

## NGHIÊN CỨU TẠO RỄ CÂY MẬT NHÂN (*Eurycoma longifolia* Jack.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY *IN VITRO*

Trần Đình Giáp<sup>1</sup>, Nguyễn Nhật Minh<sup>2</sup>, Bùi Thế Vinh<sup>2</sup>, Phạm Văn Lộc<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

<sup>2</sup>Viện Dược liệu

\*Email: locpv@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 13/6/2017; Ngày chấp nhận đăng: 05/12/2017

### TÓM TẮT

Cây mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack.) là cây dược liệu thuộc họ thanh thất, được sử dụng nhiều trong mục đích tăng cường sức khỏe tổng quát và cải thiện sức khỏe nam giới. Bài báo này nghiên cứu môi trường tạo rễ bất định cây mật nhân. Kết quả cho thấy, môi trường MS (Murashige và Skoog) bổ sung NAA (naphthalen acetic acid) 1,5 mg/L kết hợp BA (benzyl adenine) 0,1 mg/L phù hợp cho tạo rễ bất định từ mẫu lá mầm *in vitro*, trong khi đó môi trường bổ sung thêm glucose 40 g/L phù hợp đối với mẫu từ mô sẹo. Kết quả này mở ra triển vọng trong nghiên cứu nuôi cấy rễ cây mật nhân nhằm mục đích thu nhận hợp chất thứ cấp.

*Từ khóa:* BA, mật nhân, mô sẹo, NAA, rễ bất định.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack.) là một cây thuộc họ thanh thất (*Simaroubaceae*). Đây là cây có giá trị dược liệu cao [1]. Các tài liệu về y học dân tộc ghi nhận các bộ phận của cây đều được sử dụng để phòng và chữa bệnh. Theo Từ điển Cây thuốc Việt Nam của Võ Văn Chi (2012), người ta dùng rễ cây mật nhân thái nhỏ, tẩm rượu sao để làm thuốc chữa khí hư, huyết kém, ăn uống không tiêu, tức ngực, gân xương yếu, tay chân tê đau, tả lỵ, nôn mửa [2]. Ngoài ra mật nhân còn dùng chữa tứ thời cảm mạo. Một số công bố về hợp chất trong mật nhân cho thấy rễ cây mật nhân có chứa nhiều hợp chất thứ cấp có lợi như quassinoid, triterpenoid, alkaloid đồng cacthin và carbolin [3-6]. Trong đó quassinoid có tác dụng tăng cường tiết testosterone nội sinh cải thiện sức khỏe và sinh lý nam giới, diệt ký sinh trùng sốt rét, chống viêm, chống ung thư. Triterpenoid và alkaloid có tác dụng kháng khuẩn, chống viêm.

Những năm gần đây do nhu cầu về khai thác và sử dụng rễ mật nhân tăng cao, dẫn tới nguồn cây trong thiên nhiên bị suy giảm nghiêm trọng. Phương pháp trồng mật nhân để thu nhận rễ theo cách truyền thống tồn tại nhiều nhược điểm như: nguồn giống khan hiếm, tốn nhiều thời gian, chất lượng của rễ thu nhận được không ổn định, phụ thuộc vào nhiều yếu tố bên ngoài.

Phương pháp nuôi cấy mô và tế bào thực vật được đánh giá là tiềm năng trong sản xuất sinh khối để thu nhận hợp chất thứ cấp từ thực vật. Đã có những sản phẩm do công nghệ sinh học mang lại trong lĩnh vực này như sản xuất taxol từ nuôi cấy tế bào thông đỏ (*Taxus* sp.), sản xuất shikonin từ nuôi cấy tế bào cây *Lithospermum erythrorhizon* [7].

Bài báo giới thiệu kết quả nghiên cứu tạo rễ *in vitro* cây mật nhân. Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu môi trường tạo rễ *in vitro* cây mật nhân.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu**

Nghiên cứu sử dụng mẫu mô sẹo và lá mầm mật nhân *in vitro* 2 tuần tuổi tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực vật, Trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh.

### **2.2. Nội dung nghiên cứu**

#### *2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NAA kết hợp BA lên sự cảm ứng tạo rễ bất định mật nhân*

Lá mầm *in vitro* 2 tuần tuổi được cắt lát mỏng và cấy chuyển vào môi trường cảm ứng tạo rễ. Các môi trường cảm ứng tạo rễ trong thí nghiệm là môi trường MS bổ sung BA 0,1 mg/L và NAA với nồng độ khác nhau (0 - 2,5 mg/L).

#### *2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ glucose lên sự cảm ứng tạo rễ bất định mật nhân*

Mẫu mô sẹo cây mật nhân được cấy truyền vào môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L NAA kết hợp 0,1 mg/L BA và glucose với nồng độ khác nhau (30 - 60 g/L).

### **2.3. Phương pháp định tính quassinoids**

Lấy 1 g dược liệu cho vào 20 mL methanol, đun cách thủy trong 10 phút, tiến hành 3 lần. Thu dịch lọc. Cho dịch lọc vào chén sứ, cô đến cạn. Hòa cồn vào vài giọt methanol, dùng dung dịch này làm mẫu thử cho sắc ký lớp mỏng. Pha tĩnh: Bản mỏng phủ silica gel 60 F254 (Merck). Thăm dò và xác định quassinoid trên hệ dung môi triển khai cloroform:methanol với tỷ lệ 9:1.

### **2.4. Phân tích và xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD). Các số liệu thí nghiệm được phân tích thống kê bằng phần mềm Statgraphics centurion XV.I, sử dụng trắc nghiệm đa biến độ Duncan với độ tin cậy 95%.

### **2.5. Điều kiện thí nghiệm**

Môi trường sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) [8]. pH môi trường được điều chỉnh bằng 5,8 trước khi hấp khử trùng. Khử trùng ở nhiệt độ 121 °C, 1 atm trong 20 phút. Thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ 25 ± 2 °C, độ ẩm trung bình 75 - 80%, cường độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux.

## **3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Khảo sát ảnh hưởng của NAA kết hợp BA lên sự phát sinh rễ bất định cây mật nhân**

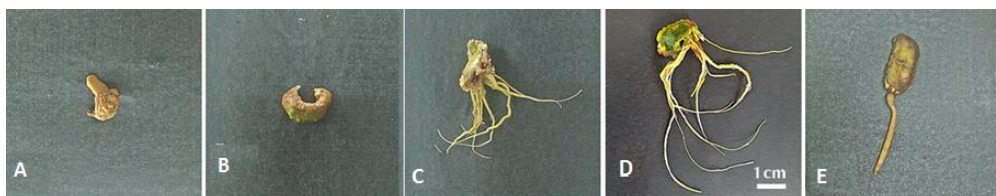
Sau 8 tuần nuôi cấy, các mẫu lá mầm được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ NAA từ 1,0 - 2,0 mg/L kết hợp với BA 0,1 mg/L đã phát sinh rễ bất định. Có thể NAA kết hợp với BA đã ảnh hưởng lên quá trình cảm ứng tạo rễ bất định. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên (2003) về sự kết hợp giữa auxin và cytokinin ở nồng độ thấp hơn có ảnh hưởng lên quá trình tạo rễ [9]. Kết quả cảm ứng tạo rễ bất định sau 8 tuần được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ NAA kết hợp BA 0,1 mg/L lên sự phát sinh rễ

Nghiệm thức	NAA (mg/L)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Số lượng rễ
A1	0,0	00,00 <sup>a</sup>	00,00 <sup>a</sup>
A2	0,5	00,00 <sup>a</sup>	00,00 <sup>a</sup>
A3	1,0	93,33 ± 11,55 <sup>bc</sup>	9,12 ± 1,18 <sup>c</sup>
A4	1,5	100,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	10,73 ± 0,64 <sup>d</sup>
A5	2,0	33,33 ± 11,55 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,28 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%

Tuy nhiên, tại nghiệm thức không bổ sung NAA và có bổ sung mức 0,5 mg/L không có cảm ứng tạo rễ. Có thể vì không có sự có mặt của auxin, hoặc nồng độ auxin khá thấp, và mật nhân vốn là cây thân gỗ, cần lượng auxin lớn hơn cây thân thảo để tạo rễ. Tỷ lệ tạo rễ và số rễ trên môi trường MS bổ sung BA 0,1 mg/L; NAA 1,5 mg/L cao nhất và có sự khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức khác. Rễ bất định ở các mẫu có sự phát triển về số lượng và kích cỡ theo thời gian.



Hình 1. Rễ bất định phát sinh từ lá mầm cây mật nhân trên môi trường MS bổ sung NAA kết hợp với BA 0,1 mg/L sau 8 tuần nuôi cấy  
A) 0,0 mg/L; B) 0,5 mg/L; C) 1,0 mg/L; D) 1,5 mg/L; E) 2,5 mg/L.

### 3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ glucose lên sự phát sinh rễ bất định cây mật nhân

Kết quả cảm ứng tạo rễ bất định sau 4 tuần được trình bày ở Bảng 2.

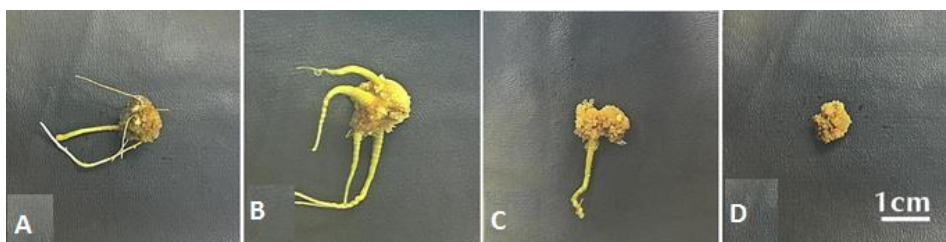
Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ glucose lên sự phát sinh rễ

Nghiệm thức	Nồng độ glucose (g/L)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số lượng rễ
B1	30	33,33 ± 11,55 <sup>c</sup>	1,83 ± 0,76 <sup>b</sup>
B2	40	80,00 ± 0,00 <sup>d</sup>	3,00 ± 0,75 <sup>c</sup>
B3	50	20,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>ab</sup>
B4	60	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Cảm ứng tạo rễ xuất hiện trên các mẫu có bổ sung glucose trong khoảng nồng độ 30 - 50 g/L. Có thể glucose hoặc sự kết hợp giữa glucose và auxin đã tác động lên quá trình cảm ứng tạo rễ bất định cây mật nhân. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Bhuwaneshwar *et al.* (2009), Hussiein *et al.* (2012) về sự ảnh hưởng của glucose và auxin lên sự hình thành và phát triển của rễ [10, 11].

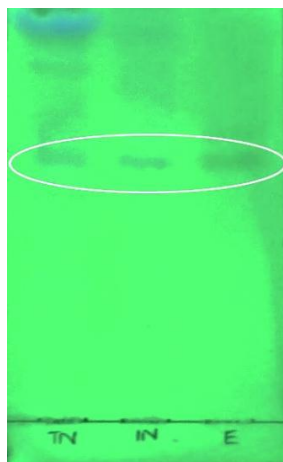
Trên môi trường bổ sung glucose nồng độ 60 g/L không có hiện tượng cảm ứng tạo rễ, có thể do nồng độ đường quá cao, gây ức chế tế bào mô sẹo. Tỷ lệ tạo rễ và số lượng rễ trên môi trường có NAA 1,5 mg/L, BA 0,1 mg/L và glucose 40 g/L cao nhất và có sự khác biệt ý nghĩa đối với các nghiệm thức khác. Rễ bất định phát sinh nhanh trong quá trình nuôi cấy.



Hình 2. Rễ bất định phát sinh từ mô sẹo mật nhân trên môi trường MS bổ sung NAA 1,5 mg/L kết hợp BA 0,1 mg/L và glucose  
A) 30 mg/L; B) 40 mg/L; C) 50 mg/L; D) 60 mg/L

### 3.3. Kết quả định tính quassinoid

Thực hiện quy trình định tính quassinoid với mẫu rễ *in vitro* thu được từ thí nghiệm 2. Kết quả sắc ký bản mỏng phát hiện quassinoid có trong rễ *in vitro* tương tự trong các mẫu đối chứng là quassinoid tinh khiết và mẫu rễ mật nhân tự nhiên.



Hình 3. Kết quả sắc ký bản mỏng định tính quassinoid trong rễ mật nhân *in vitro*  
TN: rễ tự nhiên; IN: rễ *in vitro*; E: chất chuẩn quassinoid

## 4. KẾT LUẬN

Kết quả thu được cho thấy môi trường MS bổ sung NAA 1,5 mg/L kết hợp BA 0,1 mg/L và glucose 40 g/L cho tỷ lệ phát sinh rễ và số lượng rễ tạo ra trên mẫu cao nhất. Rễ *in vitro* thu nhận được có chứa quassinoid tương tự như rễ cây ngoài tự nhiên. Với việc tìm ra được môi trường phù hợp để tạo rễ bất định cây mật nhân từ nguồn mẫu lá mầm *in vitro*, mô sẹo và xác định được trong rễ *in vitro* có chứa quassinoid, tạo triển vọng cho các hướng nghiên cứu nuôi cấy rễ bất định cây mật nhân nhằm thu nhận hợp chất thứ cấp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi - Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, 2004.
2. Võ Văn Chi - Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, 2012.
3. Nguyễn Thị Thanh Tâm, Trần Thị Phương Thảo, Trần Văn Lộc, Ngô Thị Thủy, Nguyễn Duy Như, Trần Văn Sung - Về thành phần hóa học của rễ cây mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack.), Tạp chí Hóa học Việt Nam **52** (1) (2014) 124-129.

4. Bhat R., Karim A. A. - Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack.): A review on its ethnobotany and pharmacological importance, *Fitoterapia* **81** (7) (2010) 669-679.
5. Hassan S. N, Ruslan A., Ling S. K., Abdul R. A., Nazirah A., Fadhilah Z., Haliza I. and Siti S. A. R - Micropropagation and production of eurycomanone, 9methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets, *African Journal of Biotechnology* **11** (26) (2011) 6818-6825.
6. Low B. S., Choi S. B., Abdul Wahab H., Das P. K., Chan K. L. - Eurycomanone, the major quassinoid in *Eurycoma longifolia* root extract increases spermatogenesis by inhibiting the activity of phosphodiesterase and aromatase in steroidogenesis, *Journal of Ethnopharmacology* **149** (1) (2013) 201-207.
7. Vũ Bình Dương, Nguyễn Văn Long, Hoàng Văn Lương, Lê Bách Quang, Nguyễn Văn Minh - Công nghệ sinh khối tế bào thực vật, hướng mới trong sản xuất nguyên liệu làm thuốc, Kỷ yếu hội thảo khai thác, phát triển và xây dựng thương hiệu sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., *Araliaceae* (2008).
8. Murashige T. and Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology* **15** (1962) 473-497.
9. Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên - Công nghệ tế bào, NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 2003.
10. Bhuwaneshwar S. M., Manjul S., Priyanka A., Ashverya L. - Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004502> (2009).
11. Hussein S., Anna P.K.L., Tze H.N., Rusli I. and Kee Y.P - Adventitious roots induction of recalcitrant tropical woody plant *Eurycoma longifolia*, *Romanian Biotechnological Letters* **17** (1) (2012) 7026-7035.

## ABSTRACT

### STUDY ON ADVENTITIOUS ROOT FORMATION OF TONGKAT ALI TREE (*Eurycoma longifolia* Jack.) BY *IN VITRO* CULTURE

Tran Dinh Giap<sup>1</sup>, Nguyen Nhat Minh<sup>2</sup>, Bui The Vinh<sup>2</sup>, Pham Van Loc<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Ho Chi Minh City University of Food Industry*

<sup>2</sup>*National Institute of Medicinal Materials*

\*Email: [locpv@cntp.edu.vn](mailto:locpv@cntp.edu.vn)

## ABSTRACT

Tongkat ali tree (*Eurycoma longifolia* Jack.) is a medicinal plant of *Simaroubaceae* family. It has been marketed for the supposed benefits of general and sexual health improvement. In this study, the medium for adventitious root induction of *Eurycoma longifolia* was investigated. The results indicated that MS medium supplemented with combinations of BA 0,1 mg/L and NAA 1,5 mg/L was optimum for adventitious root induction in cotyledon explants, while MS medium supplemented with glucose 40 g/L was optimum for adventitious root induction in callus. This *in vitro* strategy has the potential to hasten the development of a genetically stable system for the enhanced production of secondary metabolite in culture of *Eurycoma longifolia* plants.

**Keywords:** Adventitious root, BA, callus, *Eurycoma longifolia*, NAA.