

TÌM HIỂU SỰ PHÁT SINH CHỒI TỪ MÔ SẸO LÁ CÂY DÂY CHIỀU (*Tetracera scandens* L.)

Phạm Thị Bích Ngọc, Phan Ngô Hoang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 09 tháng 03 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 17 tháng 08 năm 2009)

TÓM TẮT: Cây Dây chiều (*Tetracera scandens* L.), một nguồn dược liệu quan trọng, góp phần điều trị một số bệnh như: phù thận, lợi tiểu, gout.... Mô sẹo được tạo ra từ lá trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung 2,4-D 2,5mg/l và BA 0,5mg/l. Trước khi cảm ứng tạo chồi, mô sẹo được tăng trưởng trên môi trường có bổ sung BA 0,5mg/l và GA₃ 0,5mg/l. Sự phát sinh chồi xảy ra trên môi trường MS có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l. Số chồi phát sinh đạt 26 chồi/khối mô sẹo (có nguồn gốc từ 0,3cm² mô lá). Các biến đổi hô hấp, hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng, nguồn gốc sự phát sinh đã được phân tích.

Từ khóa: Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, cây Dây chiều, mô sẹo, sự phát sinh chồi.

1. MỞ ĐẦU

Dây chiều (*Tetracera scandens* L.) là loài dây trườn, mọc phổ biến ở rừng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Ở Việt Nam, cây Dây chiều thường gặp ở rừng vùng Định Quán (Đồng Nai), khu vực đèo Cả (Vạn Ninh - Khánh Hòa), lá có lông nhám nhờ tầm nhiều SiO₂ và đã được sử dụng như một loại giấy chà nhám trong công nghệ sơn mài^[8]. Thân và lá cây Dây chiều hiện đang được các Thầy thuốc Đông y sử dụng như một loại thuốc hạ nhiệt, điều trị kiết, phù thận, bệnh gout... Ngoài ra, sự hiện diện của betulin, một hợp chất triterpen tự nhiên có khả năng điều trị bệnh sốt rét và các bệnh viêm nhiễm có nguồn gốc từ vi khuẩn... cho thấy Dây chiều (*Tetracera scandens* L.) là cây thuốc đầy hứa hẹn^[3, 5, 8]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày bước đầu phân tích khả năng phát sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ lá, đây là cơ sở cho sự vi nhân giống và phát triển cây thuốc này trong tương lai.

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu: Lá cây Dây chiều (*Tetracera scandens* L.) *in vitro*.

Phương pháp

Nuôi cấy mô sẹo. Các lá được tạo vết thương qua các gân chính và đặt trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962)^[7] có bổ sung 2,4-D 2,5mg/l và BA 0,5mg/l. Các mẫu được đặt trong tối ở điều kiện nhiệt độ 22 ± 2°C và ẩm độ 65%.

Sau 2 tuần nuôi cấy, mô sẹo được chuyển sang môi trường MS bổ sung BA 0,5mg/l và GA₃ 0,5mg/l và tiếp tục tăng trưởng trong điều kiện tương tự nhưng được chiếu sáng với cường độ ánh sáng 2500 ± 500lux (12/12).

Sự phát sinh chồi từ mô sẹo lá. Sau 4 tuần tăng trưởng trên môi trường MS bổ sung BA 0,5mg/l và GA₃ 0,5mg/l, mô sẹo được cắt thành các mảnh nhỏ kích thước 0,3 x 0,3cm và chuyển sang các môi trường sau:

- (1) MS có bổ sung BA 0,7mg/l;
- (2) MS có bổ sung BA 0,7mg/l và GA₃ 0,5mg/l;
- (3) MS có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l;
- (4) MS (đối chứng).

Theo dõi sự phát sinh chồi theo thời gian nuôi cấy ở ánh sáng $2500 \pm 500\text{lux}$ (12/12), nhiệt độ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm 65%.

Quan sát hình thái giải phẫu. Cấu trúc của lá, mô sẹo, chồi đang phát sinh được xác định bằng cách giải phẫu, nhuộm hai màu, quan sát dưới kính hiển vi và chụp ảnh.

Ly trích, cô lập và xác định hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật. Hoạt tính của IAA, zeatin, GA_3 và ABA của các khối mô sẹo trên những môi trường tái sinh chồi sau 4 tuần được xác định bằng sinh trắc nghiệm sau sự ly trích và cô lập trên sắc kí bản mỏng Silicagel F₂₅₄, với dung môi di chuyển là chloroform: metanol: acetic acid (theo tỷ lệ 80: 15: 5), ở nhiệt độ 32°C [2, 6].

Đo cường độ hô hấp. Cường độ hô hấp của khối mô sẹo mang cụm chồi phát sinh trên các môi trường khác nhau được xác định bằng phương pháp áp kế Warburg.

Xử lý số liệu. Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS) phiên bản 11.5. Sự sai biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$.

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Sự tạo sẹo

Sau 1 tuần trên môi trường tạo sẹo, các mẫu lá bắt đầu cong lên, mô sẹo xuất hiện trước tiên tại các vị trí vết thương trên gân lá và lan rộng dần khắp bề mặt của lá. Sang tuần thứ hai, mô sẹo tăng sinh nhanh chóng và chiếm toàn bộ bề mặt của lá, mô sẹo có màu trắng, dạng chắc (ảnh 1).

Quan sát lát cắt ngang qua lá trước và sau khi tạo sẹo, ghi nhận các tế bào của gân lá được cảm ứng phân chia chủ yếu bao gồm các tế bào vùng tầng phát sinh libe-mộc và nhu mô dưới biểu bì lá (ảnh 2). Khi mô sẹo tăng trưởng trên môi trường MS có bổ sung BA 0,5mg/l và GA_3 0,5mg/l và được chiếu sáng, sự tăng sinh mô sẹo nhanh hơn. Sau 4 tuần, khối mô sẹo lớn, chắc và bắt đầu có màu xanh (ảnh 3).

Sự phát sinh chồi từ mô sẹo lá

Trên các môi trường phát sinh chồi, khối mô sẹo có những biểu hiện khác nhau. Sau một tuần trên các môi trường có bổ sung chất điều hòa tăng trưởng đều xuất hiện các nốt nhỏ li ti; qua lát cắt dọc, trên các nốt này đều có cấu trúc đầy đủ một chồi với mô phân sinh và các phác thể lá xung quanh (ảnh 4).

Ở tuần thứ 3, tất cả các mẫu cây đều có chồi xuất hiện, riêng trên môi trường MS đối chứng chỉ xuất hiện các nốt tròn màu xanh.

Ở tuần thứ 4, các chồi tiếp tục phát triển và hiện diện rất rõ với các lá mang nhiều lông, số lượng chồi xuất hiện trên các môi trường này cũng đã khác biệt (ảnh 5, bảng 1).

Trong khi đó, các mô sẹo được duy trì liên tục trên môi trường có bổ sung BA 0,5mg/l và GA_3 0,5mg/l vẫn không ghi nhận được phát sinh chồi, sau 4 tuần.

Bảng 1. Số chồi phát sinh trên các môi trường khác nhau, sau 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường	Số chồi/ khối mô sẹo
MS	$0,00 \pm 0,00^a$
MS có bổ sung BA 0,7mg/l	$10,12 \pm 1,54^b$
MS có bổ sung BA 0,7mg/l và GA_3 0,5mg/l	$15,33 \pm 2,60^c$
MS có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l	$26,33 \pm 0,88^d$

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$.

Chồi phát sinh chồi xảy ra nhiều nhất trên môi trường có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l (đạt 26 chồi/mô sẹo). Sự kết hợp auxin hàm lượng thấp này đã gia tăng hiệu quả tác động của cytokinin trong quá trình phát sinh chồi, cytokinin đóng vai trò quan trọng trong sự phân chia và biệt hóa tế bào đã được nhiều tác giả chứng minh trên các loài thực vật khác [4,9].

Khi tách các chồi từ cụm chồi phát sinh sau 6 tuần và chuyển sang môi trường MS, các chồi này tăng trưởng tốt với các lá mới (ảnh 6). Tuy nhiên, trong suốt quá trình tăng trưởng, chúng tôi vẫn chưa ghi nhận được sự ra rễ từ các chồi này.

Hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong mẫu cây trên các môi trường sau 4 tuần có sự thay đổi, hoạt tính GA₃ tăng cao trong mẫu được đặt trên môi trường có bổ sung loại hormon này; sự thay đổi hoạt tính của ABA và IAA không rõ rệt. Sự hiện diện của zeatin có sự khác nhau, đặc biệt trên các môi trường có sự phát sinh chồi (bảng 2).

Các mẫu cây trên môi trường BA 0,5mg/l và GA₃ 0,5mg/l có tỉ lệ zea/IAA rất thấp (tương tự đối chứng). Trong khi đó, trên hai nghiệm thức còn lại, đặc biệt trên môi trường có BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l, tỉ lệ này khá cao. Theo các tác giả, trong một vài trường hợp, zea cũng được tổng hợp ngay trên chồi và sự hiện diện của nhóm hormon này đã hỗ trợ auxin trong sự tăng trưởng. Sự cân bằng của hai hormon IAA và zea là một trong những yếu tố kiểm soát sự phát triển [1,4].

Bảng 2. Hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật của khối mô sẹo mang cụm chồi được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau, sau 4 tuần.

Môi trường	Hoạt tính các chất điều hòa nội sinh (mg/l)			
	Zea	GA ₃	IAA	ABA
MS	1,18 ± 0,02 ^b	1,17 ± 0,23 ^a	1,04 ± 0,18 ^c	0,37 ± 0,03 ^a
MS + BA 0,5mg/l + GA ₃ 0,5mg/l	0,86 ± 0,06 ^a	2,02 ± 0,03 ^c	0,72 ± 0,14 ^a	0,50 ± 0,10 ^c
MS + BA 0,7mg/l + GA ₃ 0,5mg/l	1,45 ± 0,04 ^c	2,32 ± 0,21 ^d	1,01 ± 0,15 ^b	0,38 ± 0,02 ^b
MS + BA 0,7mg/l + IAA 0,1mg/l	1,73 ± 0,13 ^d	1,84 ± 0,08 ^b	1,15 ± 0,05 ^d	0,53 ± 0,17 ^d

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$.

Cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của cụm chồi phát sinh từ mô sẹo trên các môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật sau 4 tuần đều cao hơn so với môi trường MS, trong đó cụm chồi trên môi trường MS có bổ sung BA 0,7mg/l và GA₃ 0,5mg/l có trị số hô hấp cao nhất (bảng 3).

Bảng 3. Cường độ hô hấp của cụm chồi trên các môi trường khác nhau, sau 4 tuần.

Môi trường	Cường độ hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g/giờ}$)
MS	25,35 ± 1,64 ^a
MS có bổ sung BA 0,7mg/l	32,17 ± 5,26 ^b
MS có bổ sung BA 0,7mg/l và GA ₃ 0,5mg/l	40,84 ± 16,36 ^d
MS có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l	37,78 ± 18,5 ^c

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$.

Trong quá trình phát sinh chồi, nhu cầu năng lượng được cung cấp từ sự hô hấp tế bào, khi hô hấp mạnh sẽ tạo ra nhiều năng lượng thuận lợi cho việc tạo chồi. Cường độ hô hấp cao ở môi trường có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l là điều kiện tốt cho sự phát sinh và tăng trưởng của các chồi. Trên môi trường có bổ sung BA 0,7mg/l và GA₃ 0,5mg/l, cường độ hô hấp cao nhất nhưng số chồi xuất hiện ở đây không đạt đỉnh, có thể ngoài sự hỗ trợ cho sự phát sinh chồi năng lượng tạo ra từ quá trình hô hấp đã được sử dụng cho việc tăng trưởng của khối mô sẹo xung quanh các chồi mới phát sinh sau đó [1,9].

4. KẾT LUẬN

- Sự phát sinh chồi từ mô sẹo lá cây Dây chiều tốt nhất (đạt 26 chồi /khối mô sẹo) theo qui trình sau: mô sẹo lá tạo ra trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 2,5mg/l và BA 0,5mg/l; sau 2 tuần, mô sẹo được chuyển sang môi trường MS bổ sung BA 0,5mg/l và GA 0,5mg/l; sự tái sinh chồi xảy ra sau một tuần từ khi chuyển mô sẹo sang môi trường có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l.

- Hoạt tính của IAA, zeaxanthin thay đổi có nhiều ý nghĩa trong quá trình phát sinh, đặc biệt tỉ lệ zeaxanthin/IAA cao, số chồi phát sinh nhiều đáng kể.

Trong thời gian tới, chúng tôi sẽ tiếp tục khảo sát sự phát triển rễ của các chồi này cũng như đánh giá mức độ biểu hiện dược tính của các cây này.

STUDY ON SHOOT REGENERATION FROM LEAF CALLUS OF *TETRACERA SCANDENS* L.

Pham Thi Bich Ngoc, Phan Ngo Hoang
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: *Tetracera scandens* is an important herb, used to treat some diseases, such as gout, kidney diseases... The callus is formed from leaf on MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with 2.5mg/l 2,4-D and 0.5mg/l BA. Before induced shoot regeneration, the callus had grown on MS medium supplemented with 0.5mg/l BA and 0.5mg/l GA₃. Shoot generation is actually induced on MS medium supplemented with 0.7mg/l BA and 0.1mg/l IAA. The number of shoot regeneration is about 26/callus (from 0,3cm² leaf tissue). Shoot origin, role of endogenous hormones and respiration rate in shoot regeneration were analysis.

Keyword: Callus, plant growth regulator, shoots regeneration, *Tetracera scandens* L.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

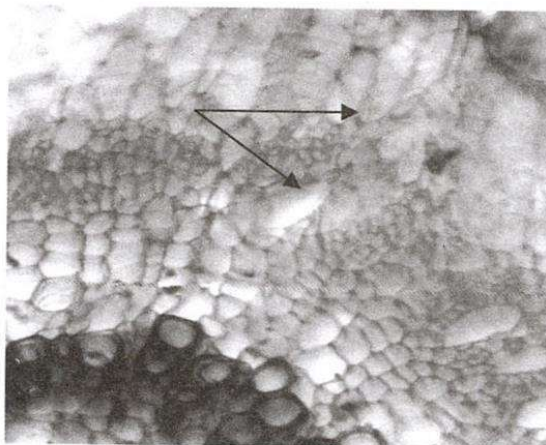
- [1]. Bùi Trang Việt, *Sinh lý thực vật đại cương - Phát triển*, Nxb. ĐH Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh, 333 trang, (2000).
- [2]. Bùi Trang Việt, *Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng "bông" và "trái non" Tiêu (Piper nigrum L.)*. Tập san khoa học Trường ĐH Tổng hợp TP. Hồ Chí Minh, số 1: 155-165, (1992).
- [3]. Jain S.K. and Philipps R.A. *Medicinal Plant of India*, vol 2, 849p, (1991).

- [4].Krikorian A. D. *Hormon in tissue culture and micropropagation*, In: *Plant hormones*. Edited by Davies P.J. Published by Kluwer Academic, 774-796, (2005).
- [5].Mai Thanh Thi Nguyen, Suresh Awale, Yasuhiro Tezuka, Quan Le Tran, Hiroshi Watanabe and Shigetoshi Kadota, *Xanthine oxydase inhibitory of Vietnamese medical plants*. Biol Pharm Bull Vol. 27 (9): 1414-1421, (2004).
- [6]. Meidner H. *Class experiments in plant physiology*. George Allen and Uniwin, London, (1984).
- [7].Murashige T. and Skoog F. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol Plant 15: 473- 497, (1962).
- [8].Phạm Hoàng Hộ, *Cây có vị thuốc ở Việt nam*. Nxb.Trẻ, (2006).
- [9].Phan Hoàng Anh, Phan Ngô Hoang và Bùi Trang Việt, *Vi nhân giống từ vảy hành của cây Huệ trắng*. Tạp chí Phát triển và Khoa học công nghệ Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Vol. 8(8): 43-48, (2005).

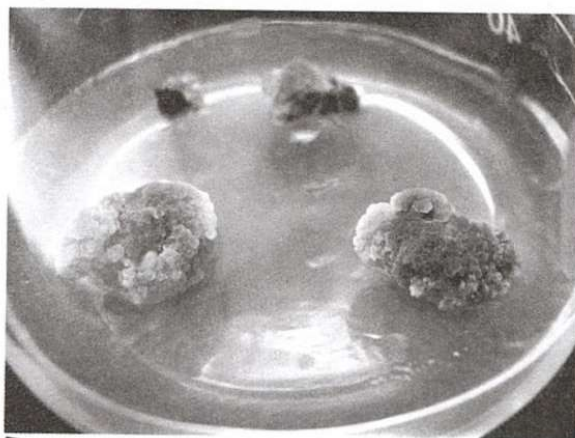
PHỤ LỤC



Ảnh 1. Mô sẹo được tạo ra từ lá sau 2 tuần trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 2,5mg/l và BA 0,5mg/l.



Ảnh 2. Lát cắt ngang qua vùng tạo sẹo.



Ảnh 3. Sự tăng trưởng của mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 0,5mg/l và GA₃ 0,5mg/l.



Ảnh 4. Phác thể chồi được thành lập từ mô sẹo lá sau 2 tuần trên môi trường MS có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l.



Ảnh 5. Chồi tái sinh từ mô sẹo sau 4 tuần trên môi trường MS có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l.



Ảnh 6. Chồi phát sinh từ mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung BA 0,7mg/l và IAA 0,1mg/l, tăng trưởng sau 1 tuần trên môi trường MS.