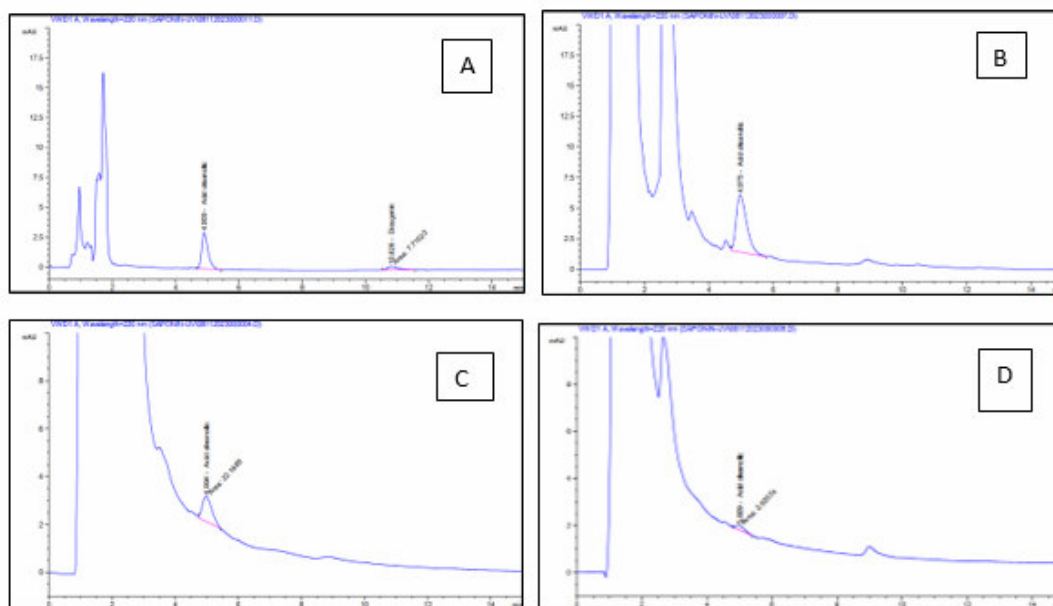
3.3. Phân tích hoạt chất

Kết quả phân tích HPLC mẫu dịch chiết từ mô sẹo 30 ngày tuổi trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 1 mg/l 2,4D + 1 mg/l kinetin, chồi *in vitro* 5 tháng tuổi và chồi *ex vitro* 2 tháng tuổi cho thấy, trên sắc ký đồ của tất cả các mẫu đều xuất hiện 1

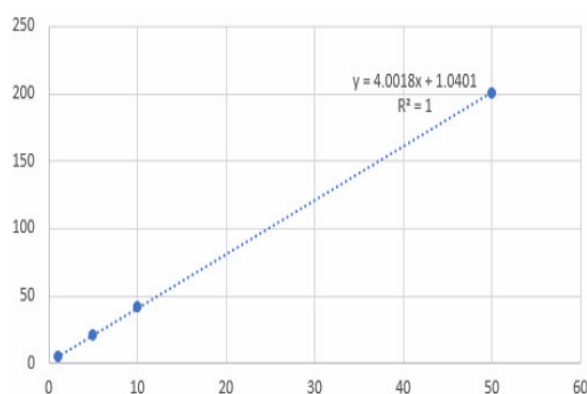
peak có thời gian lưu giống với thời gian lưu của chất chuẩn oleanolic axit (khoảng 5 phút) (Hình 8, 9, 10). Hàm lượng oleanolic axit trong mẫu mô sẹo cao nhất 0,96 $\mu\text{g}/\text{mg}$, mẫu chồi *in vitro* 0,23 $\mu\text{g}/\text{mg}$, chồi *ex vitro* 0,01 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Vì vậy, mẫu mô sẹo phù hợp để dùng chiết xuất oleanolic axit.



Hình 8. Kết quả phân tích hàm lượng saponin trong 3 mẫu Lược vàng: Mô sẹo, chồi *in vitro*, chồi *ex vitro*



Hình 9. Sắc ký đồ HPLC phân tích hoạt chất oleanolic axit chuẩn (A); dịch chiết mô sẹo cây lược vàng (B); chồi *in vitro* (C); chồi *ex vitro* (D)



Hình 10. Phương trình đường chuẩn oleanolic axit
 $y = 4.0018x + 1.0401$ ($R^2 = 1$)

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu thiết lập những thông số kỹ thuật nhân giống Lược vàng thông qua phương pháp cấy mô dùng đốt thân từ cây mẹ một năm tuổi. Môi trường dinh dưỡng MS thích hợp cho nuôi cấy. Mẫu cây được khử trùng với hypochlorite sodium 5% trong 30 phút. Kích thích mầm chồi ngủ từ đốt trên môi trường bổ sung 2 mg/l BA, tạo cụm chồi trên môi trường bổ sung kết hợp 1 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA, nhân nhanh cụm chồi trên môi trường có tổ hợp IBA 0,5 mg/l + 1 mg/l BA; nuôi cấy tạo rễ trên môi trường 0,5

mg/l NAA để tạo cây hoàn chỉnh; chồi được thuần hóa và trồng trên giá thể xơ dừa khi chuyển ra nhà lưới. Trong quá trình hình thành mô sẹo, môi trường bổ sung 1 - 2 mg/l 2,4D thích hợp để tạo mô sẹo nhanh và tươi xốp; cấy truyền mô sẹo nhằm tăng sinh mô sẹo trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4D + 1 mg/l kinetin. Phân tích hoạt chất oleanolic axit cho thấy có sự tích lũy trong tế bào mô sẹo và chồi *in vitro*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Olennikov D. N., Ibragimov T. A., Zilfikarov I. N. and Chelombit'ko V. A. (2008). Chemical composition of *Callisia fragrans* juice 1. Phenolic compounds. *Chemistry of Natural Compounds*, 44, pp. 776 – 777.
2. Chernenko T. V., Ul'chenko N. T., Glushenkova A. I. and Redzhepov D. (2007). Chemical investigation of *Callisia fragrans*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43, pp. 253 – 255.
3. Panche, A. N., Diwan, A. D. and Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, pp. 47.
4. Manach C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy and L. Jiménez (2004). Polyphenols: food

sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, pp. 727 - 747.

5. Panche A., Diwan A. and Chandra S. (2007). Phenolic compound biochemistry. *Choice Reviews Online*, 45(02), pp. 35 - 62.

6. Hang DTT, Hang NTM, Anh HLT, Nhiem NX, Hue CT, Binh PT, Dat NT, Nam NH, Yen PH, Minh CV (2015). ¹H and ¹³C NMR assignments of new ecdysteroids from *Callisia fragrans*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 53(5), pp. 379 - 382.

7. Nguyen, M. and Cho, J. (2009). Plant Genetic Resources in Lam Dong province - Vietnam: Brief in medicine plants and wild orchids situation. *Korean J. Plant Res*, 22(6), pp. 571 - 583.

8. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum*, 15, 473 - 497.

9. Dược điển Việt Nam 5 (2018). Phần 2: Cây Nguội tât. Trang 1275. <https://duocdienvietnam.com/nguu-tat/>

10. Norhidayah A, Vejayan J, Yusoff MM (2015). Detection and quantification of eurycoma none levels in Tongkat Ali herbal products. *Journal of Applied Sciences*, 15(7), pp. 999 - 1005.

11. Nisakorn S., Kitti B., Sompoch N., Parutuch L. and David W. M. Leung (2017). Microshoot culture of Persian violet: Plant regeneration and in vitro flowering, *Annals of Agricultural Sciences*, 62(1), pp. 105 - 111.

12. Mangena, P. (2020). Benzyl adenine in plant tissue culture- succinct analysis of the overall influence in soybean *Glycine max* (L.) Merrill. seed and shoot culture establishment. *Journal of Biotech Research*, 11, pp. 23 - 34.

13. Al-Drissi E. E., Majid A. I. and Abbas M. J. (2022). Effect of different combinations of Benzyl adenine and Naphthalene acetic acid on micropropagation of *Carica papaya* l. Hybrid plant in vitro. *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences*, 18, pp. 681 - 688.

14. Ahmed K. S., ME. Hoque, M. Shamsuzzaman, M. Sultana and MS. Islam (2023). In vitro regeneration of *Caladium bicolor*. *International Journal of Biosciences*, 22, pp. 132 -139.

15. H' Yon N. B., Tham D. T., Vinh T. T., Hoi Q. V., Cong V. K. and Duy N. V. (2020). In vitro propagation of the new orchid *Dendrobium trankimianum* T. Yukawa. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 16(4), pp. 649 - 657.

16. Ara T., Karim MR., Aziz MA, Karim R., Islam R., Hossain M. (2013). Micropropagation and field evaluation of seven strawberry genotypes suitable for agro-climatic condition of Bangladesh. *African Journal of Agricultural Research*, 8(13), pp. 1194 - 1199.

17. Jagadeesan, M., Srinivasan, S. and Mani, T. (2023). In vitro propagation of ruta chalepensis through and callus culture. *Journal of Advanced Zoology*, 44, pp. 752 - 756.

18. Al-Hamidi, A. O. A., Al-Hadedy, S. H. A. and Bashi, A. Z. A. K. (2023). Effect of 2,4-D and NAA in callus induction and differentiation from different explants of *Moringa Oleifera* Lam, IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 1252(1), pp. 012091.

19. Asfandiyar C., Kashif A., Neha F. and Nosheen M. (2019). Optimization of tissue culture protocol for regeneration and direct multiplication of *Moringa Oleifera* by seed germination. *International Journal of Advanced Research*, 7(4), pp. 547 - 555.

20. Faramayuda, F., Irwan, M. and Syam, A. (2022). The growth of *Pimpinella alpina* host callus at various treatments of plant growth regulator concentrations of NAA, 2,4-D and its combination with BAP. *Agric Jurnal Ilmu Pertanian*, 34, pp. 171 - 182.

21. Thomas G., Claire K., Claude P., Hubert G., David M. R. and Trevor A. T. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 32(4), pp. 272 - 289.

22. Jaafar J. N., Uma R. S., Nurashikin K. and Kumara S. M. (2016). Induction, subculture cycle, and Regeneration of callus in safed musli (*Chlorophytum borivilianum*) using different types of phytohormones. *Pharmacognosy Magazine*, 12(4), pp. 460 - 464.

STUDY OF MICROPROPAGATION OF LUOC VANG AND ACCUMULATION
OF OLEANOLIC ACID IN CULTURED TISSUES

Nguyen Hoang Yen Thy¹, Bui Thanh Hoa¹,

Phạm Hong Diep¹, Tran Van Minh¹

¹ School of Biotechnology, International University,

Vietnam National University Ho Chi Minh city

Summary

The Luoc vang tree (*Callisia fragrans* Lindl.) needs research to develop valuable medicinal resources in the tropics. The active ingredients of the Luoc vang plant have great value in inhibiting the growth of cancer cells, helping to increase cell resistance and stimulating cell regeneration. Sprouts from vegetative stem nodes are used as culture samples. On MS medium supplemented with 2 mg/l BA, the rate of shoot regeneration from stem nodes is 82%. Cultivation creates shoot clusters on medium supplemented with 1 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA for 1.46 shoots/sample. Rapid multiplication of shoots on medium supplemented with 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA gave 5.87 shoots/sample after 4 weeks of culture. Shoots were cultured to form roots on medium supplemented with 0.5 mg/l IBA, with an average number of roots reaching 30 roots/bud and an average root length of 3 cm in 4 weeks of culture. Acclimatized shoots on clean soil substrate has a high survival rate, good growth, tree height reaches more than 15 cm after 2 months of care. MS basic medium supplemented with a combination of 2 mg/l 2.4D + 1 mg/l kinetin gave the best callus formation results, reaching 76% after 18 days of culture. Callus was cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l 2.4D and 0.5 mg/l kinetin giving a growth index of 4.49. Analysis of active ingredients showed an accumulation of saponin (oleanolic acid) in callus (0.96 µg/mg) and shoots in vitro (0.23 µg/mg).

Keywords: *Callisia fragrans* (Lindl.), young shoot, shoot cluster, meristem culture, callus culture, oleanolic acid, micropropagation.

Người phản biện: TS. Nghiêm Tiến Chung

Ngày nhận bài: 29/3/2024

Ngày thông qua phản biện: 18/4/2024

Ngày duyệt đăng: 26/4/2024