

**XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC
TRONG MẪU LÁ CÂY XÁO TAM PHÂN (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill)
VÀ NGHIÊN CỨU SỰ PHÁT SINH HÌNH THÁI
TỪ CÁC NGUỒN MẪU KHÁC NHAU**

*IDENTIFICATION OF THE CHEMICAL COMPONENTS AND BIOACTIVITIES OF
Paramignya trimera (Oliv.) Guill. LEAF SAMPLES AND RESEARCH ON
MORPHOGENESIS FROM DIFFERENT EXPLANTS*

NGÔ THỊ XUYÊN^(*), NGUYỄN THỊ DUỖC^(), ĐẶNG THỊ KIM THÚY^(**), NGUYỄN THỊ HUYỀN
TRANG^(**), DƯƠNG ĐỨC HIẾU^(**), ĐỖ ĐĂNG GIÁP^(**), TRẦN TRỌNG TUẤN^(**)**

TÓM TẮT: Trong nghiên cứu này, thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây xáo tam phân ở ngoài vườn ươm được khảo sát. Kết quả cho thấy mẫu lá được chiết xuất bằng methanol có khả năng kháng oxy hóa với giá trị IC_{50} là 6,4349mg/ml và có khả năng kháng chủng vi khuẩn Gram (+) *Staphilococcus aureus* (đường kính vòng vô khuẩn 12mm). Bên cạnh đó, các thí nghiệm khảo sát về khả năng tạo mô sẹo và chồi cũng được tiến hành. Tỷ lệ mô sẹo được hình thành ở nghiệm thức có sử dụng TDZ và đạt tỷ lệ tốt nhất ở nồng độ 0,6mg/l với tỷ lệ là 76,19%. Tỷ lệ hình thành chồi cao nhất đạt 100% ở nghiệm thức sử dụng 3,0mg/l BA. Tuy nhiên, các chồi này yếu và dễ bị rụng. Để khắc phục tình trạng này, môi trường có bổ sung 3mg/l BA và nồng độ $FeSO_4$ thay đổi (cao gấp 3 lần so với môi trường MS ban đầu) được sử dụng để khảo sát trên mẫu cấy cây xáo tam phân, kết quả bước đầu cho thấy các chồi không bị gãy và xanh hơn.

Từ khóa: $FeSO_4$, kháng oxy hoá, kháng khuẩn, TDZ, xáo tam phân.

ABSTRACTS: The study investigates the chemical components and bioactivities of *Paramignya trimera* (Oliv.) Guill grown in a nursery. The results show that the leaf samples extracted using methanol have antioxidant ability, IC_{50} value of 6.4349 mg/ml, and the capability of fighting Gram (+) *Staphilococcus Aureus* (12mm diameter). In addition, the study conducts an experience on the ability of callus and shoot induction. The callus was formed in the treatment using TDZ, the best ratio was achieved at 0.6 mg/l at 76.19%. In particular, the highest shoot forming rate was 100% in the treatment using 3.0 mg/l BA; however, these shoots are weak and vulnerable. To overcome the situation, the scientists modified the environment by adding 3.0 mg/l BA and adjust the concentration of $FeSO_4$. The initial results show that the shoots in the new environment were greener and were not broken.

Key words: $FeSO_4$, antioxidant, bioactivities, TDZ, *Paramignya trimera*.

(*) PGS.TS. Trường Đại học Văn Lang, ngothixuyen@vanlanguni.edu.vn, Mã số: TCKH09-07-2018

(**) Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

1. GIỚI THIỆU

Xáo tam phân có tên khoa học là *Paramignya trimera* (Oliv.) Guill, thuộc họ cam chanh (Rutaceae), phân bố nhiều ở khu vực Nam Trung Bộ. Xáo tam phân có các thành phần như flavonoid, saponin, alkaloid, chủ yếu là coumarin và triterpenoid. Các thí nghiệm cho thấy, xáo tam phân có tác dụng gây độc đối với 5 dòng tế bào ung thư: ung thư đại tràng HTC116, ung thư vú MDA MB231, ung thư buồng trứng OVCAR-8, đặc biệt có tác dụng mạnh đối với dòng tế bào ung thư gan Hep-G2 và ung thư cổ tử cung Hela [17]. Năm 2015, Van Tang Nguyen và cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của các phương pháp và dung môi tách chiết các hoạt chất sinh học từ rễ xáo tam phân và khả năng chống oxy hóa của chúng [12]. Đến năm 2016, Van Tang Nguyen còn khảo sát sự ảnh hưởng của các phương pháp sấy khác nhau (thông thường, hút chân không, lò vi sóng, không khí nóng) lên thành phần hoạt chất sinh học và tính chất chống oxy hóa của rễ cây [13].

Do xáo tam phân có giá trị dược liệu to lớn nên hiện nay các cá thể xáo tam phân ngoài tự nhiên đang bị khai thác quá mức và có nguy cơ bị tận diệt. Ngày nay, sự phát triển của công nghệ nuôi cấy mô thực vật góp phần rất lớn trong việc bảo tồn các cây thuốc quý hiếm và đang bị đe dọa. Tuy nhiên, những nghiên cứu về nuôi cấy mô cây xáo tam phân vẫn còn hạn chế, chủ yếu tập trung vào nghiên cứu các hợp chất có hoạt tính sinh học có trong cây. Nghiên cứu được tiến hành nhằm tạo nguồn nguyên liệu ban đầu cho quá trình nuôi cấy *in vitro* cây xáo tam phân.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Lá và đốt thân của cây xáo tam phân (Ninh Diêm, Ninh Hòa) 02 năm tuổi trồng tại vườn ươm của phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Sinh học Nhiệt đới được sử dụng để làm mẫu cây.

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định thành phần hóa học và hoạt tính sinh học trong mẫu lá cây xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill)

Định tính HCTC trong mẫu lá xáo tam phân

Chuẩn bị dịch chiết: Tỷ lệ bột mẫu được chiết với EtOH 70% là 1:50. Ngâm mẫu 24 giờ. Lọc và thu dịch chiết.

Alkaloid: Lấy 5 ml dịch chiết, bổ sung 2 ml dung dịch acid chlorhidric và lắc nhẹ. Thêm 1 mL thuốc thử Dragendorff. Thấy xuất hiện tủa cam hoặc nâu đỏ cho thấy sự hiện diện của alkaloid [1].

Saponin: Bổ sung 5 ml nước cất vào ống nghiệm chứa 10 ml dịch chiết mẫu. Lắc mạnh, tạo bọt ổn định liên tục. Thêm vào hỗn hợp 3 giọt dầu olive và lắc mạnh. Quan sát thấy bọt biến mất và xuất hiện màu trắng sữa [1].

Triterpenoid: 5 ml dịch chiết được thêm vào 2 ml chloroform. Lắc nhẹ hỗn hợp, sau đó thêm từ từ 3 ml acid sulfuric theo thành ống nghiệm. Màu nâu đỏ xuất hiện cho thấy sự hiện diện của triterpenoid [1].

Flavonoid: 5 ml acid sulfuric được thêm vào ống nghiệm chứa 5 ml dịch chiết. Lóp màu vàng (nâu đỏ) xuất hiện, và biến mất sau khi lắc hỗn hợp cho thấy sự hiện diện của flavonoid [5].

Glycoside: Chuẩn bị 5 ml dịch chiết vào ống nghiệm, nhỏ vài giọt acid acetic lạnh. Sau đó bổ sung vài FeCl_3 và 5 ml acid sunfuric đậm đặc. Quan sát sự tách lớp của dung dịch: lớp trên có màu xanh lá, lớp dưới màu nâu đỏ [5].

Steroid: Thêm 5 ml chloroform vào ống nghiệm chứa 1 ml dịch chiết. Thêm 1 ml acid acetic và nhỏ 3 - 4 giọt acid sulfuric theo thành bình. Dung dịch tách lớp, lớp trên xuất hiện màu vàng có huỳnh quang xanh lá cho thấy sự hiện diện của steroid [5].

Phenolic: Nhỏ vài giọt chì acetate 5% vào ống nghiệm chứa 2 ml dịch chiết. Xuất hiện tủa trắng cho thấy sự hiện diện của phenolic [2].

Xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH

Khả năng bắt gốc tự do của cao chiết lá xáo tam phân được tiến hành theo phương pháp của Mensor [7]. Lấy 5g bột lá xáo tam phân và chiết với methanol. Cô quay ở 40°C để đuổi hết dung môi, thu được cao chiết methanol. Pha loãng cao trong methanol, sau đó lọc dung dịch qua than hoạt tính để loại bỏ diệp lục. Dịch chiết lá tiếp tục được cô quay chân không ở 40°C để loại dung môi và thu cao chiết. Cao chiết được pha loãng trong methanol thành dãy 5 nồng độ. Dung dịch acid ascorbic 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ được sử dụng làm chất đối chứng dương; methanol là chất đối chứng âm.

Chuẩn bị đĩa 96 giếng, mỗi giếng nạp 100 μl mẫu thử hoặc chất đối chứng và 100 μl dung dịch DPPH 300 μM . Lắc nhẹ và ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, đo mật độ quang học ở bước sóng $\lambda = 517 \text{ nm}$.

Hoạt tính ức chế gốc tự do của mẫu được tính theo công thức:

$$\text{Hoạt tính ức chế gốc tự do} (\%) = \left[1 - \frac{OD(\text{mẫu})}{OD(\text{chứng})} \right] * 100$$

Từ đường tuyến tính hoạt tính ức chế gốc tự do ở các nồng độ khác nhau, tính giá trị IC_{50} của mẫu. Giá trị IC_{50} càng thấp thì khả năng ức chế gốc tự do càng cao.

Kiểm tra khả năng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết lá xáo tam phân được phân tích theo phương pháp của Smânia [11]. Theo đó, mẫu lá được nghiền nhỏ thành bột và bảo quản ở 4°C . Sau đó ta lấy 5g mẫu và chiết với dung môi methanol. Dịch chiết được thu lại và cô quay để loại dung môi còn khoảng 1 ml cao chiết. Cao chiết methanol được pha loãng trong dung dịch DMSO 5% đến nồng độ 100mg/ml. Các dung dịch mẫu cũng được pha loãng để xác định hoạt tính kháng khuẩn.

Các chủng vi khuẩn được sử dụng để khảo sát là *Salmonella typhimurium* ATCC 29629, *Bacillus subtilis* NRRL B-354, *Staphylococcus aureus* NRRL B-313, *Pseudomonas aeruginosa* NRRL B-14781 và *Escherichia coli* ATCC 8739. Tất cả các chủng trên sẽ được nuôi cấy lắc trong môi trường LB lỏng, ở 37°C trong 24 giờ trước khi kiểm định.

Cấy trải 100 μl mỗi chủng vi khuẩn kiểm định ($10^8 \text{ CFU}/\text{ml}$) lên đĩa môi trường Mueller Hilton agar. Mỗi đĩa đục 4 giếng với đường kính 6 mm. Hút 100 μl mẫu cho vào các giếng trên đĩa thạch. 100 μl dung dịch DMSO 5% được sử dụng làm đối chứng âm. Đĩa cấy sau khi bơm mẫu được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Quan sát, đo vòng kháng khuẩn và ghi nhận kết quả.

2.2.2. Nghiên cứu sự phát sinh hình thái cây xáo tam thân từ các nguồn mẫu khác nhau

Bố trí thí nghiệm: Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu đến tỷ lệ sống của mẫu xáo tam thân

Đốt thân non được chọn làm mẫu cây là các ngọn chồi non phát sinh từ chồi bên khoảng 2 tháng tuổi. Mẫu lá được chọn là những lá không quá non và không quá già giúp dễ thao tác, tế bào ít bị tổn thương hơn khi khử trùng. Mẫu cây được khử trùng bề mặt bằng xà phòng loãng và sau đó được rửa sạch dưới vòi nước chảy khoảng 30 phút. Mẫu được tách riêng và đưa vào tủ cấy vô trùng để tiếp tục quá trình khử trùng.

Dung dịch HgCl_2 0,1% có bổ sung vài giọt Tween 20 được sử dụng để ngâm mẫu cây trong các khoảng thời gian 4, 8 và 12 phút. Sau đó, mẫu được rửa lại 3-4 lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu cây được cắt thành các lớp mỏng theo tiết diện ngang (0,2-0,5 mm) và cấy vào các bình nuôi cấy chứa 20 ml môi trường khoáng cơ bản MS [8] có bổ sung 30g/l sucrose, 8g/l agar.

Sau 10 ngày nuôi cấy xác định tỷ lệ mẫu nhiễm (%) và tỷ lệ mẫu sống vô trùng (%).

Ảnh hưởng của NAA, TDZ riêng lẻ lên khả năng hình thành mô sẹo của mẫu cây lá

Các mẫu lá không nhiễm được cấy chuyển vào các bình nuôi cấy chứa 20 ml môi trường MS cơ bản [8] có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, NAA với các nồng độ 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l và TDZ ở các nồng độ 0,0; 0,2; 0,6; 1,0 mg/l.

Sau 60 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận như tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%), hình thái mô sẹo.

Ảnh hưởng của BA lên khả năng tái sinh chồi từ mẫu cây đốt thân

Các mẫu cây đốt thân không nhiễm được cấy chuyển vào các bình nuôi cấy chứa 20 ml môi trường MS cơ bản [8] có bổ sung 30g/l sucrose, 8 g/l agar và BA với các nồng độ khác nhau (0, 1, 2, 3, 4 mg/l).

Theo dõi kết quả sau 60 ngày nuôi cấy dựa trên các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu hình thành chồi (%), hình thái chồi, số chồi trung bình/mẫu, chiều cao chồi (mm).

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu nhận bằng phần mềm Microsoft Excel và được xử lý theo phương pháp thống kê bằng phần mềm SPSS 16.0, theo phương pháp Duncan [4] với độ tin cậy $P \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học trong lá cây xáo tam phân (Paramignya trimera (Oliv.) Guill)

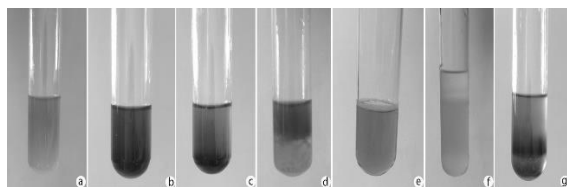
Định tính nhóm hợp chất thứ cấp có trong mẫu

Một số phản ứng và thay đổi màu sắc của từng phản ứng cụ thể được sử dụng để lọc nhóm hợp chất hoá học từ cao chiết methanol của bột lá cây xáo tam phân. Các xét nghiệm hóa học định tính cho thấy sự hiện diện của nhóm hoá học khác nhau như glycosid, phenolic, hợp chất alkaloid và saponin (Hình 1). Ngoài các hợp chất, chiết xuất methanol chứa flavonoid và các hợp chất triterpenoid nhiều hơn. Các tính chất từ các hợp chất được tìm thấy cho rằng chúng có thể được sử dụng trong dược phẩm.

Bảng 1. Kết quả định tính một số hợp chất thứ cấp từ dịch chiết bột lá tự nhiên của cây xáo tam phân *Paramignya trimera* ở nồng độ dung môi ethanol 70%

STT	Nhóm chất	EtOH(70%)
1	Alkaloid	+
2	Saponin	+
3	Triterpenoid	++
4	Steroid	-
5	Glycoside	+
6	Flavonoid	+++
7	Phenolic	+

Ghi chú: (-): không hiện màu đặc trưng; (+): hiện màu đặc trưng; (++) : hiện màu đậm; (+++): hiện màu rất đậm



Hình 1. Kết quả định tính một số hợp chất thứ cấp từ dịch chiết bột lá tự nhiên của cây xáo tam phân

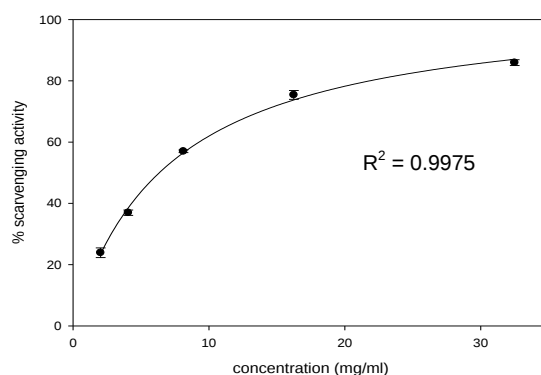
Ghi chú: a. alkaloid, b. flavonoid, c. glycoside, d. phenolic, e. saponin, f. steroid, g. triterpenoid

Khả năng kháng oxy hóa khử của mẫu lá xáo tam phân nuôi trồng ngoài vườn ươm

Khả năng kháng oxy hóa của mẫu lá cây xáo tam phân được thực hiện bằng khảo nghiệm DPPH. Khả năng nhạt rác của chiết xuất methanol trên DPPH gốc tự do đã được kiểm tra trong phạm vi nồng độ 32,5-2,03125 mg/ml. Kết quả cho thấy rằng chiết xuất methanol có khả năng kháng oxy hóa (Biểu đồ 1) với giá trị IC_{50} là 6,4349 mg/ml.

Bảng 2. Kết quả đo OD

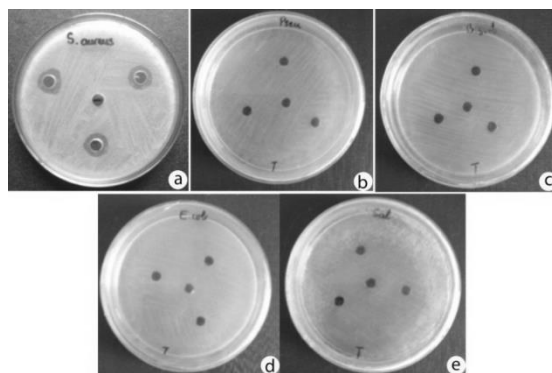
Nồng độ (mg/ml)	OD1	OD2	% Inhibitory	SD
32,5	0,165	0,15	85,9375	0,947018
16,25	0,287	0,264	75,40179	1,45209
8,125	0,485	0,478	57,00893	0,44192
4,0625	0,699	0,713	36,96429	0,883883
2,03125	0,865	0,84	23,8393	1,578363



Biểu đồ 1. Đồ thị tương quan giữa % ức chế gốc tự do và nồng độ cao chiết

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết từ lá xáo tam phân

Các chủng vi khuẩn được khảo sát để xem xét khả năng kháng khuẩn của mẫu dịch chiết lá xáo tam phân. Kết quả ở hình 2 cho thấy mẫu chỉ có khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn Gram (+) *Staphylococcus aureus* với đường kính vòng vô khuẩn 12mm và không có khả năng kháng các chủng vi khuẩn còn lại.



Hình 2. Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết từ mẫu lá cây xáo tam phân

3.2 Nghiên cứu sự phát sinh hình thái cây xáo tam thân trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu đến tỷ lệ sống của mẫu cây xáo tam thân

Các loại mẫu cây đốt thân và lá được khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 4, 8 và 12 phút. Sau 2 tuần nuôi cấy, kết quả được ghi nhận ở bảng 3. Các bình nuôi bắt đầu xuất hiện các trường hợp nhiễm nấm và khuẩn sau 5 ngày nuôi cấy. Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy thời gian khử trùng 8 phút là tốt nhất đối với mẫu cây lá và 12 phút đối với mẫu đốt thân non.

Bảng 3. Kết quả khử trùng mẫu cây xáo tam thân

Thời gian khử trùng mẫu (phút)	Mẫu lá		Mẫu đốt thân	
	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
4	86,67a	23,33b	100,00a	0,00b
8	16,67b	76,67a	55,56b	33,33ab
12	13,33b	63,33a	22,22b	66,67a

Ảnh hưởng của NAA, TDZ riêng lẻ lên khả năng hình thành mô sẹo của mẫu cây lá

Quá trình phát sinh hình thái trong nuôi cấy *in vitro* thực chất là kết quả của quá trình biệt hóa và phản biệt hóa. Quá trình này phụ thuộc vào tỷ lệ của hai nhóm chất ĐHSTTV. Nguồn auxin thường được sử dụng cho sự phát sinh hình thái ở các loài thực vật là NAA. NAA có hoạt tính mạnh nên kết hợp chặt chẽ với các thành phần dinh dưỡng trong nuôi cấy mô để kích thích sự tăng trưởng của tế bào và điều hòa sự phát sinh hình thái của mô sẹo.

Ở thí nghiệm này, ảnh hưởng của NAA riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cây lá được khảo sát. Tuy nhiên, sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả thu thập (bảng 4) không cho thấy sự đáp ứng của mẫu đối với môi trường nuôi cấy. Kết quả này khác với kết quả nghiên cứu của Trần Trọng Tuấn và cộng sự (2014) khi nghiên cứu trên cây bá bệnh [14]. Nghiên cứu cho thấy ở các nghiệm thức sử dụng NAA, các mẫu lá đều tạo mô sẹo và nghiệm thức sử dụng 2,5 mg/l NAA cho hiệu quả tốt nhất với 61,2% tỉ lệ mẫu tạo sẹo trong điều kiện nuôi cấy tối. Điều này có thể do các nhóm auxin ảnh hưởng khác nhau đối với từng loại cây khác nhau.

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA và TDZ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá xáo tam thân

NAA (mg/l)	TDZ (mg/l)	Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)	Hình thái
-	0,0	0,00c*	Mẫu hoá nâu, không hình thành mô sẹo
-	0,2	38,10b	Mô sẹo xốp có màu vàng, hình thành ở gân lá
-	0,6	76,19a	Mô sẹo xốp có màu vàng, hình thành ở hầu hết lá
-	1,0	57,14ab	Mô sẹo xốp có màu vàng, hình thành ở hầu hết lá
0,5	-		Mẫu vẫn còn xanh, nhưng không đáp ứng
1,0	-		Mẫu vẫn còn xanh, nhưng không đáp ứng
1,5	-		Mẫu vẫn còn xanh, nhưng không đáp ứng
2,0	-		Mẫu vẫn còn xanh, nhưng không đáp ứng

*Các mẫu ký tự khác nhau (a, b, ...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa $P \leq 0,05$ bằng phép thử Duncan

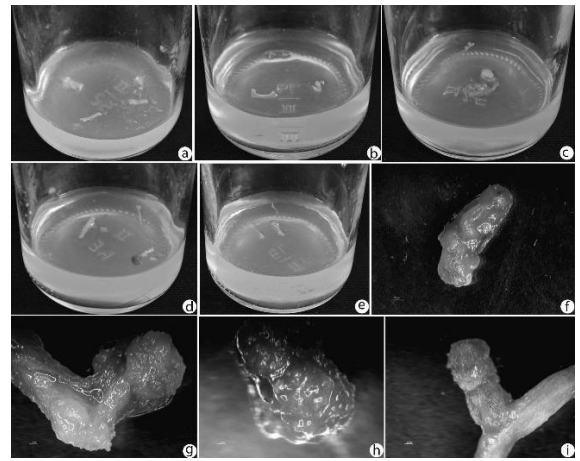
TDZ là chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm cytokinin có khả năng kích thích phân chia tế bào, thay đổi ưu thế ngọn

và phân hóa chồi trong nuôi cấy mô, và đặc biệt là trong những nghiên cứu về quá trình tái sinh chồi bất định ở cây dâu tây [9]. TDZ được cho là có tác dụng làm tăng hàm lượng cytokinin nội sinh bằng cách ức chế hoạt động của cytokinin oxydase.

Trong môi trường MS có bổ sung TDZ nồng độ từ 0,2-1,0 mg/l, mô sẹo bắt đầu hình thành chậm sau khoảng hơn 30 ngày nuôi cấy. Kết quả thu được sau 60 ngày nuôi cấy, tỷ lệ mô sẹo được hình thành ở nghiệm thức có sử dụng TDZ và đạt hiệu quả tốt nhất ở nồng độ 0,6 mg/l với tỷ lệ mẫu tạo sẹo là 76,19% và không có sự hình thành mô sẹo ở nghiệm thức đối chứng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Trần Trọng Tuấn và cộng sự (2014) [14]. Khi các mẫu cây lá cây bá bệnh được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung TDZ, tỷ lệ hình thành mô sẹo đạt mức cao và cao hơn khi sử dụng NAA. Ở nghiệm thức có bổ sung 0,6 mg/l TDZ, tỷ lệ hình thành mô sẹo của mẫu lá cây bá bệnh đạt cao nhất (32,6%) so với các khảo sát còn lại. Trong nhóm cytokinin, TDZ có hoạt tính sinh học mạnh nên chỉ cần hiện diện ở nồng độ thấp trong môi trường nuôi cấy, đặc biệt trong vi nhân giống. Mặt khác, TDZ chống lại sự phân hủy gây ra do các tác nhân oxy hóa cytokinin, do đó TDZ bền vững trên môi trường nuôi cấy [6]. Về mặt hình thái, hầu hết mô sẹo đều xốp và có màu vàng đậm.

Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu cây đốt thân

Skoog và Miller cho rằng cytokinin tác động đến quá trình hình thành chồi thông qua sự kiểm soát các quá trình tổng hợp một số loại protein [10].



Hình 3. Ảnh hưởng của NAA, TDZ lên sự phát sinh hình thái của mẫu

Ghi chú: **a.** Môi trường bổ sung NAA; **b.** 0,2 mg/l TDZ; **c.** 0,6 mg/l TDZ; **d.** 1,0 mg/l TDZ; **f-i.** hình thái mô sẹo

Khi bổ sung cytokinin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy, sự thay đổi gradient nồng độ chất điều hòa sinh trưởng diễn ra đồng thời thiết lập một gradient nồng độ chất điều hòa sinh trưởng mới. Điều này giúp phá vỡ trạng thái ngủ và kích thích sự phát triển chồi.

Trong nghiên cứu này, khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng tái sinh chồi từ việc nuôi cấy đốt thân được thực hiện. Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả về sự hình thành chồi được ghi nhận ở bảng 5. Kết quả nghiệm thức sử dụng BA với nồng độ từ 1,0 - 4,0 mg/l đều có sự hình thành chồi. Tỷ lệ hình thành chồi cao nhất đạt 100% ở nghiệm thức sử dụng 3,0 mg/l BA, tiếp theo là nghiệm thức sử dụng 4 mg/l BA, tỷ lệ hình thành chồi đạt 83,33%. Ở các nghiệm thức sử dụng nồng độ BA thấp (1,0-2,0 mg/l), tỷ lệ hình thành chồi thấp (trung bình khoảng 50%). Trong nghiên cứu của Đỗ Đăng Giáp và cộng sự (2012) trên cây chuối *Musa* spp., kết quả cũng cho thấy khi sử dụng BA ở nồng độ cao thì tỷ lệ

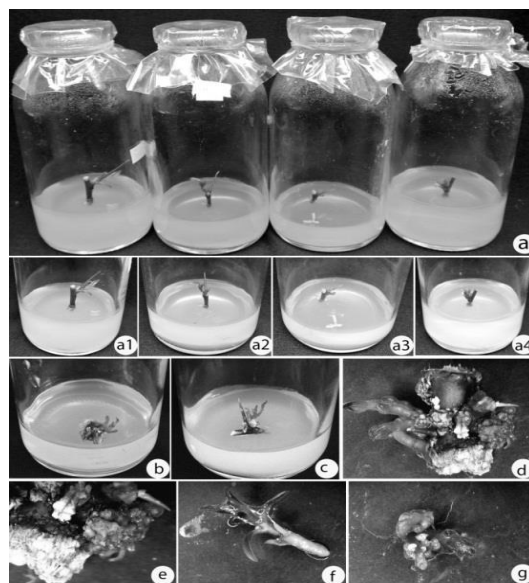
hình thành chồi tốt hơn so với sử dụng BA ở nồng độ thấp. Trên môi trường có nồng độ 3,0-5,0 mg/l BA, số lượng chồi hình thành cao hơn so với các nghiệm thức còn lại [3]. Kết quả này cũng tương tự với khảo sát đang thực hiện. Khi sử dụng nồng độ BA cao thì số chồi hình thành cao (2,67 chồi đối với nghiệm thức sử dụng 3,0 mg/l BA và 1,92 chồi đối với nghiệm thức sử dụng 4,0 mg/l BA).

Bảng 5. Ảnh hưởng của BA lên khả năng hình thành chồi xáo tam phân

BA (mg/l)	Số chồi hình thành	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Hình thái
1	1,40b*	50,00	Chồi bị vàng lá và rụng
2	1,17b	58,33	Chồi bị vàng lá và rụng
3	2,67a	100,00	Chồi bị vàng lá và rụng
4	1,92ab	83,33	Chồi bị vàng lá và rụng

*Các mẫu ký tự khác nhau (a, b, ...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa $P \leq 0,05$ bằng phép thử Duncan

Về mặt hình thái, chiều cao chồi hầu hết chỉ đạt từ khoảng 3,0 mm trở xuống. Các chồi nuôi cấy trên môi trường BA với các nồng độ 1,0-4,0 mg/l, hầu hết các chồi lá đều bị vàng và rụng. Trong nghiên cứu của Huong và cộng sự trên cây mâm xôi đỏ (*Rubus alcearfolius* Poir.), các mẫu nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA cũng có hiện tượng chồi bị vàng lá dẫn đến rụng [15].



Hình 4. Ảnh hưởng của BA lên sự hình thành chồi với các nồng độ lần lượt là: **a1.** 1,0 mg/l, **a2.** 2,0 mg/l, **a3.** 3,0 mg/l, **a4.** 4,0 mg/l; **b,c,d,e.** chồi được cấy trên môi trường cải tiến có nồng độ FeSO_4 tăng gấp 1,5 lần; **f,g.** Nhân nhanh chồi.

Để khắc phục hiện tượng này, tác giả cũng đã khảo sát ảnh hưởng của nồng độ FeSO_4 khác nhau lên chất lượng chồi hình thành. Kết quả cho thấy khi nuôi cấy chồi mâm xôi đỏ trên môi trường MS đã thay đổi nồng độ FeSO_4 (cao gấp 3 lần so với môi trường MS cơ bản) thì số lượng chồi hình thành cao hơn, các chồi khỏe mạnh và lá có màu xanh. Do đó, để khắc phục việc gãy chồi và rụng lá ở chồi cây xáo tam phân, môi trường có bổ sung 3,0 mg/l BA và nồng độ FeSO_4 thay đổi (cao gấp 3 lần so với môi trường MS ban đầu) được sử dụng để khảo sát trên mẫu cây xáo tam phân, kết quả bước đầu cho thấy các chồi không bị gãy và xanh hơn (Hình 4 b,c). Bên cạnh đó, khi quan sát về mặt hình thái, các mẫu chồi có sự hình thành mô sẹo vàng ở vết cắt (Hình 4d, 4e). Theo Zawadzka và Orlikowska (2006), sắt đóng vai trò quan trọng trong việc tái sinh cây [16]. Sắt là

nhân tố xúc tác trong việc hình thành diệp lục và vận chuyển oxy. Thiếu sắt, lá biến thành màu vàng hoặc nâu làm giảm sức sống của cây.

Trong nghiên cứu này, khả năng nhân nhanh chồi cũng đã được khảo sát dưới tác động của BA, tuy nhiên khi cắt các chồi và cấy chuyển qua môi trường nhân nhanh thì hầu hết mẫu bị chết, các phần tiếp xúc với môi trường bị hóa nâu hoặc không phát triển (Hình 4f). Một số mẫu có sự hình thành mô sẹo (Hình 4g) và chồi nhỏ, tuy nhiên, những chồi này không phát triển chỉ khoảng 2 mm trở xuống.

4. KẾT LUẬN

Chiết xuất methanol của mẫu lá cây xáo tam phân có khả năng kháng oxy hóa với giá trị IC_{50} là 6,4349 mg/ml. Mẫu chỉ có khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn Gram (+) *Staphylococcus aureus* (đường kính vòng vô khuẩn 12 mm).

Thời gian khử trùng 8 phút bằng $HgCl_2$ 0,1% là tốt nhất đối với mẫu cấy là lá và 12 phút đối với mẫu đốt thân non. Tỷ lệ mô sẹo được hình thành ở nghiệm thức có sử dụng TDZ và đạt tỷ lệ tốt nhất ở nồng độ 0,6 mg/l với tỷ lệ là 76,19%. Tỷ lệ hình thành chồi cao nhất đạt 100% ở nghiệm thức sử dụng 3 mg/l BA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ayoola G., Coker H., Adesegun S., Adepoju-Bello A., Ezennia E., and Atangbayila T., (2008), *Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7 (3).
- [2] Ben I., Woode E., Abotsi W., and Boakye-Gyasi E. (2013), *Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant properties of Trichilia monadelpha (Thonn.) J. J. de Wilde (Meliaceae)*, Journal of Medical and Biomedical Sci, 2 (2).
- [3] Đỗ Đăng Giáp, Phạm Ngọc Vinh, Trần Trọng Tuấn, Nguyễn Thị Huyền Trang, Phạm Ngô Ánh Thư, Thái Xuân Du (2012), *Tăng hệ số nhân nhanh chồi chuối laba (Musa sp.) nuôi cấy in-vitro bằng cách sử dụng ánh sáng, myo-inositol và adenin sulphate*, Journal of Biology, 34 (3se).
- [4] Duncan D.B. (1955), *Multiplerangeand multiple F test*, Biometrics, 11.
- [5] Jaradat N., Hussien F., and A. Ali. (2015), *Preliminary phytochemical screening, quantitative estimation of total flavonoids, total phenols and antioxidant activity of Ephedra alata Decne*, J. Mater. Environment. Sci., 6 (6).
- [6] Liberman R., Liat S., Ada N.L., Dalia E., Moshe R., and O.S. Michal. (2001), *Shoot regeneration from leaf explants of Brunfelsia calycina*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 100 (3).
- [7] Mensor LL, Menezes FS, Leitao GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, et al., (2001), *Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH*

- free radical method*, Braz Dent J 23(1) 2012 DPPH assay of solutions used for bleached teeth 27 Phytother Res;15.
- [8] Murashige T., and F. Skoog. (1962), *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*, Physiology Plant 15.
- [9] Passey A.J., Barrett K.J., and D.J. James. (2003), *Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (Fragaria x ananassa Duch.) using a range of explant types*, Plant Cell Rep, 21.
- [10] Skoog F., and Miller C.O. (1957), *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue and culture in-vitro*, Symp. Soc. Biol., 11.
- [11] Smânia A.Jr., Delle Monache F., Smânia E.F.A., and Cuneo R.S. (1999), *Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from Ganoderma applanatum (Pers.) Pat, (Aphylllophoromyce-tideae) fruit body*, International journal of Medicinal Mushrooms, 1.
- [12] Tang N.V, Michael C.B, Quan Van Vuong, Van Altena I.A., Scarlett C.J., (2015), *Phytochemicals and antioxidant capacity of Xao tam phan (Paramignya trimera) root as affected by various solvents and extraction methods*, Industrial Crops and Products, 65.
- [13] Tang N.V., Ngoc Minh Quynh Pham, Quan V.V., Michael C.B., Van Altena I.A. & Scarlett C.J., (2016), *Phytochemical retention and antioxidant capacity of xao tam phan (Paramignya trimera) root as prepared by different drying methods*, Drying Technology, 34(3).
- [14] Trần Trọng Tuấn, Nguyễn Thị Huyền Trang, Đỗ Quốc Trường, Nguyễn Thị Kim Loan, Đỗ Đăng Giáp, Nguyễn Hải Sơn, Vũ Ngọc Dung, Thái Xuân Du (2014), *Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào để cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu lá cây bá bệnh nuôi cấy in-vitro*, Journal of Science and Technology 52 (4D).
- [15] Trinh Thi Huong, Tran Trong Tuan, Do Dang Giap (2016), *The influence of factors to the regeneration of red raspberry (Rubus alceaefolius Poir.)*, Proceeding of the 2nd national scientific conference on biological research and teaching in Vietnam, 1059-1067.
- [16] Zawadzka M. and Orlikowska T., (2006), *Factors modifying regeneration in vitro of adventitious shoots in five red raspberry cultivars*, J. Fruit Ornament. Plant Res., 14, http://duoclieu.namviet.com/tin-tuc/cong-van-vien-duoc-lieu-bo-y-te_998.html.

Ngày nhận bài: 10-3-2017. Ngày biên tập xong: 27-3-2018. Duyệt đăng: 19-5-2018.