

BƯỚC ĐẦU TÌM HIỂU KHẢ NĂNG NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH INVITRO CÂY ATISÔ (*CYNARA SCOLYMUS L.*)

Lê Thiên Thư, Võ Thị Bạch Mai

Bộ môn Sinh lí Thực vật- Di truyền, Khoa Sinh học, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên
Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh
(Bài nhận ngày 04 tháng 02 năm 2002)

TÓM TẮT: Sự kết hợp của NAA 0.1mg/l với BA 2.5 mg/l đã kích thích mầm ngủ tạo mô sẹo xanh (4 tuần) và tái sinh chồi từ mô sẹo (8 tuần). Trong khi đó đã kích thích đỉnh thân tạo cụm chồi sau 8 tuần. Kết quả khác nhau này là do nồng độ Auxin, Cytokinin, ABA nội sinh ở mầm ngủ cao hơn ở đỉnh thân và Gibberelin ở mầm ngủ thấp hơn ở đỉnh thân. Chồi cấy vào môi trường MS với BA 5mg/l cho hệ số nhân giống 30⁸ chồi/năm. Sự kết hợp của GA₃ 0.5mg/l và BA 0.5 mg/l đã kích thích đỉnh sinh trưởng tạo chồi. Hoa đầu tạo chồi trên môi trường có TDZ 1mg/l. Đỉnh thân và lát cắt mỏng của đỉnh thân tạo mô sẹo khi môi trường có sự kết hợp Auxin và Cytokinin, đặt trong điều kiện chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ 22±2 °C. Sự bổ sung Acid Ascorbic 15 mg/l làm giảm sự hóa nâu của mẫu. Xử lí BA 100mg/l đã gỡ sự ngủ của mầm ngủ ở gốc thân. Xử lí NAA 10-20mg/l lên chồi con đang phát triển tốt ngoài thiên nhiên đã kích thích tạo rễ nhanh và nhiều hơn không xử lí.

MỞ ĐẦU

Atisô là một loài thảo dược quý thuộc họ Cúc. Mọi bộ phận của cây như: rễ, thân, lá, hoa đều được sử dụng làm thuốc. Cây được nhân giống chủ yếu bằng phương pháp chiết cành. Tuy nhiên, phương pháp này có nhiều nhược điểm như hệ số nhân giống thấp, các chồi con không đồng nhất và một số bệnh truyền từ cây mẹ sang cây con ví dụ như bệnh rỗng ruột ở gốc thân. Việc li trích dược liệu từ các bộ phận của cây gặp những khó khăn như: các chất có dược tính dễ bị giảm hoạt chất trong khâu sơ chế, thành phần chất xơ chiếm khá nhiều...

Do đó, trong bài này chúng tôi tìm hiểu khả năng nhân giống vô tính Invitro từ các bộ phận của cây Atisô (*Cynara Scolymus L.*) và bước đầu nghiên cứu sự tăng sinh nhanh mô sẹo để từ đó có thể nghiên cứu tạo nhiều sản phẩm thứ cấp có dược tính từ mô sẹo của cây Atisô hầu có thể li trích dược liệu trực tiếp từ mô sẹo.

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

I. Vật liệu thực vật:

Chồi con đang phát triển tốt ngoài thiên nhiên, gốc thân có chứa mầm ngủ, hoa đầu còn non đường kính 1,5–2cm. Chồi con, mầm ngủ, hoa đầu được khử trùng và cấy trên môi trường đối chứng MS có Acid Ascorbic 15 mg/l.

II. Phương pháp:

Trong In-vivo:

Sự tạo rễ:

Chồi con đang phát triển tốt ngoài thiên nhiên nhưng chưa ra rễ, cắt bỏ lá để lại chồi cao khoảng 10 cm. Nhúng chồi vào dung dịch NAA với nồng độ 10, 20, 30, 40, 50 mg/l trong thời gian 5 phút sau đó cấy mẫu vào giá thể xơ dừa, sử dụng mỗi giá thể cho mỗi nồng độ NAA.

Đặt mẫu trong điều kiện: Ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ ngày, ẩm độ 80 %, nhiệt độ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Theo dõi thời gian tạo rễ.

Sự gỡ ngủ của mầm ngủ ở gốc thân cây Atisô

Nhỏ BA 100mg/l lên mầm ngủ ở gốc thân được tách rời từ cây mẹ. Theo dõi sự phát triển của mầm ngủ và thời gian có thể sử dụng mầm ngủ làm vật liệu khử trùng.

Trong In- vitro:

Sự tạo chồi:

Mầm ngủ, đỉnh thân, sau khi vô trùng cấy vào môi trường MS với NAA 0,1mg/l và BA 2,5mg/l .

Từ đỉnh thân vô trùng cấy vào môi trường Z₁ (BA 0.5mg/l + GA₃ 0.5 mg/l), Z₂ (AIA 0.5 mg/l + GA₃ 1mg/l) Z₃ theo dõi kết quả sau 2 tuần, 4 tuần.

Hoa đầu đã vô trùng cấy vào môi trường S₁ (TDZ 0.5mg/l + Adenin 40mg/l), S₂ (TDZ 1mg/l + Adenin 40mg/l), S₃ (TDZ 1mg/l). Theo dõi kết quả sau 2 tuần, 4 tuần.

Sự tạo mô sẹo

Đỉnh thân, lát cắt mỏng đỉnh thân cấy vào môi trường D₁ (NAA 1mg/l + 2,4-D 0.5mg/l), D₂ (NAA 1mg/l + 2,4-D 0.5 mg/l + BA 2mg/l), D₃ (NAA 1mg/l + BA 5mg/l) Sự nuôi cấy được thực hiện ở $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ẩm độ 80 %, ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ ngày.

Xác định chất Điều hòa Sinh trưởng Thực vật (DHSTTV)

Các chất DHSTTV (Auxin, Cytokinin, Giberelin và ABA) được li trích và đo hoạt tính nhờ sinh trắc nghiệm (Theo giáo trình thực tập hướng Sinh Học Thực Vật, 1997).[5]

III. KẾT QUẢ- THẢO LUẬN

A. Trong In- vivo

1. Sự tạo rễ

Ở nồng độ NAA cao (40 –50 mg/l) có hiện tượng tạo rễ ở chồi con nhưng rễ ngắn và to. Ở nồng độ NAA thấp (10- 30 mg/l) có sự tạo rễ dài và số lượng rễ nhiều. Do đó có thể NAA (10-30 mg/l) là thích hợp cho sự tạo sơ khởi rễ và kéo dài sơ khởi rễ ở Atisô. NAA cao đã kích thích chồi Atisô tạo sơ khởi rễ nhưng đã ngăn cản sự kéo dài sơ khởi rễ này. Điều này phù hợp với Mai Trần Ngọc Tiếng và Csv, 1980 [1]. Những rễ dài và số lượng rễ nhiều thì cần thiết hơn cho chồi con chúng hấp thu chất dinh dưỡng mạnh hơn là rễ mập, ngắn. Vì có thể những rễ mập, ngắn này chưa xuất hiện tầng lông hút.

Bảng kết quả tạo rễ ở chồi con Atisô

	Số rễ	NAA 0mg/l	NAA 10mg/l	NAA 20mg/l	NAA 30mg/l	NAA 40mg/l	NAA 50mg/l
Rễ dài	1- 2	12.9%	44.4%	37.5%			
	3		11.1%	28.9%	12.5%		
	4		10.3%	12.5%	14.8%		
	6- 7			12.5%		10%	10%

2- Sự tạo chồi

Việc xử lí BA 100mg/l lên mầm chồi của củ thân cây atisô đã gỡ được sự ngủ của mầm giúp mầm ngủ tái lập tăng trưởng, mầm ngủ tươi lên và phát triển chồi.

B. Trong in-vitro.

1. Ảnh hưởng của chất ĐHSTTV nội sinh lên sự ngủ của mầm ngủ Atisô và sự tạo chồi

Sự cân bằng Auxin/Cytokinin của mầm ngủ 2.19/0.826 (mg/l) nghiêng về phía Auxin nhiều hơn ở đỉnh thân 0.998/ 0.619 mg/l do đó dẫn đến sự cản ở mầm ngủ và kích thích mầm ngủ tạo mô sẹo và tái sinh chồi từ mô sẹo sau 8 tuần trong khi kích thích đỉnh thân tạo cụm chồi khi tương tác với 0.1mg/l NAA + 2.5 mg/l BA ngoại sinh .

2. Hệ số nhân giống

Chồi tách từ mầm ngủ cấy vào môi trường có BA 5mg/l đã cho hệ số nhân giống cao nhất với 30^8 chồi/năm.

3. Sự nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Ở môi trường có GA₃ 0.5 mg/l + BA 0.5 mg/l đỉnh sinh trưởng phát triển, lá dài, khỏe (2 tuần) và có sự xuất hiện chồi nách (4 tuần). Môi trường có GA₃ 0.5 mg/l + AIA 0.5 mg/l kích thích đỉnh sinh trưởng tạo mô sẹo. Trong khi môi trường chỉ có GA₃ thì chỉ kích thích đỉnh sinh trưởng kéo dài lá.

4. Sự tạo chồi trên hoa đầu

Môi trường MS có chứa TDZ 1mg/l đã kích thích hoa đầu tạo mô sẹo sau 3 tuần và tạo chồi sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường có TDZ 0.5 mg/l và 1mg/l kết hợp với Adenin 40mg/l đã kích thích hoa đầu tạo mô sẹo sau 4 tuần và chưa thấy xuất hiện chồi. Kết quả này cho thấy TDZ riêng lẻ có tác dụng tạo mô sẹo và tạo chồi nhanh hơn so với TDZ kết hợp với Adenin.

5. Sự tạo mô sẹo

Môi trường chỉ chứa Auxin NAA 1mg/l + 2,4-D 0.5mg/l không kích thích đỉnh thân tạo mô sẹo nhưng đã kích thích lát cắt mỏng tạo mô sẹo. Môi trường D₃ có chứa NAA 1mg/l + BA 5mg/l và môi trường D₂ có chứa NAA 1mg/l + 2,4-D 0.5 mg/l + BA 2mg/l đã kích thích đỉnh thân và lát cắt mỏng tạo mô sẹo. Điều này chứng tỏ bản thân một mình Auxin không thể kích thích đỉnh thân của Atisô tạo mô sẹo mà cần phải có sự hiện diện của Cytokinin

Cấy chuyển mô sẹo lát cắt mỏng ở D₃ sau 4 tuần qua môi trường D₁ và một môi trường MS1/2 (MS với đa lượng giảm 1/2) có BA 2mg/l + Glycine 2mg/l. Kết quả thu được ở môi trường D₁ mô sẹo có tăng sinh nhưng rất ít chỉ gấp 1,5 lần trước khi cấy chuyển trong khi ở môi trường với đa lượng giảm 1/2 có BA 2mg/l + Glycine 2mg/l mô sẹo gia tăng kích thước gấp 4 lần trước khi cấy chuyển.

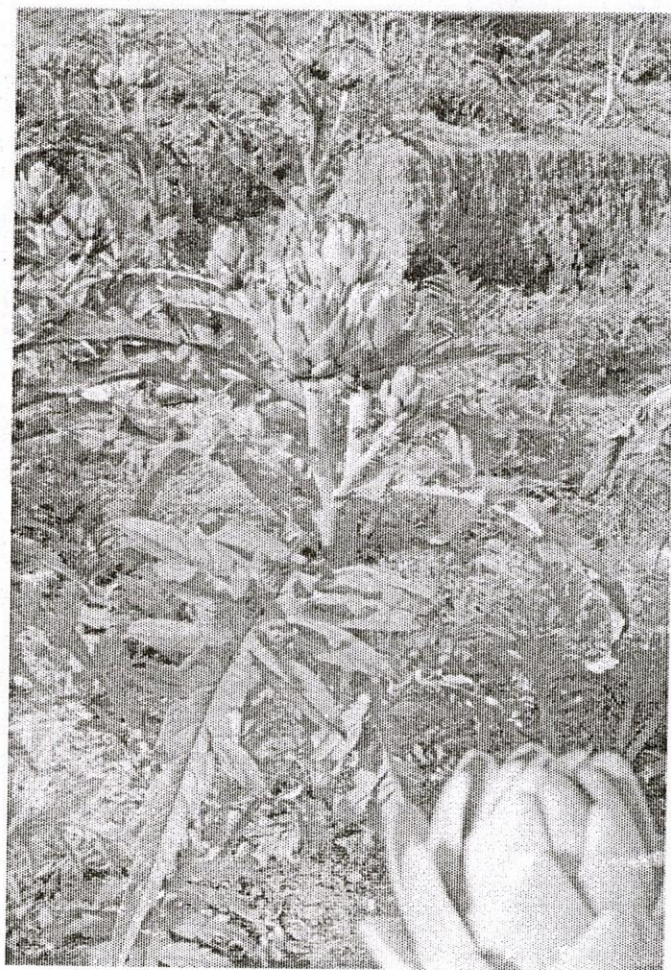
IV. KẾT LUẬN

- * Sự tạo rễ. Khi xử lí NAA với nồng độ cao có sự kích thích tạo sơ khởi rễ . Khi xử lí NAA với nồng độ thấp có sự tạo sơ khởi rễ nhưng sơ khởi này không kéo dài được.
- * Xử lí BA 100mg/l có tác dụng gỡ sự ngủ của mầm ngủ cây Atisô.
- * Môi trường A₁ có NAA(0,1mg/l) và BA (2,5 mg/l) đã kích thích mầm ngủ tạo mô sẹo và tái tạo chồi từ mô sẹo trong khi kích thích đỉnh thân tạo cụm chồi.
- * Môi trường với BA (5mg/l) cho hệ số nhân giống 30^8 chồi/năm.

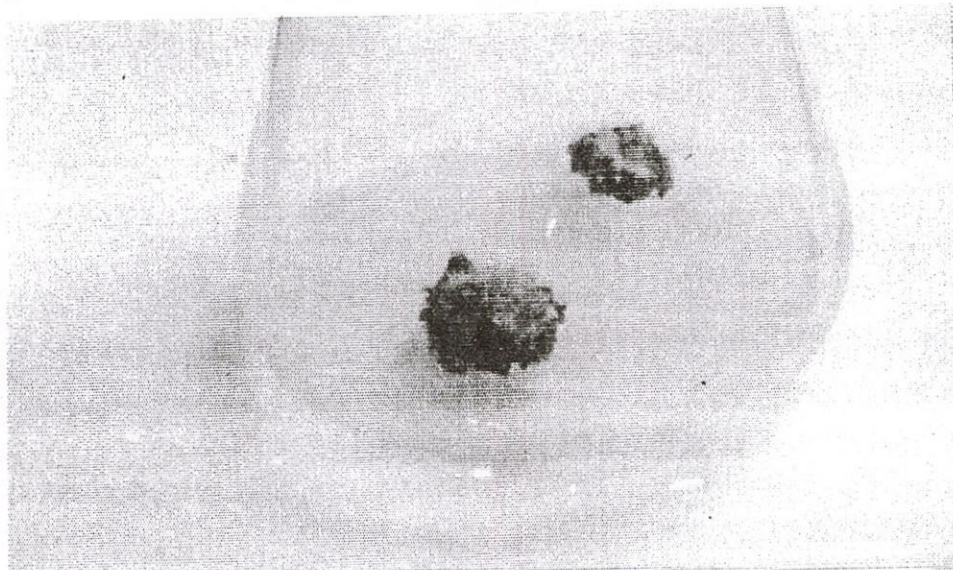
- * Môi trường với BA(0.5mg/l) và GA₃ (0.5mg/l) có thể sử dụng làm môi trường nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.
- * TDZ (1mg/l) đã kích thích sự tạo mô sẹo và tạo chồi trên hoa đầu.
- * Chỉ có Auxin không thể kích thích đỉnh thân tạo mô sẹo mà cần phối hợp với Cytokinin. Sự gia tăng mô sẹo ở môi trường chỉ có Cytokinin thì mạnh hơn môi trường có Cytokinin kết hợp với Auxin.

Trong tương lai chúng tôi sẽ tiến hành thí nghiệm xử lí BA trực tiếp lên mầm ngủ trên gốc thân còn trên cây mẹ ngoài thiên nhiên. Đồng thời, tiếp tục nghiên cứu môi trường nuôi cấy in-vitro thích hợp cho sự gia tăng nhanh mô sẹo và sản xuất ra nhiều sản phẩm thứ cấp có dược tính từ mô sẹo của cây Atisô để phục vụ cho Y học.

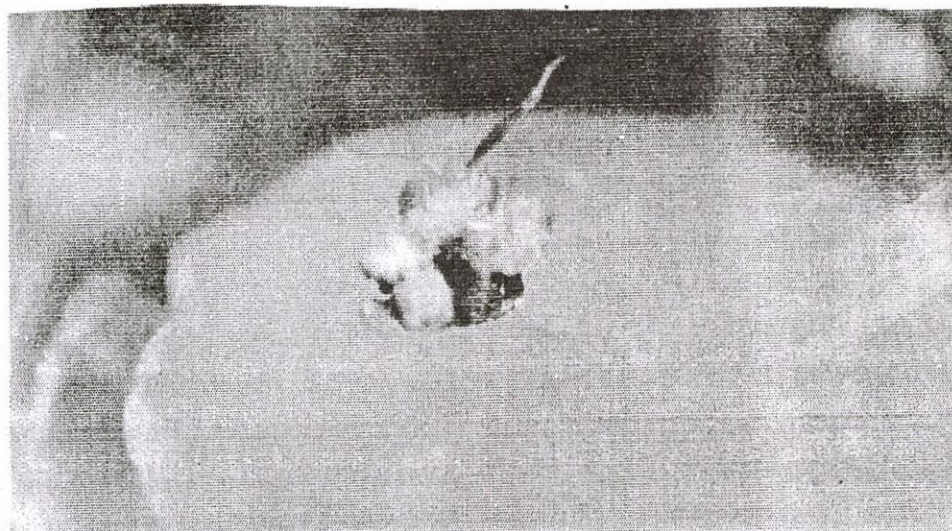
HÌNH ẢNH MINH HỌA



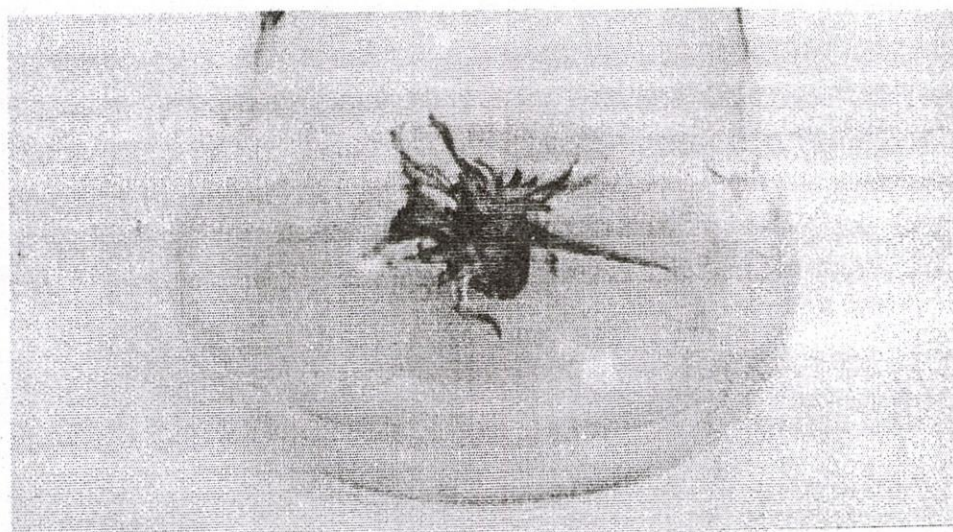
Hình 1: Cây Atisô giống thân đỏ.



Hình 2: Hoa đậu trong môi trường MS+ TDZ 1.0 mg/l.



Hình 3: Mô sẹo trong môi trường MS+ NAA 0.10 mg/l + BA 2.5 mg/l.



Hình 4: Chồi phát triển trong môi trường nhân chồi MS + BA 5.0 mg/l.

PRELIMINARY STUDY ON MICROPROPAGATION OF *CYNARA SCOLYMUS L.*

Le Thien Thu, Vo thi Bach Mai

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

(Received 04 February 2002)

ABSTRACT: The combination of 0.1 mg/l NAA and 2.5 mg/l BA stimulated lateral buds of *Cynara Scolymus* to form callus after 4 -weeks and regenerated shoot form the callus in 8 weeks. This combination stimulated shoot-tips, forming multiplication shoots after 8 weeks. These different results were due to endogenous such as Auxin, Cytokinin, and ABA level in the lateral buds (higher than in the shoot-tips) while the Giberelin level in lateral buds was lower than the shoot-tip. The shoot was planted on the MS medium with the combination of 5mg/l BA for forming 30⁸ shoot per year. The combination of 0,5 mg/l GA₃ and 0,5 mg/l BA stimulated meristem to form shoot. Flower-head form shoot on the 1 mg/l TDZ medium. Shoot-tips and thin cell layer of shoot- tips formed callus when the medium occurred the combination of Auxin and Cytokinin. They were incubated in growth chamber at 22± 2 °C with 16^h/ daylight form inflorescent lamps at 2000 lux. The combination of 15 mg/l acid Ascorbic retarded browning process of the explain in in-vitro culture. The treatment of 100mg/l BA stimulated the development of lateral buds.

TÀI LIỆU THAM KHẢO.

- [1]- Bùi Trang Việt, 2000. *Sinh Lí Thực Vật Đại Cương*, Phần II.
- [2]- Bùi Văn Lệ và các cộng tác viên, 2000. *Nhân giống nhanh và chuyển gen một số loài cây thực vật C₄ và cây cảnh khi dùng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào*. Hội nghị khoa học lần thứ 2. Báo cáo khoa học tháng 5-2000 (Trang 24).
- [3]- Các tác giả. *Tài nguyên cây thuốc Việt Nam*. NXB KH & KT. (Viện dược liệu. Chương trình tạo nguồn nguyên liệu làm thuốc) (trang 5).
- [4]- Lê Thị Thủy Tiên, 1997. *Tìm hiểu vài biến đổi hình thái và sinh lí trong quá trình hình thành mô sẹo từ lá và chồi trên củ khoai tây Solanum Tuberosum L*. Luận án Thạc sĩ Khoa học sinh học, chuyên ngành Sinh Lí Thực Vật.
- [5]- Bui Van Le, Dương Tan Nhut, Tran Thanh Van, 2001. *Manipulation of the Morphogenetic Pathways of Lilium Longiflorum Transverse Thin cell layer Explant By Auxin and Cytokinin* . In: *In vitro cell Dev. Biol – Plant* 37: 44-49,
- [6]- Héléne Benoit et Georges Ducreux, 1981. *Étude de quelques aspects de la multiplication végétative in-vitro de l'artichaut Cynara Scolymus L*. In *Agronomie*, 1981, 1 (3), 225 - 230 .