

ẢNH HƯỞNG CỦA COLCHICINE ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO TỬ BỘI Ở RỄ TƠ ĐÌNH LĂNG LÁ NHỎ (*Polyscias fruticosa* L. Harms)

Nguyễn Huỳnh Cẩm Tú¹, Trần Thị Ngọc Hà¹, Hoàng Văn Dương¹,
Lê Tấn Đức¹, Lương Thị Yên², Phan Tường Lộc¹

¹ Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Rễ tơ Đình lăng lá nhỏ được coi là nguồn vật liệu mang nhiều ưu điểm vượt trội về mặt sinh khối cũng như hàm lượng hoạt chất, dễ thích ứng khi nuôi ở các quy mô khác nhau. Nghiên cứu thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng colchicine đến khả năng tạo thể đa bội từ nguồn vật liệu rễ tơ Đình lăng. Kết quả cho thấy nồng độ colchicine 0,25% cảm ứng trong 7 ngày và 0,5% cảm ứng 4 ngày là thích hợp để đa bội hóa rễ tơ Đình lăng với tỉ lệ rễ sống sót lần lượt đạt 65,4% và 36,6%, tương ứng số lượng rễ nhánh bậc 1 đạt 20,3 và 19,6 sợi rễ/tổng số rễ gốc ban đầu. Nghiên cứu ghi nhận được có 4 mẫu rễ tơ tứ bội từ cảm ứng colchicine 0,25% trong 7 ngày (PfA1-A4) và 2 mẫu rễ tơ tứ bội từ cảm ứng colchicine 0,5% trong 4 ngày (PfB1 và PfB2) bằng phương pháp đếm số lượng nhiễm sắc thể. Lượng sinh khối tươi và khô thu được ở các mẫu rễ tơ tứ bội đều cao hơn rễ đối chứng (1,92 g tươi và 0,11 g khô), trong đó mẫu PfA2 cho khối lượng sinh khối cao nhất, đạt 3,30 g tươi và 0,23 g khô. Hàm lượng saponin, flavonoid và phenolic toàn phần tích lũy trong rễ tơ tứ bội lần lượt đạt 5,11% g/g, 6,12 mg/g và 5,12 mg/g, đều cao hơn rễ tơ và rễ ngoài tự nhiên lưỡng bội. Các kết quả ghi nhận là những cơ sở khoa học có ý nghĩa để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về rễ tơ đa bội nói chung cũng như về Đình lăng nói riêng.

Từ khóa: Colchicine, polyploid, *Polyscias fruticosa* L. Harms, rễ tơ, tetraploid.

MỞ ĐẦU

Đình lăng cùng họ với nhân sâm, là cây thuốc chứa nhiều hợp chất có giá trị trong rễ, thân và lá, đặc biệt có triterpene saponin được ứng dụng nhiều trong y học, có tác dụng chống oxy hóa, chống stress và các triệu chứng trầm cảm. Ngoài tự nhiên, Đình lăng được trồng bằng phương pháp giâm cành truyền thống, cây 3 - 5 năm tuổi mới tích lũy saponin nhiều để thu hoạch lấy rễ. Hiện nay, việc khai thác quá mức và nhu cầu dùng dược liệu tăng dẫn đến nguồn cây ngày càng giảm sút nghiêm trọng. Một số nghiên cứu về nhân giống Đình lăng *in vitro* như nuôi cấy tế bào huyền phù (Sukhanova *et al.*, 2010), tạo rễ bất định từ mô sẹo (Phạm Văn Lộc *et al.*, 2014) hay nuôi cấy mô lá non (Nguyễn Trung Hậu, Trần Văn Minh, 2015) đã được thực hiện. Trong đó, công nghệ tạo và nhân sinh khối rễ tơ *in vitro* lấy hoạt chất là biện pháp công nghệ sinh học có nhiều lợi thế tiềm năng và cần được quan tâm. Rễ tơ Đình lăng lá nhỏ mang ưu điểm sinh trưởng liên tục mà không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, tổng hợp được các hoạt chất giống cây mẹ (Phan Tường Lộc *et al.*, 2018). Trong khi đó, đa bội hóa cây trồng bằng colchicine được coi hướng đi mới trong sản xuất giống cây với năng suất và chất lượng tốt hơn. Kim và đồng tác giả (2014) đã tạo rễ bất định nhân sâm *Panax ginseng* mang bộ NST 8n bằng cảm ứng colchicine cho lượng sinh khối cao vượt trội và hàm lượng ginsenoside tăng 22% so với rễ nhân sâm trồng tự nhiên (4n). Vì vậy, rễ tơ Đình lăng kết hợp với đa bội hóa nhằm hướng đến tạo ra dòng rễ tăng trưởng mạnh mẽ và tích lũy hoạt chất vượt trội, giúp cung cấp nhanh và bền vững nguồn mẫu trong sản xuất dược liệu. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu xác định ảnh hưởng của colchicine đến sự cảm ứng đa bội hóa rễ tơ ở Đình lăng lá nhỏ và đánh giá sự sinh trưởng của mẫu rễ đa bội.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Dòng rễ tơ Đình lăng lá nhỏ được cảm ứng từ chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC® 43057TM là kết quả nghiên cứu của phòng Công nghệ gen - Viện Sinh học Nhiệt đới, sinh trưởng tốt trong bình tam giác 250 mL và bioreactor 3 L. Dòng rễ này đạt mức tăng trưởng 3,12 g/tuần và hàm lượng saponin tổng là 4,20% g/g sau 5 tuần nuôi (Phan Tường Lộc *et al.*, 2018).

Rễ cây Đình lăng 2 năm tuổi trồng ngoài tự nhiên ở Viện Sinh học Nhiệt đới.

Môi trường rễ: Môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972), 40 g/L sucrose, pH 5,8 (Phan Tường Lộc *et al.*, 2018). Môi trường SH bán rắn có bổ sung gelrite 0,2% (w/v).

Phương pháp

Nuôi cấy rễ tơ Đình lăng lá nhỏ

Cây 0,3 g tươi cho vào bình tam giác chứa 75 mL môi trường lỏng, nuôi lắc 100 rpm, ở 25°C trong 14 ngày (Phan Tường Lộc *et al.*, 2018). Nguồn rễ này được sử dụng làm vật liệu cho các thí nghiệm sau.

Cảm ứng đa bội ở rễ tơ Đinh lăng lá nhỏ bằng colchicine

Rễ tơ (chưa phân nhánh) được cắt phần đầu rễ có độ dài khoảng 2 - 3 cm cho vào nuôi trong môi trường rễ có bổ sung colchicine ở các nồng độ 0; 0,25; 0,5% (w/v), lắc 100 rpm, 25°C. Thời gian cảm ứng cho từng nồng độ lần lượt là 1, 4 và 7 ngày. Thí nghiệm được bố trí theo bảng 1.

Bảng 1. Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng nồng độ và thời gian cảm ứng colchicine

Tên NT	0-1	0-4	0-7	0,25-1	0,25-4	0,25-7	0,5-1	0,5-4	0,5-7
Thời gian cảm ứng (ngày)	1	4	7	1	4	7	1	4	7
Nồng độ colchicine (%) (w/v)	0	0	0	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5

Sau thời gian cảm ứng, mẫu được rửa với 10 mL môi trường SH lỏng và cấy chuyển sang môi trường rễ bán rắn, ủ trong tối 30 ngày ở 25°C (Jesus-Gonzalez, Weathers, 2003). Mỗi nghiệm thức gồm 10 sợi rễ, lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu theo dõi: tỉ lệ rễ sống chết rễ, hình thái rễ.

Chọn lọc dòng rễ tơ Đinh lăng cảm ứng colchicine tăng trưởng tốt

Sau cảm ứng colchicine, những mẫu rễ có sự phân nhánh sẽ được chọn lọc ra để tiếp tục nuôi trên môi trường mới, những mẫu rễ không phân nhánh hay nâu hóa sẽ bị loại bỏ. Các nhánh mới mọc ra từ sợi rễ gốc ban đầu gọi là rễ nhánh bậc 1, rễ nhánh này sẽ được cắt ra hoàn toàn khỏi rễ gốc và được nuôi riêng rẽ trong môi trường mới. Tỷ lệ rễ nhánh = Số lượng rễ nhánh bậc 1 / tổng số rễ gốc.

Sau đó, rễ nhánh bậc 1 tiếp tục phân nhánh tạo lần lượt rễ nhánh bậc 2 và bậc 3. Khi tách nhánh mẫu rễ tới bậc 3, phần đầu chóp sẽ được cắt ra và tiến hành kiểm tra đa bội bằng phương pháp nhuộm nhiễm sắc thể, phần còn lại được nuôi trên môi trường bán rắn để tiếp tục phân nhánh.

Phương pháp cố định và nhuộm nhiễm sắc thể

Đinh lăng lá nhỏ *Polyscias fruticosa* L. Harms có số lượng nhiễm sắc thể $2n = 24$ (Sharma, Chatterji, 1964). Vì thế, rễ tơ được xác định mức độ đa bội bằng phương pháp đếm số lượng nhiễm sắc thể (Núñez, 2014). Đầu chóp của mẫu rễ được tiền xử lý với dung dịch colchicine 0,03% (w/v) trong 4 giờ, sau đó rửa với nước cất và ngâm vào dung dịch Carnoy (3:1, ethanol:glacial acetic acid) trong 24 giờ để cố định mẫu. Sau đó, rễ được rửa 2 lần với nước cất và ngâm trong dung dịch ethanol 70°. Tiếp theo, thủy phân rễ bằng dung dịch HCl 1N ở 60°C trong 10 phút rồi rửa lại với nước cất. Nhuộm rễ với dung dịch Hematoxylin trong 5 phút (đun cách thủy). Mô phân sinh đỉnh rễ của mẫu được tách ra và quan sát nhiễm sắc thể dưới kính hiển vi quang học ở mức phóng đại 1000X. Đối chứng là rễ tơ không xử lý đa bội hóa.

Theo dõi sự tăng trưởng của mẫu rễ tơ đa bội

Những mẫu rễ được kiểm tra đa bội sẽ tiếp tục được nuôi trong bình tam giác 250 mL với môi trường rễ. Sau 5 tuần, sinh khối tươi của rễ tơ được thu nhận và sấy khô ở nhiệt độ 50°C cho đến khi khối lượng không đổi. Ghi nhận lại lượng sinh khối tươi và khô (g).

Điều chế cao chiết toàn phần

Rễ được rửa sạch, sấy khô ở 50°C, nghiền nhỏ thành bột và ly trích trong methanol bằng phương pháp sóng siêu âm tại nhiệt độ 50°C. Dịch ly trích được lọc qua giấy nhám loại bỏ cặn. Dịch sau đó được cô quay đuôi dung môi, sấy khô ở 50°C và trữ ở -20°C.

Xác định hàm lượng saponin toàn phần

Saponin toàn phần được xác định bằng phương pháp so màu cùng với chất chuẩn diosgenin. Lấy 25 µL dịch chiết thực vật hòa với 25 µL methanol 80%. Sau đó 25 µL vanillin 8% được thêm vào và tiếp tục bơm từ từ 250 µL acid sulfuric 72% lên thành của tube, trộn đều dung dịch và chuyển sang bể ổn nhiệt 60°C. Sau 10 phút, tube mẫu được làm lạnh trong nước đá từ 3 - 4 phút và tiến hành đo độ hấp thụ của dung dịch phản ứng ở bước sóng 544 nm. Mẫu đối chứng là mẫu được thay thế dịch chiết thực vật bằng dung môi pha mẫu. Đường chuẩn được xây dựng với dung dịch diosgenin 1 mg/mL với thể tích hút lần lượt là 10, 20, 30, 40, 50 µL (10, 20, 30, 40, 50 g), kết quả được quy tương đương theo số % g diosgenin/g mẫu nguyên liệu (Phan Tường Lộc et al., 2018).

Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định thông qua phương pháp tạo màu với AlCl₃ trong môi trường kiềm-trắc quang. 100 µL dịch chiết thêm vào 500 µL nước cất 2 lần, sau đó thêm vào 30 µL dung dịch NaNO₂ 5%, lắc đều và để yên trong 5 phút. Tiếp tục thêm 60 µL dung dịch AlCl₃ 10%, sau 6 phút cho vào 200 µl dung dịch NaOH 1M. Độ hấp thụ của dung dịch phản ứng được đo ở bước sóng 510 nm. Catechin được sử dụng làm chất chuẩn có nồng độ từ 45, 90, 180, 360, 450 µg/mL, kết quả được quy tương đương theo số mg catechin/g mẫu nguyên liệu (Phan Tường Lộc et al., 2018).

Xác định hàm lượng phenolic toàn phần

Hàm lượng phenolic toàn phần được xác định bởi Ahmad và Langrish (2012). Cao chiết được pha loãng với methanol. Lần lượt cho 50 µL dịch chiết vào 250 µL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và để phản ứng trong 5 phút. Sau đó thêm vào 200 µL dung dịch Na₂CO₃ 7,5%, và lắc đều. Sau 120 phút phản ứng ở nhiệt độ phòng, độ hấp thụ được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 740 nm. Chất chuẩn phloroglucinol được chuẩn bị ở các nồng độ 50, 100, 150 và 200 µg/mL. Kết quả được quy tương đương theo số mg phloroglucinol/g mẫu nguyên liệu.

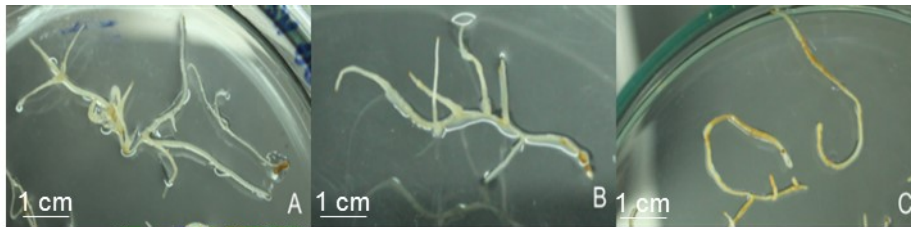
Phương pháp xử lý số liệu

Chương trình Minitab 16.0 được sử dụng để phân tích kết quả thống kê, phương pháp Oneway ANOVA được sử dụng so sánh khác biệt giữa các nghiệm thức, sự khác biệt về mặt thống kê có ý nghĩa khi giá trị P ≤ 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát điều kiện cảm ứng đa bội hóa rễ tơ Đỉnh lã bằng colchicine

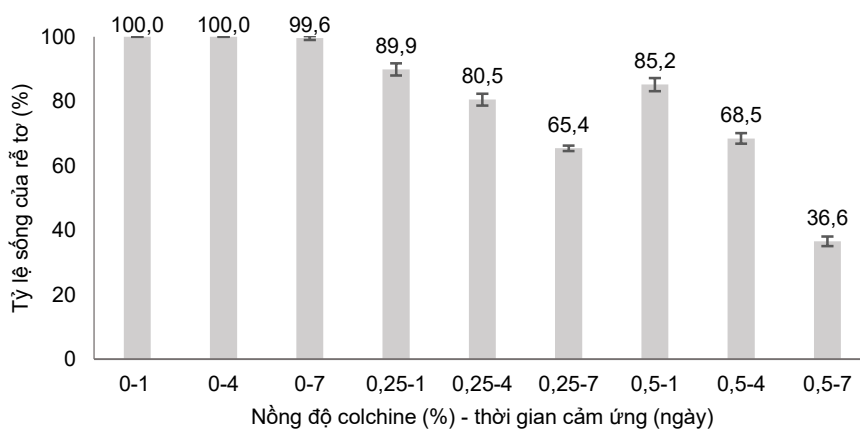
Trong đa bội hóa rễ tơ, nồng độ colchicine và thời gian cảm ứng là những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sống sót của rễ tơ. Sau 30 ngày theo dõi sự phát triển rễ tơ, kết quả ghi nhận ở các nghiệm thức xử lý colchicine cho thấy sợi rễ phát triển chậm và phân nhánh ít hơn rễ đối chứng. Rễ tơ ở các nghiệm thức colchicine 0,25% bắt đầu mọc nhánh sau hơn 3 tuần, trong khi rễ tơ đối chứng mọc nhánh chỉ sau 1 tuần. Ở các nghiệm thức colchicine 0,5%, sợi rễ đa phần có hiện tượng bị nâu hóa và chết dần theo thời gian (Hình 1). Tỷ lệ rễ tơ sống giảm khi tăng dần nồng độ colchicine và thời gian cảm ứng. Ở nghiệm thức 0,25-1, tỷ lệ sống đạt 89,9%, sau đó giảm dần xuống lần lượt còn 80,5% ở nghiệm thức 0,25-4 và 65,4% ở nghiệm thức 0,25-7. Ở nghiệm thức 0,5-7, tỷ lệ sống giảm xuống rõ rệt, chỉ còn 36,6% sau cảm ứng (Hình 2).



Hình 1. Rễ tơ Đỉnh lã lá nhỏ xử lý với colchicine ở các nồng độ khác nhau

A: Rễ đối chứng (không xử lý colchicine), B: Rễ tơ xử lý với colchicine 0,25%, C: Rễ tơ xử lý với colchicine 0,5%

Sự tăng trưởng kém của các dòng rễ xử lý với colchicine có thể giải thích do colchicine là tác nhân gây cảm ứng đa bội hiệu quả đồng thời cũng là chất độc gây ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất, tác động đến các phản ứng enzyme và tổn thương cho thực vật dẫn đến sức sống rễ kém, sinh trưởng chậm (Banyai et al., 2010).

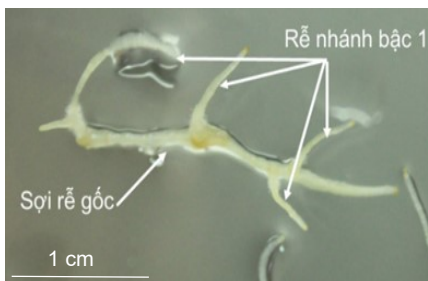


Hình 2. Tỷ lệ sống của rễ tơ khi cảm ứng đa bội với colchicine

Những kết quả ghi nhận này cũng giống với kết quả của các tác giả khác khi nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ colchicine và thời gian cảm ứng đến khả năng sống sót của các đối tượng khác nhau. Nghiên cứu của Belabbassi và đồng tác giả (2016) cho thấy nồng độ và thời gian xử lý colchicine càng cao càng làm giảm sức sống của rễ tơ *Artemisia annua*, cụ thể khi xử lý với colchicine 0,5% trong thời gian 7 ngày cho tỷ lệ sống đạt 63,3% và giảm còn 30% khi tăng lên 11 ngày (Banerjee, 2018).

Chọn lọc mẫu rễ tơ cảm ứng colchicine tăng trưởng tốt

Sau cảm ứng colchicine, tỷ lệ mẫu rễ tơ có phân nhánh từ bậc 1 (Hình 1) được ghi nhận ở bảng 2 cho thấy số lượng rễ nhánh mọc ra càng giảm khi nồng độ colchicine và thời gian cảm ứng càng tăng. Ở nghiệm thức 0,25-1 cho số lượng rễ nhánh cao nhất đạt 34,6 rễ nhánh/10 sợi rễ gốc, trong khi nghiệm thức 0,5-7 có số lượng rễ nhánh thấp nhất chỉ đạt 6,5 rễ nhánh/10 sợi rễ gốc. Rễ ở các nghiệm thức không cảm ứng colchicine cho số lượng rễ nhánh bậc 1 đều lớn hơn 50 sợi. Các sợi rễ nhánh bậc 1 tiếp tục được nuôi và tách nhánh cho đến khi tạo rễ nhánh bậc 3, sau đó tiến hành kiểm tra số lượng nhiễm sắc thể ở các mẫu rễ. Tương tự, sự gia tăng số lượng rễ nhánh của rễ tơ tứ bội *Artemisia annua* so với rễ lưỡng bội cũng được báo cáo trong nghiên cứu của Jesus-Gonzalez và Weathers (2003).



Hình 3. Sự phân nhánh rễ bậc 1 từ sợi rễ gốc ban đầu

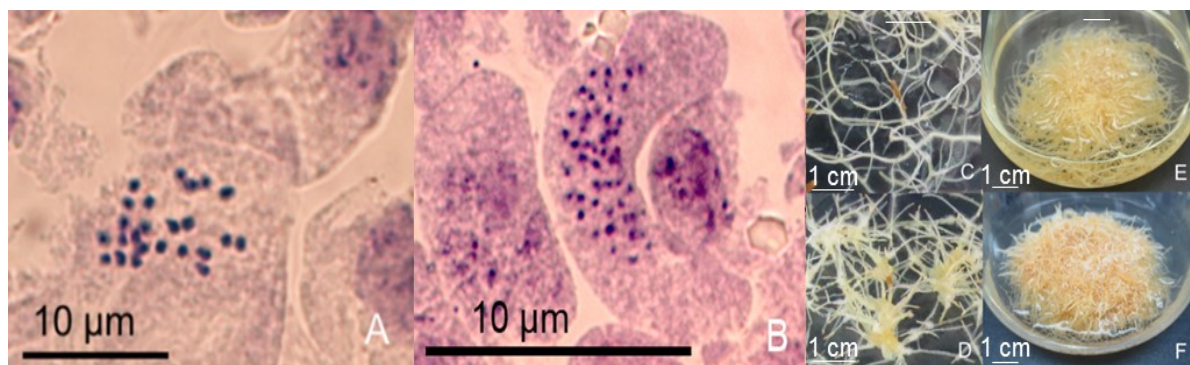
Bảng 2. Số lượng rễ nhánh bậc 1/tổng số rễ gốc ở các mẫu rễ tơ cảm ứng colchicine

Nghiệm thức	0 - 1	0 - 4	0 - 7	0,25 - 1	0,25 - 4	0,25 - 7	0,5 - 1	0,5 - 4	0,5 - 7
Số lượng rễ nhánh bậc 1/tổng số rễ gốc	> 50	> 50	> 50	34,6 ^a	27,0 ^c	20,3 ^d	30,6 ^b	19,6 ^d	6,5 ^e

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 hàng chỉ sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).

Xác định mẫu rễ tơ Đỉnh lăng đa bội

Colchicine được chứng minh có khả năng phá hủy thoi vô sắc và ngăn cản quá trình phân chia tế bào. Vì vậy, mẫu được xử lý colchicine sẽ tạo ra tế bào có số lượng nhiễm sắc thể thay đổi so với bình thường. Số lượng nhiễm sắc thể trong tế bào ở mô phân sinh đỉnh rễ được quan sát và đếm (Hình 4). Đối với nghiệm thức không xử lý colchicine, kết quả quan sát thấy tế bào có 24 nhiễm sắc thể (Hình 4A). Điều này cũng phù hợp với công bố của Sharma và Chatterji (1964) khi xác định cây đỉnh lăng lá nhỏ *Polyscias fruticosa* L. Harms là thể nhị bội với $2n=24$ nhiễm sắc thể. Đối với các nghiệm thức xử lý với colchicine, kết quả quan sát tế bào ở nghiệm thức 0,25-7 và 0,5-4 cho thấy ở dạng tứ bội ($4n$) với 48 nhiễm sắc thể (Hình 4B).



Hình 4. Nhiễm sắc thể của tế bào rễ tơ và rễ tơ nuôi trong môi trường

A: Nhiễm sắc thể rễ đối chứng ($2n=24$ NST), B: Nhiễm sắc thể rễ tứ bội ($4n=48$ NST),
 C: Rễ đối chứng nuôi trong môi trường bán rắn, D: Rễ tứ bội nuôi trong môi trường bán rắn,
 E: Rễ đối chứng nuôi trong môi trường lỏng, F: Rễ tứ bội nuôi trong môi trường lỏng.

Ở nghiệm thức 0,25 - 7 thu nhận được 4 mẫu rễ tơ đa bội, lần lượt được đặt tên là PfA1-A4. Trong khi đó, ở nghiệm thức 0,5 - 4 thu nhận 2 mẫu rễ tơ đa bội là PfB1 và PfB2. Các mẫu rễ này được nuôi trong môi trường bán rắn và lỏng để theo dõi sự tăng trưởng. Theo quan sát về mặt hình thái, mẫu rễ tứ bội có sợi rễ ngắn nhưng phân nhánh nhiều hơn rễ lưỡng bội (Hình 4C, 4D, 4E và 4F). Bên cạnh đó, mẫu rễ tứ bội được ghi nhận đều có

lượng sinh khối khô cao hơn so với dòng lưỡng bội (Bảng 3). Trong đó, PfA2 cho lượng sinh khối tươi và khô cao nhất trong các mẫu rễ đa bội lần lượt là 3,30 và 0,23 g và cao hơn rễ đối chứng với lượng sinh khối tương ứng là 1,92 và 0,11 g. Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu khác cho thấy hệ thống rễ tứ bội phân nhánh nhiều và phát triển, cùng với lượng sinh khối khô vượt trội so với rễ lưỡng bội được ghi nhận ở một số loài *Capsicum annuum* L., *Echinacea purpurea* (L.) Moench và *Datura stramonium* (Kulkarni, Borse, 2010; Xu et al., 2014; Banerjee, 2018). Như vậy, đa bội không chỉ làm tăng lượng nhiễm sắc thể mà luôn đi cùng với những thay đổi về mặt hình thái bên ngoài và sự phát triển của thực vật. Đa bội làm tăng tính linh hoạt của gen dẫn đến tăng tổng hợp mRNA và các protein liên quan đến chuyển hóa chất trong tế bào, từ đó đáp ứng nhu cầu năng lượng và đảm bảo sự tăng trưởng của tế bào đa bội. Tích hợp những sự thay đổi trong kiểu gen làm kiểu hình và lượng sinh khối ở thực vật đa bội đa phần đều vượt mức hơn so với bình thường.

Bảng 3. Lượng sinh khối của các dòng rễ đa bội

Nghiem thức	Đối chứng	PfA1	PfA2	PfA3	PfA4	PfB1	PfB2
Sinh khối tươi (g)	1,92 ^e	2,25 ^c	3,30 ^a	2,87 ^b	2,30 ^c	2,34 ^c	2,12 ^d
Sinh khối khô (g)	0,11 ^e	0,16 ^c	0,23 ^a	0,20 ^b	0,16 ^c	0,16 ^c	0,14 ^d

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 hàng chỉ sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).

Hàm lượng saponin, flavonoid và phenolic toàn phần trong cao chiết rễ tứ bội Đinh lăng đa bội

Cao chiết của dòng rễ tứ bội Đinh lăng PfA2 cho kết quả hàm lượng các hoạt chất tích lũy đều cao hơn cao chiết rễ tứ bội và rễ tự nhiên lưỡng bội (Bảng 4). Trong đó, hàm lượng saponin toàn phần của cao chiết rễ tứ bội đạt 5,11% g/g, cao hơn cao chiết của rễ tứ bội và rễ tự nhiên (lần lượt là 4,45% g/g và 4,07% g/g). Kết quả này cũng cao hơn khi so sánh với dòng rễ tứ bội Đinh lăng lá nhỏ trong nghiên cứu của Nguyễn Trung Hậu và Trần Văn Minh (2015) đạt mức 396,2 µg/g và dòng rễ *in vitro* từ nghiên cứu của Thị và đồng tác giả (2016) đạt mức 77,17 µg/g. Tương tự hàm lượng flavonoid và phenolic tích lũy trong rễ tứ bội đều đạt giá trị cao nhất khi so với rễ tứ bội và rễ tự nhiên lưỡng bội, lần lượt đạt 6,12 mg/g và 5,19 mg/g, đây là hai hợp chất có khả năng chống oxy hóa nổi trội nhất ở thực vật. Ở một số nghiên cứu khác cũng cho thấy hàm lượng hoạt chất của rễ tứ bội đều vượt cao hơn rễ lưỡng bội. Banyai và đồng tác giả (2010) đã ghi nhận mức tăng gấp 1,5 lần artemisinin của rễ tứ bội *Artemisia annua* L. so với rễ lưỡng bội. Đối với các loài *Datura stramonium*, *Hyoscyamus senecionis* và *Hyoscyamus muticus*, hợp chất alkaloid của rễ tứ bội cũng đạt mức cao hơn rễ lưỡng bội (Banerjee, 2018).

Bảng 4. Hàm lượng hoạt chất của dòng rễ tứ bội Đinh lăng tứ bội

Mẫu cao chiết	Saponin toàn phần (% g/g)	Flavonoid toàn phần (mg/g)	Phenolic toàn phần (mg/g)
Rễ tứ bội	5,11 ^a	6,12 ^a	5,19 ^a
Rễ tứ	4,45 ^b	3,83 ^b	4,04 ^b
Rễ trồng tự nhiên	4,07 ^c	3,25 ^c	1,97 ^c

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được nồng độ và thời gian xử lý colchicine thích hợp để cảm ứng đa bội rễ tứ bội Đinh lăng lá nhỏ, cụ thể ở nồng độ colchicine 0,25% trong 7 ngày và 0,5% trong 4 ngày cho tỉ lệ rễ sống sót lần lượt đạt 65,4% và 36,6%, số lượng rễ nhánh bậc 1 đạt 20,3 và 19,6 sợi/rễ/tổng số rễ gốc ban đầu. Trong đó, sàng lọc được 6 mẫu rễ tứ bội bằng phương pháp nhuộm và đếm số lượng nhiễm sắc thể, bao gồm PfA1-A4 từ cảm ứng colchicine 0,25% trong 7 ngày, PfB1 và PfB2 từ cảm ứng colchicine 0,5% trong 4 ngày. Lượng sinh khối (tươi và khô) và hàm lượng hoạt chất ghi nhận ở các mẫu rễ tứ bội đều cao hơn rễ đối chứng. Như vậy, các mẫu rễ tứ bội này có triển vọng làm nguyên liệu chọn lọc dòng rễ tứ bội thuần tăng trưởng mạnh và tích lũy hoạt chất vượt trội.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ kinh phí đề tài cơ sở chọn lọc 2019 của Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam: “Đa bội hóa rễ tứ bội Đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms) bằng colchicine”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Trung Hậu, Trần Văn Minh (2015) Nuôi cấy mô lá đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) tạo rễ tứ bội và nhận biết hoạt chất Saponin tích lũy. *Tạp chí khoa học trường Đại học An Giang* 7(1): 75-83.

Phạm Văn Lộc, Nguyễn Thành Luân, Lương Thùy Ngân, Võ Thị Xuân An (2014). Nghiên cứu tạo rễ bất định ở cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng* 3(76): 106-108.

Phan Tường Lộc, Nguyễn Huỳnh Cẩm Tú, Hoàng Văn Dương, Lê Tấn Đức (2018). Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện sục khí và chiếu sáng đến sự tăng trưởng sinh khối và sản xuất saponin, flavonoid khi nhân rễ tứ bội Đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms) trong bioreactor 3 lít. *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2018*: 1470-1475.

Phạm Thị Thì, Đoàn Thị Quỳnh Hương, Dương Ngọc Kiều Thi, Phạm Văn Thắng và Nguyễn Thoại Ân (2016). Xây dựng quy trình nhân nhanh cây đing lăng có hàm lượng saponin cao bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 44b: 104-112.

Ahmad J, Langrish TAG (2012). Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *J Food Eng* 109(1): 162-174.

Banyai W, Sangthong R, Karaket N, Inthima P, Mii M, Supaibulwatana K (2010). Overproduction of artemisinin in tetraploid *Artemisia annua* L. *Plant Biotechnol J* 27(5): 427-433.

Banerjee S (2018). Voyaging through chromosomal studies in hairy root cultures towards unravelling their relevance to medicinal plant research: an updated review. *The Nucleus* 61(1): 3-18.

Jesus-Gonzalez DL, Weathers P (2003). Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep* 21(8): 809-813.

Kim YS, Hahn EJ, Murthy HN, Paek KY (2004). Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of ginseng. *J Plant Bio* 47(4): 356-360.

Kulkarni M, Borse T (2010). Induced polyploidy with gigas expression for root traits in *Capsicum annum* (L.). *Plant breeding* 129(4): 461-464.

Núñez O (1968). An acetic-haematoxylin squash method for small chromosomes. *Caryol* 21 (2): 115-119.

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50(1): 199-204.

Sharma AK, Chatterji AK (1964). Cytological study as an aid in the interpretation of the systematic status of the different genera of Araliaceae. *Cytol* 29(1): 1-12.

Sukhanova ES, Chernyak ND, Nosov AM (2010). Obtaining and description of *Polyscias filicifolia* and *Polyscias fruticosa* calli and suspension cell cultures. *Biotechnol* 4: 44-50.

Xu CG, Tang TX, Chen R, Liang CH, Liu XY, Wu CL, Wu H (2014). A comparative study of bioactive secondary metabolite production in diploid and tetraploid *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 116(3): 323-332.

EFFECT OF COLCHICINE ON TETRAPLOIDY INDUCTION IN HAIRY ROOT OF *Polyscias fruticosa* L. Harms

Nguyen Huynh Cam Tu¹, Tran Thi Ngoc Ha¹, Hoang Van Duong¹, Le Tan Duc¹, Luong Thi Yen², Phan Tuong Loc^{1*}

¹ Institute of Tropical Biology - Vietnam Academy of Science and Technology

² Nong Lam University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Hairy root cultures of diploid *Polyscias fruticosa* L. Harms were established their advantages with high biomass and secondary metabolite production. The aims of this study are evaluation of the effect of colchicine on polyploidy induction in hairy root of *Polyscias fruticosa* L. Harms. The results revealed that colchicine treatments at concentration of 0.25% for 7 days and 0.5% for 4 days were suitable for inducing polyploidy with survival rate of 65.4% and 36.6%, respectively. The number of lateral roots of these two treatments reached to 20.3 and 19.6 root strands/total original roots. We got four tetraploid lines with treatment of 0.25% colchicine for 7 days (PfA1-PfA4) and two tetraploid lines with treatment of 0.5% colchicine for 4 days (Pfb1-Pfb2). All tetraploid lines produced higher biomass (fresh weight and dry weight) than the diploid when the cultures were initiated with a 5-week inoculum. The total saponin, flavonoid and phenolic contents of tetraploid hairy roots (5.11% g/g, 6.12 mg/g and 5.12 mg/g) were higher than those of diploid hairy roots and native roots. This study provides an initial step in increasing the understanding of the role of polyploidy in secondary metabolite production, especially in hairy roots.

Keywords: Colchicine, hairy root, polyploid, *Polyscias fruticosa* L. Harms, tetraploid.

* Author for correspondence: Tel: +84-2838978796; Email: locphan@itb.ac.vn/lptvn@yahoo.com