

NGHIÊN CỨU VỀ SỰ PHÁT SINH HÌNH THÁI TRONG NUÔI CẤY INVITRO CÂY ĐÌNH LĂNG (*Polyscias fructicosa*)

Lê Thiên Thư, Võ thị Bạch Mai

Khoa Sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP.HCM

(Bài nhận ngày 14 tháng 9 năm 2005, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 18 tháng 11 năm 2005)

TÓM TẮT: Mục đích của bài này là nhằm giới thiệu một số kết quả nghiên cứu mới về sinh phôi thể hệ với phương pháp nuôi cấy in-vitro cây đình lăng. Một số lượng lớn cây đình lăng được tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy in-vitro lá và thân non theo con đường sinh phôi thể hệ. Việc này có thể đáp ứng được nhu cầu cây giống phục vụ cho việc trồng trọt và cho các nghiên cứu về hợp chất thứ cấp, như saponin. Các mẫu đình lăng tạo được mô sẹo trong môi trường MS có 2,4 D 2mg/l. Cây chuyển mô sẹo 14 tuần tuổi sang môi trường có IAA 1mg/l đã cảm ứng sự tạo phôi thể hệ từ mô sẹo. Các kết quả nhận được cho thấy rằng sự thay đổi bản chất và nồng độ auxin của môi trường đã cảm ứng sự tạo phôi thể hệ ở cây đình lăng, các phôi này phát triển thành cây hoàn chỉnh sau 12 tuần nuôi cấy.

1. GIỚI THIỆU

Việt nam là nước nhiệt đới có đặc điểm khí hậu thuận lợi cho sự phát triển của thực vật, nên thảm thực vật ở nước ta rất phong phú và đa dạng về giống loài. Đặc biệt trong cây chứa rất nhiều hợp chất thiên nhiên như: saponin, alkaloid, triterpenoid, taxol... những hợp chất này được tạo ra trong con đường biến dưỡng thứ cấp.

Saponin là 1 glycosid, là một nhóm hợp chất tự nhiên thường gặp trong thực vật. Người ta biết khoảng 500 loài thuộc hơn 80 họ thực vật có saponin, hiện diện nhiều trong họ Araliaceae, đặc biệt là trong Nhân sâm^[5]. Hiện nay người ta đã chứng minh có nhiều loại saponin triterpen trong cây đình lăng có tính chất và tác dụng dược lí giống saponin trong nhân sâm. Hàm lượng các hợp chất thứ cấp trong cây tạo ra có giới hạn, không đủ đáp ứng nhu cầu về dược liệu. Vì thế nhiều nghiên cứu đã thực hiện nhằm góp phần gia tăng hàm lượng các chất thứ cấp cần thiết. Kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật là công cụ lí tưởng để nghiên cứu và gia tăng sản xuất hợp chất thứ cấp từ con đường biến dưỡng hợp chất thứ cấp.

Báo cáo này trình bày một số nghiên cứu về sự phát sinh hình thái trong nuôi cấy invitro cây Đình Lăng, nhằm mục đích tạo ra nhiều cây con *invitro* dùng trong trồng trọt và trong các nghiên cứu sau này.

2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Giới thiệu về cây Đình lăng và hợp chất tự nhiên trong cây Đình lăng *Polyscias Fruticosa* (L.) Harms

Cây Đình lăng (*Polyscias* sp.) Họ ngũ gia bì (Araliaceae) cùng họ với Nhân Sâm. Theo Phạm Hoàng Hộ (2000), có 10 loại Đình lăng hiện diện ở nước ta^[9]. Đa số đình lăng trồng hiện nay được sử dụng làm cây cảnh, chỉ có vài loại được dùng làm thuốc, giống đình lăng được sử dụng làm thuốc phổ biến nhất là *Polyscias Fruticosa*.

2.2. Thành phần hoá học trong một số bộ phận của cây Đinh lăng

Cây Đinh lăng có chứa alkaloid, glycosid, saponin, các vitamin tan trong nước như B₁, B₂, B₆, C và các phytosterin. Rễ Đinh lăng có tới 20 loại acid amin. Vỏ rễ và lá Đinh lăng chứa saponin. (Đỗ Huy Bích và cộng sự, 2004)^[2]

3. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP – KẾT QUẢ

3.1. Vật Liệu: Cây Đinh lăng được sử dụng để nghiên cứu là: *Polyscias fruticosa*.

3.2. Phương Pháp

3.2.1. Nuôi cấy chồi ngủ

Những đoạn thân có mang mầm ngủ của Đinh lăng được rửa sạch và khử trùng Hypocloric Canxi 1%, 2%, 3% trong 15 phút. Sau đó cấy vào môi trường MS₀ gồm: Đa lượng và vi lượng (Murashige và Skoog, 1962) + CW20% + Vitamin (Morel và Westmore, 1957) (1ml/l) + 20g đường + 7g agar trong 1 lít môi trường, được nuôi trong điều kiện ánh sáng 1000 lux, nhiệt độ 27 °C ± 1°C.

3.2.2. Sự tạo mô sẹo

Lá, thân các loài Đinh lăng được cấy vào các môi trường MS₁ (MS₀ + 2,4-D 1mg/l), MS₂ (MS₀ + 2,4-D 2mg/l), MS₃ (MS₀ + 2,4-D 3mg/l) nhiệt độ 27°C ± 1°C, sự nuôi cấy được thực hiện trong tối.

Quan sát hình thái giải phẫu của quá trình tạo sẹo ở Đinh Lăng bằng phương pháp cắt mẫu, nhuộm 2 màu son phen – lục iod và quan sát dưới kính hiển vi quang học.

3.2.3. Sự tạo phôi từ mô sẹo

Mô sẹo từ các mẫu cấy khác nhau (lá thân) của các loài đinh lăng trên MS₂ sau 14 tuần được cấy chuyển sang môi trường MS₄ (IAA 1mg/l + BA 0,5mg/l), MS₅ (IAA 1mg/l), MS₀.

3.3. Kết quả – nhận xét

3.3.1. Nuôi cấy mầm ngủ

Kết quả khử trùng mẫu với Hypo Cloric Canxi sau 15 phút được tóm tắt trong bảng 1

Bảng 1: kết quả khử trùng mẫu cấy cây Đinh Lăng với Hypo-Ca

Nồng độ Hypo-Ca (%)	Thời gian khử trùng (phút)	Tình trạng mẫu cấy
1	10	100% nhiễm
	15	10% mẫu sống không bị nhiễm
2	10	100% nhiễm
	15	25% mẫu sống, không bị nhiễm
3	10	95% nhiễm
	15	75% mẫu sống, không bị nhiễm

Nhận xét: Khử trùng với Hypo cloric canxi 3% trong thời gian 15 phút cho số chồi vô trùng cao nhất (75% sống, không bị nhiễm). Mầm ngủ phát triển nhanh sau 1 tuần nuôi cấy, sau 3 tuần chồi phát triển 2 lá được sử dụng cho các thí nghiệm về sau.

3.3.2. Sự tạo mô sẹo

Lá, thân Đinh lăng tạo mô sẹo tốt nhất trên môi trường MS₂ (MS₀ + 2,4-D 2mg/l) và MS₃(MS₀ + 2,4-D 3mg/l), (Ảnh 1)

Bảng 2: Khả năng tạo mô sẹo từ mẫu lá của cây Đinh lăng *Polyscias fruticosa* trong các môi trường nuôi cấy *invitro*

Môi trường nuôi cấy	Tỉ lệ mẫu cấy tạo sẹo (%)	Nhận xét tình trạng mẫu cấy (Ảnh 1)
MS ₁	70%	Tạo sẹo xanh, vẫn còn lá chưa tạo sẹo
MS ₂	80%	Tạo sẹo vàng xanh, nhiều hơn MS ₁
MS ₃	90%	Mô sẹo tạo nhiều, sẹo xanh

– Kết quả cho thấy trên môi trường MS₂ và MS₃ mẫu lá Đinh lăng tạo mô sẹo tốt nhất. Chọn môi trường MS₂ để tạo mô sẹo cho những thí nghiệm sau vì môi trường MS₃ với nồng độ 2,4-D 3mg/l cao hơn so với môi trường MS₂ có thể sẽ gây ra những biến dị trong mô cấy

– Quan sát hình thái giải phẫu của quá trình tạo sẹo ở Đinh Lăng cho thấy sự tạo mô sẹo ở lá có nguồn gốc từ sự phân phân hoá của tế bào nhu mô.

– Mô thân: mô thân *in vivo* của giống *P.fruticosa* sau 3 tuần nuôi cấy *invitro* trên môi trường MS₀ được cắt lát mỏng cấy vào MS₂ thấy sự tạo sẹo xảy ra sau 9 tuần nuôi cấy. Mô sẹo tiếp tục phát triển nhanh sau 15 tuần nuôi cấy.

3.3.3. Sự tạo phôi từ mô sẹo

-- Mô sẹo từ các mẫu cấy khác nhau của Đinh lăng *P.fruticosa* trên MS₂ sau 14 tuần được cấy chuyển sang môi trường MS₄ (IAA 1mg/l +BA 0,5mg/l)

Mô sẹo từ thân *P.fruticosa*: Phôi hình cầu xuất hiện sau 6 tuần nuôi cấy trên MS₄. Phôi trưởng thành sau 10 tuần nuôi cấy.

Mô sẹo từ lá có sự tạo phôi hình cầu sau 4 tuần nuôi cấy, phôi trưởng thành sau 8 tuần nuôi cấy. (ảnh 2)

– Như vậy khi thay đổi bản chất auxin và giảm nồng độ auxin: 2,4-D 2mg/l → IAA 1mg/l đã tạo nên sự tiến hoá phôi thể hệ ở mô sẹo lá và thân *P.fruticosa*.

– Trên môi trường MS₅ (IAA 1mg/l) mẫu cấy mô sẹo lá cũng xuất hiện phôi hình cầu sau 6 tuần nuôi cấy và các phôi này tiếp tục phát triển thành một phôi hoàn chỉnh sau 10 tuần (trẻ hơn trong môi trường MS₄).

– Môi trường MS₀ ở mẫu cấy mô sẹo lá cũng xuất hiện phôi hình cầu nhưng trẻ hơn sau 7 tuần nuôi cấy và số lượng phôi ít hơn. Từ những kết quả trên cho thấy sự giảm auxin đã dẫn đến sự tiến hoá phôi và tạo phôi trưởng thành.

– Các phôi trưởng thành này (sau 8 tuần) tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường MS₀ và phát triển thành cây hoàn chỉnh sau 4 tuần cấy chuyển. Như vậy thời gian cảm ứng tạo phôi, phôi trưởng thành và phát triển thành cây hoàn chỉnh là 12 tuần.

4. KẾT LUẬN

– Nồng độ Hypo Ca 3% trong thời gian 15phút thích hợp để khử trùng mẫu. Môi trường thích hợp để nuôi cấy cây Đinh lăng là MS₀ gồm: Đa lượng và vi lượng(Murashige và Skoog, 1962) + CW20% + Vitamin (Morel và Westmore, 1957) (1ml/l)+ 20g đường + 7g agar trong 1 lít môi trường.

- Môi trường thích hợp cho sự tạo mô sẹo của các vật liệu khác nhau (rễ, thân, lá) các loài Đinh lăng là môi trường MS₂ (MS₀ + 2,4-D 2mg/l) và MS₃ (MS₀ + 2,4-D 3mg/l). Sự giảm nồng độ auxin trong nuôi cấy mô sẹo 14 tuần tuổi *P.fruticosa* từ môi trường 2,4D-2mg/l sang môi trường không có chất điều hoà đã cảm ứng sự tạo phôi thể hệ.
- Trong tương lai, chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu tìm môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng của các hệ thống mô sẹo sao cho hàm lượng saponin trong mô là cao nhất.

THE MORPHOGENESE IN IN-VITRO CULTURE FOR *POLYSCIAS FRUCTICOSA*

Le Thien Thu, Vo Thi Bach Mai

Departement of Biology, University of Natural Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: The aim of the paper is to present some recent results on the study of morphogenesis in the in-vitro culture for *Polyscias Fructicosa*.

A large amount of *Polyscias Fructicosa* is produced by using the in-vitro culture for leaves and young trunks via somatic embryogenesis. This is satisfiable the demand of breeding plants used in culture and study of secondary compounds, such as saponin. The samples of *Polyscias Fructicosa* produce callus in MS media containing 2,4 D (2 mg/l). The transplantation for 14 weeks callus to NAA (1 mg/l) media induce the formation of somatic embryogenesis.

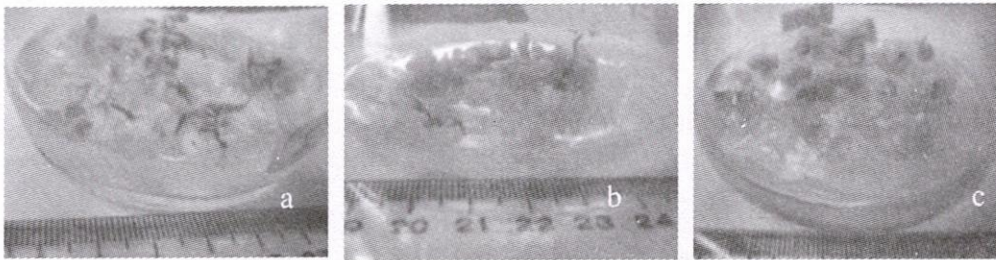
The obtained results point out that the media variation in nature and auxin concentration induce the somatic embryogenesis for *Polyscias Fructicosa*, these soma cell develop into plants during 12 weeks.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bùi Trang Việt, *Sinh lí thực vật đại cương, phần II, Phát Triển*. NXB ĐHQG Tp.HCM, 2000.
- [2]. Đỗ Huy Bích và các tác giả, *Cây thuốc và Động vật làm thuốc*, Tập I. NXB KH và KT, 2004.
- [3]. Eun-Joo Hahn và cộng sự. *Aventitious root cultures of Panax ginseng C.V.Mayer and ginsenoside production through large-scale bioreactor system*. J. Plant biotechnology, Vol 5 (1).pp 1, http://www.jplantbiotech.com/journal_dir
- [4]. Mulabagal Vanisree và cộng sự, *Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture*. Bt.Bull.Acad.Sin, 45: 1-22, 2003.
- [5]. Ngô Văn Thu. *Hoá học saponin*. Khoa dược, trường ĐH Y Dược Tp-HCM, 1990.
- [6]. Nguyễn Thị Diệu Em. *Tìm hiểu tác dụng diệt trừ một số loại côn trùng của vài nhóm hợp chất thiên nhiên trong cây Euphorbia Neriifolia Linn*. Khoá luận cử nhân khoa học, chuyên ngành sinh hoá, 20002.

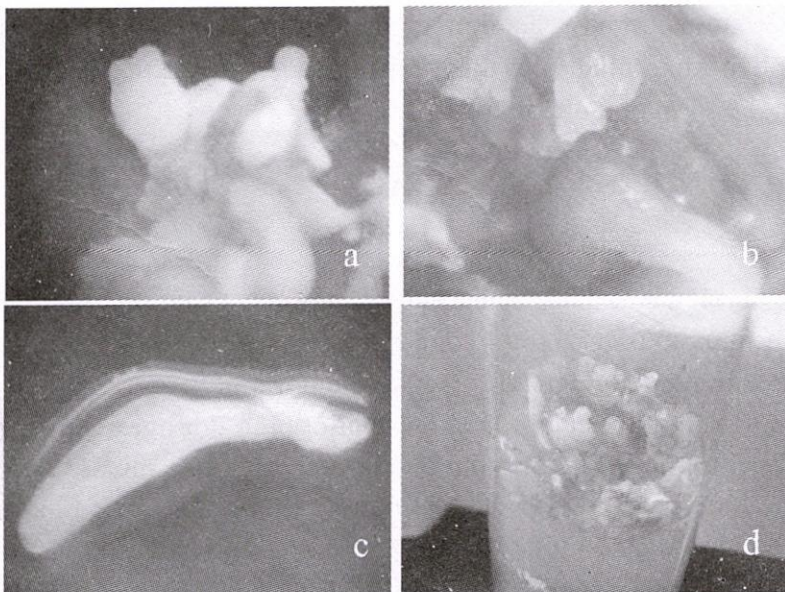
- [7]. Nguyễn Tấn Thiện. *Góp phần tìm hiểu thành phần hóa học của cây Đinh lăng Polyscias fruticosa (L.) Harms thuộc họ Nhân Sâm Araliaceae*. Luận văn thạc sĩ khoa học, chuyên ngành hoá hữu cơ, 2003.
- [8]. Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu. *Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc*. NXB Y học Tp.HCM, 1985.
- [9]. Phạm Hoàng Hộ. *Cây cỏ Việt Nam*, 2000.
- [10]. Trần Hùng và các tác giả. *Dược liệu chứa saponin*. Giáo trình thực tập dược liệu. Bộ môn dược liệu, Trường ĐH Y dược Tp.HCM, 2003.

HÌNH ẢNH MINH HOẠ



Ảnh 1: Sự tạo mô sẹo từ lá Đinh lăng *P. fruticosa* trên các môi trường khác nhau

- (a): MS₁: MS₀ + 2,4-D 1mg/l
 (b): MS₂: (MS₀ + 2,4-D 2mg/l)
 (c): MS₃: (MS₀ + 2,4-D 3mg/l)



Ảnh 2: Sự tiến hoá phôi từ mô sẹo đinh lăng lá nhuyễn trên môi trường MS₄

- (a) phôi hình cầu và tim muện,
 (b) phôi hình tim
 (c) phôi trưởng thành,
 (d) hệ thống nuôi cấy tạo phôi