



DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.115

PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG DƯỢC CHẤT VÀ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐÌNH LĂNG THUỘC CHI *Polyscias*

Nguyễn Văn Ấy^{1*}, Trần Thị Trọng Nghĩa², Trần Nguyễn Phương Lam³, Trần Trường Tánh³, Lê Thị Diễm Ái⁴ và Trần Thị Ánh Nga⁵

¹Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Lớp cao học Công nghệ sinh học khóa 24, Trường Đại học Cần Thơ

³Lớp Sinh học Ứng dụng khóa 43, Trường Đại học Cần Thơ

⁴Trường Cao đẳng Cộng đồng Hậu Giang

⁵Công ty Cổ phần Đầu tư Thủy Sơn

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Văn Ấy (email: nvay@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The environmental factors and plant growth phases can considerably affect the phytochemical contents of higher plants. The present study was performed to evaluate the effects of the geo-ecological conditions and plant growth stages on the contents of some bioactive compounds and phylogenetic diversity of *Polyscias* species. The experiment was conducted in the labs of Can Tho University, from January to December 2020. The results showed that: growth stages and plant parts considerably affected on the total contents of thiamine, tannic acid, quercetin and veratrine compounds in this plant. The contents of these bioactive substances at 5 year-old stage were highest (88.71, 3.86, 1.09 and 0.1 mg/g fresh weight, respectively) among 4 different growth stages. Moreover, the roots contained the highest contents of these bioactive substances compared to other parts of the plant. The plant ecotypes which cultivated in Ca Mau and An Giang provinces had higher contents of phytochemicals than those cultivated in Hau Giang and Can Tho. The findings confirmed the genetic diversity and relationship of *Polyscias* sp. samples distributed in 4 provinces (Ca Mau, Can Tho, Hau Giang and An Giang) based on ITS sequences. The most genetic variation was found in ITS region among 9 tested ecotypes which.

TÓM TẮT

Các yếu tố môi trường và thời gian sinh trưởng có tác động rất lớn đến hàm lượng các chất trong cây. Việc khảo sát ảnh hưởng của điều kiện địa lý và thời gian sinh trưởng lên hàm lượng một số hợp chất trong cây đình lăng (*Polyscias* sp.) và sự đa dạng di truyền đã được thực hiện tại Trường Đại học Cần Thơ từ tháng 01/2019 đến 12/2020. Kết quả cho thấy, thời gian sinh trưởng và loại mẫu có ảnh hưởng đến hàm lượng chất trong cây đình lăng. Trong đó, cây 5 năm tuổi có hàm lượng tannic acid, quercetin, veratrine và thiamine (lần lượt là 88,71, 3,86, 1,09 và 0,1 mg/g) cao nhất. Rễ của cây đình lăng chứa nhiều dược chất hơn các phần khác. Cây trồng ở Cà Mau và An Giang có hàm lượng dược chất cao hơn khi trồng ở Hậu Giang và Cần Thơ. Dựa vào trình tự ITS cho thấy, 09 mẫu đình lăng thu thập tại Cà Mau, Cần Thơ, Hậu Giang và An Giang, thuộc các loài *Polyscias* sp., *P. fruticosa*, *P. quillfoylei* và *P. scutellaria* có sự đa dạng di truyền.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 16/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 08/06/2022

Ngày duyệt đăng: 16/06/2022

Title:

Comparative study on biosubstances content and genetic diversity of *Polyscias* species

Từ khóa:

Cây đình lăng, hàm lượng dược chất, sắc ký lỏng cao áp, sự đa dạng di truyền, trình tự ITS

Keywords:

Biodiversity, high performance liquid chromatography system, internal transcribed spacers, phytochemicals content, *Polyscias* sp.

1. GIỚI THIỆU

Chi *Polyscias* gồm các loại định lăng với các dạng lá khác nhau (thuộc họ Nhân sâm, Araliaceae), được xem là dược liệu quý do chứa nhiều dược chất như: glucosid, alkaloid, saponin, tannin, acid amin, vitamin B₁,... (Hộ, 2000). Các dược chất này không những có tác dụng bồi dưỡng sức khỏe mà còn chữa được nhiều loại bệnh như: dị ứng, ho ra máu, làm lành vết thương, bệnh thận, kiết lỵ, tác dụng giải độc thức ăn, thoái hóa đốt sống lưng, thông huyết mạch, bồi bổ khí huyết,... (Lợi, 1995; Hộ, 2000). Bên cạnh đó, định lăng còn giúp tăng cường sinh lực, tăng tính hòa tan các dược chất khác, chống viêm, kháng khuẩn, ức chế hoạt động của virus, tăng tính thẩm biểu mô đường hô hấp, an thần, chống oxy hóa, giảm stress (Lợi, 1995). Theo Hương và Bích (2001), ở Việt Nam, định lăng có các tác dụng dược lý tương tự như sâm nhưng giá thành lại rẻ và dễ trồng hơn sâm. Chính vì thế, ngày nay, định lăng được trồng khá phổ biến, thậm chí có nhiều vùng chuyên canh trồng định lăng để làm nguyên liệu cho ngành dược. Cho đến nay, việc thu hoạch định lăng chỉ dựa vào kinh nghiệm của người trồng. Do đó, việc xác định thời gian thu hoạch kể từ khi trồng loại cây này để có giá trị kinh tế cao mà đảm bảo hàm lượng các dược chất là vấn đề cần được quan tâm nghiên cứu.

Cây định lăng gồm các giống định lăng lá nhỏ, lá to, lá bạc,... Tuy nhiên, rất ít người biết cách phân biệt các giống định lăng một cách khoa học ngoại trừ những người làm nghiên cứu. Ngoài ra, các nghiên cứu trên cây định lăng chủ yếu chỉ dừng lại ở mức phân tích hàm lượng dược chất từ nguồn vật liệu có sẵn trong tự nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về khảo sát tác động của các yếu tố ngoại cảnh (độ tuổi cây, dinh dưỡng, ánh sáng, nhiệt độ...) lên hàm lượng các dược chất nêu trên cũng như phân tích sự đa dạng di truyền của các giống định lăng được trồng tại Việt Nam bằng kỹ thuật sinh học hiện đại một cách rõ ràng. Do đó, trong nghiên cứu này, phân tích hàm lượng dược chất và đa dạng di truyền của một số giống định lăng thuộc chi *Polyscias* đã được thực hiện.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện nghiên cứu

2.1.1. Thời gian và địa điểm thực hiện

Thời gian: Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 01 năm 2019 đến tháng 12 năm 2020.

Địa điểm: Phòng thí nghiệm Sinh Hóa - Bộ môn Sinh lý - Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

2.1.2. Vật liệu và hóa chất nghiên cứu

Phân tích hàm lượng dược chất: mẫu định lăng lá nhỏ (gồm rễ, thân và lá của cây) ở các độ tuổi 1, 2, 3 và 5 năm sau khi trồng trong tán rừng keo lai trên nền đất phù sa nhiễm phèn thuộc huyện U Minh, tỉnh Cà Mau.

Phân tích đa dạng di truyền: chín mẫu định lăng được thu dựa vào hình thái lá, tại các địa điểm: Cà Mau, Hậu Giang, An Giang và Cần Thơ.

Một số hóa chất chính: quercetine, veratrine, thiamine và tannic acid (Sigma Aldrich).

2.2. Phương pháp ly trích mẫu

Cây định lăng tươi được chọn là những cây khỏe, không bệnh, có sức sống mạnh. Sau khi thu thập, cây định lăng được tiến hành rửa và loại bỏ bụi bẩn, đặc biệt là phần rễ. Sau đó, phân chia các bộ phận rễ, thân và lá, để ráo, thái nhỏ thân và rễ cây. Các mẫu này được sấy khô bằng tủ sấy ở 40°C đến khi khối lượng không đổi. Sau đó, mẫu được nghiền mịn để tiến hành các bước tiếp theo.

Cân 1,2 g bột định lăng cho vào mỗi bình tam giác rồi thêm 50 mL methanol tuyệt đối, ngâm trong 72 giờ. Mẫu được đánh sóng siêu âm 20 phút sau mỗi 24 giờ ngâm và tiến hành ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút để thu lấy dung dịch trong. Sau khi ly tâm, dịch được cô quay chân không ở nhiệt độ 45°C đến khi thể tích không đổi. Mẫu tiếp tục được đông khô để loại bỏ hoàn toàn nước. Cao chiết định lăng được bảo quản ở ngăn lạnh để tiến hành phân tích hàm lượng các dược chất.

2.3. Định lượng một số dược chất bằng kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

2.3.1. Quy trình phân tích HPLC

Chuẩn bị dung dịch chất chuẩn: Các hóa chất chuẩn (tannic acid, quercetine, thiamine và veratrine) được pha thành các dung dịch riêng biệt ở các nồng độ: 0, 25, 50 và 75 mg/L. Saponin có nồng độ là 1, 2,5, 5, 10 và 50 mg/L.

Mẫu sau khi đã hoàn thành các thao tác chuẩn bị được đưa vào máy HPLC (Shimadzu, model LC-20A series). Cột Supelco C18 được sử dụng với chiều dài 25 cm, đường kính trong 4,6 mm và kích thước hạt 5 µm. Pha tĩnh là silicagel. Tùy theo các chất phân tích sẽ có pha động khác nhau. Đầu dò UV. Thể tích mẫu tiêm là 10 µL.

Các mẫu phân tích được thực hiện gồm 3 lần lặp/mẫu. Sau khi phân tích mẫu, ta tiến hành ghi nhận, xử lý kết quả và vẽ đường chuẩn để xác định hàm lượng các chất có trong mẫu đỉnh lãng.

Hàm lượng tannic acid và quercetine: ta sử dụng pha động là methanol 70% và nước 30%, có bước sóng là 230 nM, tốc độ dòng là 0,5 mL/phút và nhiệt độ cột là 40°C.

Xác định hàm lượng thiamine và veratrine: Pha động là acetonitril 60% và 20 mM NaH₂PO₄ có bước sóng là 254 nM, tốc độ dòng là 1 mL/phút và nhiệt độ cột là 35°C.

Hàm lượng saponin tổng: Pha động là HCl 0,0012 M và acetonitril (20:80), có bước sóng λ = 208 nM và tốc độ dòng là 1 mL/phút.

2.3.2. Tiến hành thí nghiệm

Khảo sát sự đa dạng di truyền của các giống cây đỉnh lãng bằng kỹ thuật ITS:

DNA của 9 mẫu lá non đỉnh lãng thu tại 4 địa điểm (2 mẫu được thu ở Cà Mau, 2 mẫu được thu ở Hậu Giang, 2 mẫu được thu ở Cần Thơ và 3 mẫu được thu ở An Giang) được ký hiệu theo thứ tự từ P1 đến P9. Mẫu được ly trích và tinh sạch theo phương pháp CTAB (Doyle and Doyle, 1990) có hiệu chỉnh. Các mẫu lá đỉnh lãng sau khi ly trích DNA được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR theo phương pháp Williams et al. (1990). Trộn Master mix bao gồm: nước cất 2 lần, PCR buffer, dNTPs, MgCl₂, môi ITS1 và ITS4, Taq polymerase (Lee et al., 2015). Trình tự nucleotide của ITS1 và ITS4 (White et al., 1990) như sau:

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'

Các mẫu DNA của cây đỉnh lãng sau khi thực hiện phản ứng PCR với môi ITS sẽ được giải trình tự theo phương pháp của Sanger. Sau khi có kết quả, giải trình tự vùng gen ITS sẽ được so sánh với các chuỗi trình tự đã công bố trên ngân hàng dữ liệu gene Genbank của NCBI bằng công cụ Blast để định danh loài.

Xác định hàm lượng các chất trong cây đỉnh lãng lá nhỏ (P. fruticosa (L.) Harms):

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và loại mẫu (rễ, thân, lá) đến hàm lượng các hoạt chất trong cây đỉnh lãng lá nhỏ trồng tại huyện U Minh, tỉnh Cà Mau

Mục tiêu: nhằm tìm ra thời gian cũng như bộ phận của cây đỉnh lãng có hàm lượng các chất tích lũy cao nhất.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức 2 nhân tố (loại mẫu: rễ, thân, lá và thời gian sinh trưởng: 1, 2, 3 và 5 năm tuổi của các cây đỉnh lãng được trồng dưới tán rừng keo lai trên nền đất phù sa nhiễm phèn thuộc huyện U Minh-tỉnh Cà Mau). Mẫu được thu cùng một thời điểm với 3 lần lặp lại/nghiệm thức, 1 cây/lặp lại. Các khu vực trồng đỉnh lãng gồm:

Huyện U Minh, tỉnh Cà Mau: đất phù sa nhiễm phèn, nhiệt độ trung bình 26,5(±)°C và lượng mưa 2360 mm/năm.

Huyện Châu Thành A, tỉnh Hậu Giang: đất phù sa, nhiệt độ trung bình 27(±2)°C và lượng mưa 1800 mm/năm.

Quận Thốt Nốt, thành phố Cần Thơ: đất phù sa với nhiệt độ trung bình 28(±2)°C và lượng mưa 1700 mm/năm.

Huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang: đất cát núi, nhiệt độ trung bình 27(±2)°C và lượng mưa 1478 mm/năm.

Chỉ tiêu phân tích: hàm lượng các hoạt chất quercetine, thiamine, tannic acid và veratrine trong mẫu đỉnh lãng.

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của địa điểm trồng lên hàm lượng các dược chất trong cây đỉnh lãng lá nhỏ

Thí nghiệm được bố trí theo 1 nhân tố (gồm 4 địa điểm trồng tại Cà Mau, Cần Thơ, Hậu Giang và An Giang). Mỗi nghiệm thức là 3 lần lặp lại. Mẫu phân tích là mẫu rễ của cây đỉnh lãng 5 năm tuổi.

Chỉ tiêu phân tích: hàm lượng các hoạt chất saponin, quercetine, thiamine, tannic acid và veratrine trong mẫu rễ đỉnh lãng.

2.3.3. Phân tích kết quả

Phân tích đa dạng di truyền:

Các mẫu sau khi giải trình tự sẽ dùng phần mềm BioEdit 6.0 để so sánh (Alignment) các trình tự. Các trình tự vùng gen ITS được dùng để vẽ giản đồ phả hệ bằng phần mềm Mega 6.06 (Stecher et al., 2014).

Phân tích hàm lượng các chất:

Các số liệu phân tích được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel và phân tích thống kê thí nghiệm bằng chương trình SPSS 20.0. Phương sai (ANOVA) được phân tích để đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Các giá trị trung bình được so

sánh bằng kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5% hoặc 1%.

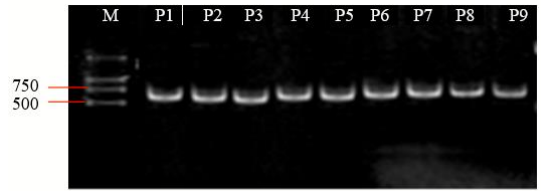
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát sự đa dạng di truyền của các giống cây dinh lăng bằng kỹ thuật ITS

3.1.1. Kết quả phản ứng PCR và xác định loài bằng giải trình tự vùng ITS

Sản phẩm khuếch đại vùng gen ITS được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%. Sản phẩm PCR cho thấy các mẫu đều có 1 vạch sáng đậm, rõ nét, không có vạch phụ và có kích thước khoảng 700-800 bp (Hình 1).

Theo Yao et al. (2010), toàn bộ vùng ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước dao động từ 500-1000 bp, tùy thuộc vào từng loài thực vật. Trong hầu hết các thực vật hạt kín, kích thước vùng gen ITS dao động từ 565-700 bp. Như vậy, kích thước vùng gen được khuếch đại là phù hợp với kích thước của vùng gen ITS.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/ITS4

(M: thang chuẩn, P: *Polyscias*)

Sau khi đã kiểm tra chất lượng, các sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự theo phương pháp Sanger. Sau khi hiệu chỉnh, trình tự đoạn gen thu được của các mẫu có độ dài 630 bp. Kết quả kiểm tra độ tương đồng của các trình tự sau hiệu chỉnh so với các mẫu trên GenBank (Bảng 1) cho thấy, tất cả các mẫu khảo sát đều có kết quả trùng khớp với trình tự *Polyscias* (độ bao phủ là 95 - 100% và độ tương đồng là 95 - 99%).

Bảng 1. Định danh 9 mẫu dinh lăng bằng giải trình tự vùng ITS

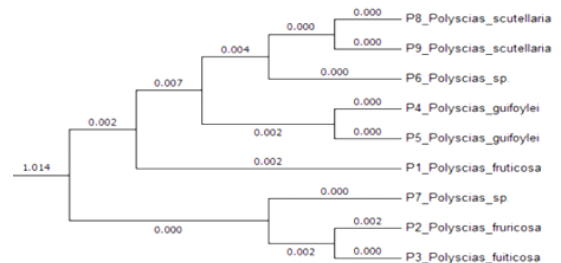
Ký hiệu mẫu	Tên Việt Nam	Chiều dài đoạn gen (bp)	Tên khoa học	Code number trên NCBI
P1	Đinh lăng lá lớn	630	<i>Polyscias fruticosa</i>	KX768327.1
P2	Đinh lăng lá trung	630	<i>Polyscias fruticosa</i>	KX768327.1
P3	Đinh lăng lá trung	630	<i>Polyscias fruticosa</i>	KX768327.1
P4	Đinh lăng lá xẻ	630	<i>Polyscias quilfoylei</i>	GQ267591.1
P5	Đinh lăng lá xẻ viền bạc	630	<i>Polyscias quilfoylei</i>	GQ267591.1
P6	Đinh lăng lá rí	630	<i>Polyscias</i> sp.	
P7	Đinh lăng xương cá	630	<i>Polyscias</i> sp.	
P8	Đinh lăng lá tròn viền bạc	630	<i>Polyscias scutellaria</i>	AF229716.1
P9	Đinh lăng lá tròn	630	<i>Polyscias scutellaria</i>	AF229716.1

3.1.2. Xây dựng cây phát sinh loài

Để xây dựng giản đồ mối quan hệ di truyền, một bộ cơ sở dữ liệu được xây dựng bao gồm 9 trình tự mẫu dinh lăng đã thu thập. Trình tự nucleotic sau khi được sắp xếp cột thẳng hàng bằng seaview và loại bỏ các vùng không bảo tồn, các trình tự khảo sát có độ dài 600 bp. Ở một số vị trí còn tồn tại, các spick chồng lên nhau được xử lý như các điểm chưa xác định (missing data). Bộ dữ liệu gồm 9 chuỗi trình tự, dài 600 bp được chuyển vào phần mềm Mega 6.06 để xác định mô hình tiến hóa tối ưu.

Kết quả thiết lập cây phát sinh loài của 9 mẫu dinh lăng được phân tích theo phương pháp Maximum Likelihood. Phương pháp này tìm cây tiến hóa bằng cách đưa ra các mô hình có thể xảy ra và tìm ra mô hình tối ưu nhất. Kết quả phân tích trên vùng ITS (Hình 2) cho thấy có sự đa dạng di truyền của các mẫu dinh lăng, không có sự tương quan giữa

khoảng cách di truyền và khoảng cách địa lý. Diễn hình mẫu dinh lăng P2 thu thập ở Cà Mau và mẫu P3 thu thập ở Hậu Giang có cùng trình tự ITS và cùng là loài *P. fruticosa*.



Hình 2. Giản đồ mối quan hệ di truyền của 9 mẫu dinh lăng được phân tích dựa trên trình tự ITS

Theo sơ đồ cây phát sinh loài (Hình 2) cho thấy, các mẫu dinh lăng phân thành 2 nhóm riêng biệt.

Nhóm 1 bao gồm 6 mẫu: P1 (thu tại Cà Mau), P3 (thu tại Hậu Giang), P5 và P6 (thu tại Cần Thơ, P8 và P9 (thu tại An Giang). Các mẫu này thuộc các loài *Polyscias* sp., *P. fruticosa*, *P. quilfoylei* và *P. scutellaria*. Nhóm 2 bao gồm 3 mẫu: P2 (thu tại Cà Mau), P3 (thu tại Hậu Giang) và P7 (thu tại An Giang) thuộc loài *Polyscias* sp. và *P. fruticosa*. Ngoài ra, dựa vào cây phát sinh loài có thể thấy rằng loài *P. quilfoylei* và *P. scutellaria* có quan hệ gần gũi hơn so với loài *P. fruticosa*, bởi vì chúng đều thuộc nhóm 1.

3.2. Phân tích hàm lượng dược chất trong cây đinh lăng lá nhỏ (*P. fruticosa* (L.) Harms)

3.2.1. Xây dựng đường chuẩn của các hoạt chất khảo sát

Kết quả phân tích sắc ký các chất chuẩn tannic acid, quercetine, thiamine, veratrine và saponin có thời gian lưu lần lượt là: 4,8 phút, 7,26 phút, 2,99 phút, 3,8 phút và 2,8 phút. Sau khi xác định diện tích peak tương ứng từ sắc ký đồ của các chất chuẩn, tiến hành lập phương trình hồi quy tuyến tính và hệ số tương quan giữa nồng độ chất phân tích và diện tích peak tương ứng trên sắc ký đồ. Kết quả phân tích cho thấy, các chất phân tích có phương trình hồi quy tuyến tính với độ tương quan thuận rất chặt chẽ, lần lượt như sau:

Tannic acid: $y = 46828x - 162725$ ($R^2 = 0,9998$)

Quercetine: $y = 53046x + 16608$ ($R^2 = 0,9999$)

Thiamine: $y = 15630x + 8068,5$ ($R^2 = 0,9998$)

Veratrine: $y = 2522,3x + 936,6$ ($R^2 = 0,9993$)

Saponin: $y = 19730x - 54075$ ($R^2 = 0,9994$)

3.2.2. Ảnh hưởng của độ tuổi và bộ phận của cây lên hàm lượng các hoạt chất trong cây đinh lăng lá nhỏ trồng tại huyện U Minh - tỉnh Cà Mau

Hàm lượng tannic acid

Kết quả phân tích sắc ký các mẫu đinh lăng ở bước sóng 230 nM thu được thời gian lưu của tannic acid là 4,8 phút. Bảng 2 cho thấy hàm lượng tannic acid trung bình trong cây đinh lăng. Trong đó, ở cây 1 năm có hàm lượng tannic acid cao nhất (61,43 mg/g TLK), thấp nhất là ở cây 2 năm tuổi (47,85 mg/g), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Tương tự, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% về ảnh hưởng của bộ phận cây đinh lăng (rễ, thân và lá) lên hàm lượng tannic acid, trong đó hàm lượng tannic acid trung bình trong rễ là cao nhất, đạt 75,87 mg/g và cao hơn nhiều so với hai bộ phận còn lại là 46,23 mg/g ở thân và 43,09 mg/g ở lá. Mặt khác, Bảng 2 cho thấy có sự tương tác giữa thời gian sinh trưởng và bộ phận cây lên hàm lượng tannic acid trong cây, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% và hàm lượng tannic acid cao nhất ở nghiệm thức rễ của cây 5 năm tuổi (88,71 mg/g).

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và loại mẫu lên hàm lượng của tannic acid (mg/g TLK) trong cây đinh lăng trồng tại huyện U Minh-tỉnh Cà Mau

Bộ phận cây (A)	Thời gian sinh trưởng (Năm trồng, B)				Trung bình (A)
	1	2	3	5	
Rễ	78,80 ^b	60,17 ^c	75,81 ^b	88,71 ^a	75,87 ^a
Thân	48,63 ^d	49,62 ^d	47,78 ^d	38,90 ^e	46,23 ^b
Lá	56,87 ^d	33,75 ^e	47,78 ^d	33,97 ^e	43,09 ^c
Trung bình (B)	61,43 ^a	47,85 ^c	57,12 ^b	53,86 ^b	
P _A			**		
P _B			**		
P _{AxB}			**		
CV(%)			1,8		

Trong cùng một cột hay hàng, các chữ cái theo sau các số giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua phép thử DUNCAN, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Dựa vào kết quả thống kê ở Bảng 2, thời gian sinh trưởng và bộ phận có mối tương quan với hàm lượng tannic acid trong cây. Cụ thể, khi thời gian sinh trưởng tăng thì hàm lượng tannic acid ở rễ tăng theo và ở năm thứ năm (88,71 mg/g TLK) có sự cách biệt lớn so với mẫu rễ thời điểm trước đó. Xét về hàm lượng tannic acid trong từng bộ phận cho thấy có sự tăng dần từ rễ cho đến lá, cụ thể cao nhất là

trong rễ (75,87 mg/g TLK) và thấp nhất là ở lá (43,09 mg/g TLK). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Larsson et al. (1986) về ảnh hưởng của ánh sáng lên quá trình sinh tổng hợp của tannin vì hàm lượng tannin ở các mô dự trữ tăng khi cường độ ánh sáng tăng. Trong cây, tanin tham gia vào quá trình trao đổi chất và oxy hoá khử, đồng thời nhờ có nhiều nhóm phenol nên tanin có tính kháng khuẩn, bảo vệ

cây trước những tác nhân gây bệnh từ bên ngoài. Lá cây là bộ phận tiếp xúc trực tiếp và nhiều nhất với ánh sáng mặt trời và các bức xạ UV- B so với các bộ phận khác. Đây là một trong những tác nhân dẫn đến sự tích lũy hàm lượng tannic acid khác nhau ở từng bộ phận của cây.

Hàm lượng quercetine

Kết quả phân tích mẫu đỉnh lãg bằng kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp ở bước sóng 230 nM thu được thời gian lưu của quercetine là 7,26 phút. Hàm lượng quercetine trong rễ đỉnh lãg là cao nhất (1,02 mg/g TLK), trong khi ở hai bộ phận lá và thân là thấp nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% (Bảng 3). Hàm

lượng quercetine biến động qua các năm, trong đó năm thứ năm có hàm lượng quercetine cao nhất (1,29 mg/g TLK). Hơn nữa, dựa vào sự tương tác của hàm lượng quercetine trong cây được đánh giá theo các chỉ tiêu bộ phận, thời gian sinh trưởng và sự tương tác giữa các bộ phận cho thấy các số liệu đều khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Ngoài ra, ở Bảng 3 cho thấy có sự tương tác giữa thời gian sinh trưởng và bộ phận cây lên sự hàm lượng quercetine ở các mẫu đỉnh lãg 1, 2, 3 và 5 năm tuổi trồng. Trong đó bộ phận rễ của cây đỉnh lãg 5 năm tuổi có hàm lượng quercetine cao nhất (3,86 mg/g TLK) so với các mẫu còn lại.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và loại mẫu lên hàm lượng của quercetine (mg/g TLK) trong cây đỉnh lãg trồng tại huyện U Minh-tỉnh Cà Mau

Bộ phận cây (A)	Thời gian sinh trưởng (Năm trồng, B)				Trung bình (A)
	1	2	3	5	
Rễ	0,12 ^b	0,02 ^c	0,09 ^b	3,86 ^a	1,02 ^a
Thân	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01 ^b
Lá	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01 ^b
Trung bình (B)	0,04 ^b	0,007 ^c	0,03 ^b	1,29 ^a	
P _A			**		
P _B			**		
P _{AxB}			**		
CV(%)			0,46		

Trong cùng một cột hay hàng, các chữ cái theo sau các số giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua phép thử DUNCAN, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Hàm lượng veratrine

Kết quả phân tích sắc ký mẫu đỉnh lãg ở bước sóng 230 nM thu được thời gian lưu của veratrine là 3,8 phút. Trong ba bộ phận của cây thì hàm lượng veratrine có trong thân và rễ là tương đương nhau (0,84 mg/g), cao hơn nhiều so với hàm lượng veratrine có trong lá (0,19 mg/g) (Bảng 4). Dựa vào sự tương tác của hàm lượng veratrine trong cây được

đánh giá theo các chỉ tiêu bộ phận và sự tương tác giữa bộ phận và thời gian sinh trưởng, các số liệu cho thấy có khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Trong đó, hàm lượng veratrine trung bình của cây 3 và 5 năm tuổi ở thân và lá là cao nhất (lần lượt là 1,01 và 0,86 mg/g cây 3 năm tuổi; 1,1 và 1,09 mg/g ở cây 5 năm tuổi). Tuy nhiên, hàm lượng veratrine được đánh giá theo chỉ tiêu thời gian sinh trưởng khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và loại mẫu lên hàm lượng của veratrine (mg/g TLK) trong cây đỉnh lãg trồng tại huyện U Minh-tỉnh Cà Mau

Bộ phận cây (A)	Thời gian sinh trưởng (Năm trồng, B)				Trung bình (A)
	1	2	3	5	
Rễ	1,10 ^a	0,32 ^{bc}	0,86 ^a	1,09 ^a	0,84 ^a
Thân	0,41 ^b	0,85 ^a	1,01 ^a	1,10 ^a	0,84 ^a
Lá	0,15 ^{cd}	0,45 ^b	0,08 ^d	0,09 ^d	0,19 ^b
Trung bình (B)	0,55	0,54	0,65	0,76	
P _A			**		
P _B			Ns		
P _{AxB}			**		
CV(%)			1,28		

Trong cùng một cột hay hàng, các chữ cái theo sau các số giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua phép thử DUNCAN, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê.

Thông qua kết quả thống kê ở Bảng 4, loại mẫu (bộ phận cây) và thời gian trồng có sự tương tác với nhau và có ảnh hưởng lên sự sinh tổng hợp và tích lũy veratrine trong cây. Hàm lượng veratrine ở lá là thấp nhất và rễ là cao nhất. Dựa vào các kết quả nghiên cứu trước đây, ánh sáng chỉ là một trong những yếu tố tác động đến quá trình sinh tổng hợp các chất alkaloid (Waller & Nowacki, 1978) và hàm lượng các alkaloids trong cây. Mặt khác hàm lượng của các nhóm chất này mà còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác như bộ phận, thời gian tích lũy của nơi dự trữ và độ tuổi của cây,... Tuy nhiên độ tuổi không có tác động lớn đến hàm lượng alkaloid trong

lá (Wei et al., 2016). Sự khác biệt về hàm lượng veratrine của đỉnh lã ở Bảng 4 là do thời gian sinh trưởng cũng như sự tích lũy ở từng bộ phận khác nhau thì hàm lượng veratrine trong cây đỉnh lã là khác nhau và cao nhất là ở rễ (0,5 mg/g ở rễ cây 5 năm tuổi). Đối với thời gian sinh trưởng, ở hai năm đầu chưa có sự khác biệt đáng kể và ở năm thứ ba có sự thay đổi hàm lượng veratrine rõ rệt và cao hơn hẳn. Từ đây, ta xác định được thời gian sinh trưởng có ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp veratrine trong cây đỉnh lã.

Hàm lượng Thiamine

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và loại mẫu lên hàm lượng của thiamine (mg/g TLK) trong cây đỉnh lã trồng tại huyện U Minh-tỉnh Cà Mau

Bộ phận cây (A)	Thời gian sinh trưởng (Năm trồng, B)				Trung bình (A)
	1	2	3	5	
Rễ	0,05 ^b	0,05 ^b	0,05	0,1 ^a	0,06 ^a
Thân	0,01 ^d	0,02 ^c	0,02 ^c	0,05 ^b	0,03 ^b
Lá	0,01 ^d	0,01 ^d	0,01 ^d	0,02 ^c	0,01 ^b
Trung bình (B)	0,02 ^c	0,03 ^b	0,03 ^b	0,06 ^a	
P _A			**		
P _B			**		
P _{AxB}			**		
CV(%)			0,8		

Trong cùng một cột hay hàng, các chữ cái theo sau các số giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua phép thử DUNCAN, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%

Kết quả sắc ký mẫu đỉnh lã ở bước sóng 230 nM thu được thời gian lưu của thiamine là 2,99 phút. Hàm lượng thiamine tương đối thấp trong cả ba loại mẫu (lá, thân và rễ, dao động từ 0,01 đến 0,06 mg/g) của đỉnh lã, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Hơn nữa, hàm lượng trung bình của thiamine trong cây 1, 2 và 3 năm tuổi, lần lượt là 0,02, 0,03 và 0,03 mg/g. Tuy nhiên ở cây đỉnh lã 5 năm tuổi có hàm lượng thiamine cao nhất (0,06 mg/g) so với các mẫu cây ở các độ tuổi còn lại, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% (Bảng 5). Dựa vào sự tương tác của hàm lượng thiamine trong cây được đánh giá theo các chỉ tiêu bộ phận, thời gian sinh trưởng và sự tương tác giữa bộ phận và thời gian sinh trưởng cho thấy các số liệu đều có ý nghĩa khác biệt thống kê 1%. Trong đó rễ cây đỉnh lã 5 năm tuổi có hàm lượng thiamine cao nhất (0,1 mg/g TLK).

3.3. Ảnh hưởng của địa điểm thu mẫu đến hàm lượng một số dược chất trong cây đỉnh lã lá nhỏ 5 năm tuổi

Kết quả phân tích ở Bảng 6 cho thấy: hàm lượng tannic acid có trong tất cả các mẫu cây được trồng tại 4 địa điểm và cao nhất là trong cây được trồng tại Cần Thơ (49,43 mg/g), gấp 1,98 lần so với cây được

trồng tại Cà Mau (24,91 mg/g) và gấp 1,9 lần so với cây được trồng tại Hậu Giang (26,03 mg/g), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Dựa vào kết quả phân tích ở Bảng 6, địa điểm trồng (điều kiện sinh thái) có sự ảnh hưởng rõ rệt đến sự tích lũy của tannic acid trong cây đỉnh lã 5 năm tuổi. Sự khác biệt về điều kiện sinh thái có thể bao gồm các yếu tố: loại đất, cường độ ánh sáng và nhiệt độ tại đó. Theo kết quả đo đạc về khí tượng trong suốt thời gian thí nghiệm, các cây đỉnh lã trồng ở Cần Thơ có hàm lượng tannic acid cao nhất là do yếu tố thổ nhưỡng và nhiệt độ trung bình cao hơn so với các địa điểm còn lại. Xét về lượng nước thì lượng mưa trung bình ở Cà Mau, Hậu Giang, Cần Thơ và An Giang lần lượt là 2360 mm/năm, 1800 mm/năm, 1700 mm/năm và 1478 mm/năm. Dựa vào các nghiên cứu của Wei et al. (2016), lượng nước có mối tương quan nghịch với hàm lượng tannin, điều này ngược với kết quả thống kê ở Bảng 6 (ngoài trừ ở địa điểm Cà Mau). Nguyên nhân là do lượng nước ở từng địa điểm trồng khác nhau chứ không phụ thuộc hoàn toàn vào lượng mưa trung bình hoặc có thể là do sự tác động của lượng nước lên quá trình sinh tổng hợp tannic acid trong cây đỉnh lã chưa rõ rệt.

Bảng 6. Hàm lượng các dược chất trong rễ cây đinh lăng 5 năm tuổi được trồng tại 4 địa điểm

Địa điểm trồng	Hàm lượng dược chất (mg/g)				
	Tanic acid	Saponin	Veratrine	Quercetine	Thiamine
Cà Mau	24,91 ^c	40,15 ^a	0,86 ^a	3,75 ^a	0,12 ^a
Cần Thơ	49,43 ^a	39,83 ^b	0,20 ^c	3,10 ^b	0,09 ^b
Hậu Giang	26,03 ^b	39,86 ^b	0,50 ^b	3,09 ^b	0,10 ^b
An Giang	25,17 ^{bc}	40,07 ^a	0,510 ^b	3,80 ^a	0,12 ^a
P	**	**	**	*	**
CV (%)	0,05	0,02	0,06	0,05	0,02

Trong cùng một cột, các chữ cái theo sau các số giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua phép thử DUNCAN, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Từ Bảng 6, hàm lượng saponin của đinh lăng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% khi trồng ở các địa điểm khác nhau, trong đó hàm lượng saponin cao nhất là đinh lăng trồng ở Cà Mau và An Giang (lần lượt là 40,15 và 40,07 mg/g) thấp nhất là đinh lăng trồng ở 2 địa điểm Cần Thơ và Hậu Giang. Kết quả cho thấy, hàm lượng veratrine của các mẫu đinh lăng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% khi trồng ở các địa điểm khác nhau. Trong đó, các cây đinh lăng trồng tại Cà Mau có hàm lượng veratrine cao nhất (0,86 mg/g TLK) và các cây đinh lăng trồng tại Cần Thơ có hàm lượng veratrine thấp nhất (0,02 mg/g TLK).

Từ Bảng 6 cũng cho thấy, hàm lượng quercetine của đinh lăng trồng tại Cà Mau và An Giang có hàm lượng cao nhất (lần lượt là 3,75 và 3,80 mg/g TLK), thấp nhất là đinh lăng trồng tại Cần Thơ và Hậu Giang, khác biệt có ý nghĩa thống kê 5%. Tương tự, đối với thiamine thì cây đinh lăng trồng tại Cà Mau và An Giang, hàm lượng thiamine cao nhất (0,12 mg/g), cây đinh lăng được trồng ở hai địa điểm Cần Thơ và Hậu Giang là thấp nhất (Bảng 6), khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%.

Kết quả phân tích cho thấy địa điểm trồng có ảnh hưởng lên sự tích lũy của các dược chất trong cây đinh lăng. Trong đó, cây đinh lăng được trồng tại Cà Mau và An Giang chứa nhiều dược chất hơn hẳn gồm: saponin (lần lượt là 40,15 và 40,07 mg/g), veratrine (0,86 và 0,50 mg/g) và thiamine (0,12 mg/g) so với các cây đinh lăng ở các địa điểm trồng ở Cần Thơ và Hậu Giang. Mẫu đinh lăng được trồng tại Cần Thơ có hàm lượng tannic acid cao nhất nhưng lại có hàm lượng các dược chất khác là thiamine, veratrine và quercetine tương đối thấp.

Ngoài ra, kết quả phân tích cho thấy, trong số 05 loại dược chất được khảo sát thì hàm lượng saponin và tannic acid trong cây đinh lăng là cao nhất. Đây là nguyên nhân vì sao cây đinh lăng được sử dụng làm thuốc từ xa xưa và tiếp tục được nghiên cứu và

phát triển trong thời đại tây y đã và đang phát triển cực kỳ mạnh mẽ vì tannic acid có tác dụng khử các gốc tự do ở mức độ cao (Manach et al., 2005) nên có khả năng bảo vệ cơ thể khỏi nhiều căn bệnh nguy hiểm có nguyên nhân từ gốc tự do và stress oxy hóa. Ngoài ra, tannic acid còn có tác dụng như: làm giảm nhiễm độc do nọc rắn, trị bỏng và được dùng để điều chế thuốc trị tiêu chảy và chống dị ứng.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả thí nghiệm cho thấy, thời gian sinh trưởng, bộ phận cây và địa điểm trồng có sự ảnh hưởng đến quá trình tích lũy của các hoạt chất trong cây đinh lăng lá nhỏ (*P. fruticosa* (L.) Harms). Trong đó, cây 5 năm tuổi có hàm lượng các dược chất tannic acid, quercetine, veratrine, và thiamine (lần lượt là 88,71, 3,86, 1,09 và 0,1 mg/g TLK), cao nhất so với các cây 1, 2 và 3 năm tuổi. Ngoài ra, khi phân tích các dược chất này thì bộ phận rễ của cây cũng có xu hướng có hàm lượng dược chất cao hơn so với bộ phận thân và lá.

Cây đinh lăng lá nhỏ 5 năm tuổi trồng tại Cà Mau và An Giang có hàm lượng các chất cao hơn so với các cây trồng ở các địa điểm còn lại.

Qua phương pháp giải trình tự ITS, 09 mẫu đinh lăng được giải trình tự thuộc các loài *Polyscias* sp., *P. fruticosa*, *P. quilfoylei* và *P. scutellaria*. Kết quả phân tích cho thấy có sự đa dạng di truyền của các mẫu đinh lăng và không có sự tương quan giữa khoảng cách di truyền và khoảng cách địa lý.

4.2. Đề nghị

Có thể khảo sát thêm hàm lượng dược chất bằng phương pháp sắc ký khác, các tác nhân bất lợi cho cây trồng, cũng như độ tuổi và thời gian trồng lên sự tích lũy các hoạt chất trong cây đinh lăng lá nhỏ (*P. fruticosa* (L.) Harms). Từ đó, có thể khuyến cáo và tổng hợp thành quy trình canh tác thích hợp trên cây

đỉnh lãng nhằm đóng góp vào quá trình sản xuất các sản phẩm dược liệu có nguồn gốc tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15. <https://doi.org/10.2307/2419362>
- Hồ, P. H. (2000). *Cây cỏ Việt Nam* - quyển 2. Nhà xuất bản Trẻ.
- Hương, N. T. T., & Bích, L. K. (2001). Nghiên cứu tác dụng chống trầm cảm và stress của đỉnh lãng. *Tạp chí Dược liệu*, 6(2-3), 84-86.
- Larsson, S., Wiren, A., Ericsson, T., & Lundgren, L. (1986). Effects of light and nutrient stress on defensive chemistry and susceptibility to *Galerucella lineola* (Coleoptera, Chrysomelidae) in two *Salix* species. *Oikos*, 47, 205-210. <https://doi.org/10.2307/3566047>
- Lee, J., Kim, C. S., & Lee, I. Y. (2015). Discrimination of *Echinochloa colona* (L.) Link from other *Echinochloa* Species using DNA Barcode. *Weed Turf. Sci.*, 4(3), 225-229. <https://doi.org/10.5660/WTS.2015.4.3.225>
- Lợi, Đ. T. (1995). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 230S-242S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S>
- Stecher, G., Liu, L., Sanderford, M., Peterson, D., Tamura, K., & Kumar, S. (2014). MEGA-MD: molecular evolutionary genetics analysis software with mutational diagnosis of amino acid variation. *Bioinformatics*, 30(9), 1305-1307. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu018>
- Waller, G. R., & Nowacki, E. K. (1978). Environmental Influences on Alkaloid Production. In *Alkaloid Biology and Metabolism in Plants*, 85-119. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0772-3_3
- Wei, L. Yin, D., Li, N., Hou, X., Wang, D., Li, D., & Liu, J. (2016). Influence of Environmental Factors on the Active Substance Production and Antioxidant Activity in *Potentilla fruticosa* L. and Its Quality Assessment. *Sci Rep*, 6, 1-18. <https://doi.org/10.1038/srep28591>
- White, T. J., Bruns T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., (editors). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp.315-322). Academic Press; New York. USA. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18, 6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., & Han, J. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *Plos One*, 5(10), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Công ty Cổ phần Đầu tư Thủy Sơn.