TÌM HIỂU SỰ PHÁT SINH PHÔI SOMA TỪ MÔ SẸO LÁ CÂY HÀ THỦ Ô ĐỎ *POLYGONUM MULTIFLORUM* THUNB. *IN VITRO*

Huỳnh Thị Đan San, Võ Thị Bạch Mai
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

TÓM TẮT: *Phát sinh phôi soma (somatic embryogenesis) in vitro là một trong những kỹ thuật mang lại hiệu quả vượt trội về tiềm năng nhân giống, hơn hẳn so với các kỹ thuật khác. Trong bài báo này, chúng tôi tìm hiểu sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo, những biến đổi đầu tiên của những tế bào sinh phôi đến giai đoạn hình thành phôi soma. Kết quả cho thấy: mô sẹo 8 tuần tuổi trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung naphthalene acid acetic (NAA) 2mg/l kết hợp với benzylaminopurine (BA) 0.5 mg/l chuyển sang môi trường MS có bổ sung 2,4- diclorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1mg/l (1 tuần) và MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật sau 2 tuần xuất hiện khối phôi hình cầu. Tiếp tục chuyển phôi hình cầu sang môi trường MS có bổ sung NAA 0.5 mg/l kết hợp với BA 0.5 mg/l và 10% nước dừa những phôi hình cầu tiếp tục phát triển qua giai đoạn phôi hình tim và phôi tử diệp.*

Từ khóa: *Polygonum multiflorum Thunb., mô sẹo, phôi vô tính, chất điều hòa sinh trưởng thực vật.*

1. MỞ ĐẦU

Hà thủ ô (HTO) đỏ là một dược liệu quý, được tìm thấy ở Trung Quốc vào năm 713, và được sử dụng như một loại thảo dược mang lại sự trường xuân cho con người. Bên cạnh đó, HTO đỏ còn có một số công dụng khác: rễ và thân có tính kháng khuẩn, chống xơ cứng động mạch, chống co thắt ruột, sử dụng để cầm máu, dùng làm thành phần của thuốc trợ tim, làm thuốc giảm đau và làm thuốc bổ; lá và rễ dùng làm thuốc bổ gan và thận, chống lão hóa; thân điều trị chứng mất ngủ, suy nhược thần kinh, có thể dùng để trị bệnh nấm ngoài da; toàn cây dùng để giải nhiệt hạ sốt. Các hợp chất có giá trị trong cây HTO đỏ: emodin, physcion, rhein, lecithin, catechin...(Dương Tấn Nhựt, 2006; Đỗ Tất Lợi, 2005).

Trong tự nhiên, HTO đỏ được trồng bằng cách giâm cành hoặc trồng bằng hạt (Đỗ Tất Lợi, 2005). Tuy nhiên, Lin (2003) đã xác định các cây HTO đỏ có nguồn gốc *in vitro* sẽ cho tỉ lệ các chất emodin và physcion cao hơn so với cây ngoài tự nhiên. Do đó, việc nhân nhanh số lượng cây HTO đỏ bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* để đáp ứng nhu cầu về dược liệu là hết sức cần thiết. Một trong những kỹ thuật để nhân nhanh số lượng cây được biết đến là tạo phôi soma.

Tuy nhiên, những nghiên cứu về cây HTO đỏ còn rất ít. Do đó, trong bài báo này, chúng tôi sẽ tìm hiểu sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo lá của cây HTO đỏ góp phần vào những nghiên cứu về cây HTO đỏ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu:

Mô sẹo lá của cây Hà thủ ô đỏ 8 tuần tuổi trên môi trường MS có bổ sung NAA 2mg/l và BA 0.5 mg/l.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tạo sẹo từ lá của chồi in vitro:

Lá ở vị trí số 3 của chồi Hà thủ ô đỏ *in vitro* được tạo vết thương bằng cách cắt ngang gân chính, đặt úp trên môi trường MS_1 (MS có bổ sung 2,4D 1mg/l) sau 2 tuần để hình thành mô sẹo. Sự nuôi cấy được đặt dưới ánh sáng 2500±500 lux, nhiệt độ 22±2^{0}C.

2.2.2. Theo dõi sự tăng sinh mô sẹo

Chuyển 0,5g mô sẹo lá hình thành trên môi trường MS_1 sang các môi trường khác nhau để theo dõi sự tăng sinh mô sẹo.

- MS_0: MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật
- MS_2: MS có bổ sung 2,4D 2mg/l
- MS_3: MS có bổ sung NAA 2mg/l

- MS_4: MS có bổ sung indole acetic acid (IAA) 2mg/l
- MS_5: MS có bổ sung indolebutyric acid (IBA) 2mg/l
- MS_6: MS có bổ sung NAA 0,5mg/l kết hợp với BA 2mg/l
- MS_7: MS có bổ sung NAA 2mg/l kết hợp với BA 0,5mg/l

Sự nuôi cấy được đặt dưới ánh sáng 2500±500 lux, nhiệt độ 22 ± 2^0. Theo dõi sự gia tăng trọng lượng tươi, màu sắc của mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy.

2.2.3. Theo dõi sự phát sinh phôi vô tính từ mô sẹo

Mô sẹo nuôi cấy trên môi trường MS_6 được chuyển sang môi trường MS_1 để cảm ứng tạo tế bào sinh phôi. Sau 5 ngày chuyển khối mô sẹo sang môi trường MS_0 theo dõi sự biểu hiện của mô sẹo.

Sau 2 tuần, chuyển các khối phôi hình cầu sang môi trường MS_8 (MS+0,5 mg/l NAA + 0,5 BA + 10% nước dừa). Theo dõi sự phát triển tiếp theo của phôi hình cầu.

2.2.4. Quan sát hình thái giải phẫu

Quan sát quá trình tạo mô sẹo từ lá, vị trí phân phân hóa của tế bào để hình thành mô sẹo; quan sát sự biến đổi hình thái tế bào mô sẹo trong quá trình phát sinh phôi vô tính.

3. KẾT QUẢ

3.1. Sự tạo sẹo từ lá của chồi *in vitro*

Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường MS mẫu lá bắt đầu cong lên và đến ngày thứ 7 xuất hiện mô sẹo tại các vết cắt ngang gân chính. Sau 2 tuần mô sẹo đã hình thành khắp bề mặt mẫu cấy. Mô sẹo trắng và mềm.

3.2. Sự tăng sinh mô sẹo

Mô sẹo lá sau 2 tuần trên môi trường MS_1 được chuyển sang các môi trường MS_2 đến MS_7. Chúng tôi nhận thấy có 2 hướng phát triển:

- Trên môi trường MS_2, MS_3 và MS_4 mô sẹo chủ yếu hình thành rễ, sự gia tăng trọng lượng tươi không đáng kể. Tuy nhiên rễ được hình thành trên các môi trường không giống nhau:
  - MS_3: rễ hình thành nhiều, to, phân nhánh nhiều và có rất nhiều lông hút.
  - MS_4: rễ hình thành nhiều, to và ngắn không thấy sự phân nhánh, sau đó nhanh hóa đen.
  - MS_5: rễ hình thành nhiều, dài rất nhiều lông hút.
- Trên môi trường MS_2, MS_6, MS_7 mô sẹo tăng sinh nhanh sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả được thể hiện ở bảng 1 và đặc điểm của mô sẹo được mô tả trong bảng 2.

Bảng 1. Sự gia tăng trọng lượng tươi của mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy

Môi trường	Trọng lượng tươi (g)				
	0 tuần	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần
MS_1	0,500±0,000	$0,630\pm0,047^a$	$0,673\pm0,040^a$	$0,703\pm0,001^a$	$0,755\pm0,013^a$
MS_5	0,500±0,000	$0,778\pm0,097^a$	$1,170\pm0,168^c$	$1,849\pm0,241^c$	$2,280\pm0,158^c$
MS_6	0,500±0,000	$0,663\pm0,100^a$	$0,896\pm0,050^b$	$1,626\pm0,155^b$	$1,730\pm0,037^b$

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

Bảng 2. Nhận xét đặc điểm của mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy	Đặc điểm của mô sẹo
MS_0	Mô sẹo trắng, mềm, tăng sinh chậm, trọng lương tươi thay đổi không đáng kể.
MS_2	Mô sẹo màu vàng, bở, tăng sinh nhanh sau đó hóa nâu (ảnh 2a)
MS_6	Mô sẹo trắng hơi vàng, tăng sinh nhanh, mềm (ảnh 2b)
MS_7	Mô sẹo trắng xanh, chắc, tăng sinh nhanh.

Sau 8 tuần nuôi cấy, trọng lượng tươi của mô sẹo trên môi trường MS_2 giảm dần và có hiện tượng hóa nâu. Quan sát tế bào mô sẹo ở môi trường MS_2 và MS_6, chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt rõ rệt. Trên môi trường MS_2, mô sẹo là khối tế bào dài và không thấy có sự phân chia tế bào sau 6 tuần nuôi cấy; trên môi trường MS_6 mô sẹo là khối tế bào tròn, đẳng kính, vách mỏng và tế bào chất đậm đặc. đây là những tế bào rất thích hợp để cảm ứng sinh phôi.

3.3. Sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo

Mô sẹo trên môi trường MS_6 được chuyển sang môi trường MS_1 sau 2 tuần và chuyển sang môi trường MS_0. Sau chúng tôi ghi nhận có sự xuất hiện của phôi hình cầu (ảnh 5a). Các phôi hình cầu được chuyển sang môi trường MS_8 sẽ tiếp tục phát triển thành phôi hình tim (ảnh 5b), và phôi tử diệp (ảnh 5c).

3.4. Quan sát hình thái giải phẫu

Quan sát quá trình tạo mô sẹo từ lá *in vitro*, chúng tôi nhận thấy có sự phản phân hóa của tế bào nhu mô lá sau 3 ngày nuôi cấy (ảnh 1b), đối chứng là lá vào ngày 0 (ảnh 1a). Sự phân chia mạnh mẽ của tế bào vùng tượng tầng xảy ra vào ngày thứ 7 (ảnh 1c).

Quan sát sự biến đổi của tế bào có khả năng sinh phôi: sau khi được cảm ứng trên môi trường MS_1 chuyển sang môi trường môi trường MS_0 sau 1 tuần đã thấy xuất hiện những tế bào phân chia không đối xứng để tạo ra 2 tế bào con (ảnh 4b). Sự phân chia tiếp theo cho 4 tế bào (ảnh 4c), 8 tế bào (ảnh 4d) và khối phôi hình cầu (ảnh 4e).

4. THẢO LUẬN

Mô sẹo là tập hợp tế bào không phân hóa có đặc tính phân chia mạnh, thường được tạo ra do những xáo trộn trong quá trình tạo cơ quan, nhất là sự tạo rễ. Do đó, cây non hay mảnh thân non của cây trưởng thành dễ cho mô sẹo trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, dưới tác dụng của một auxin mạnh (như 2,4 D) được áp dụng riêng rẽ hay phối hợp với cytokinin (Bùi Trang Việt, 2000).

Trong thí nghiệm tạo mô sẹo từ lá của cây HTO đỏ *in vitro*, chúng tôi nhận thấy mô sẹo được hình thành vào ngày thứ 7 khi đặt lá trên môi trường MS bổ sung 2,4D 1mg/l. Mô sẹo được hình thành từ sự phản phân hóa và phân chia của tế bào nhu mô và sự phân chia mạnh mẽ của tế bào vùng tượng tầng để tạo thành khối mô sẹo tại vết thương.

Mô sẹo tăng sinh nhanh trên môi trường MS có bổ sung NAA 2mg/l và BA 0.5mg/l, trên môi trường này mô sẹo là khối tế bào nhỏ, đẳng kính, tế bào chất đậm đặc rất giống với đặc tính của tế bào sinh phôi (ảnh 3b). Việc sử dụng các loại auxin riêng lẻ (NAA, IAA, IBA) không làm tăng sinh khối mô sẹo nhưng làm tăng khả năng biệt hóa tạo rễ. Các loại auxin khác nhau cho sự hình thành rễ có hình dạng khác nhau.

Phát sinh phôi soma là quá trình mà tế bào trải qua các điều kiện cảm ứng để tái sinh những tế bào sinh phôi và một loạt những biến đổi về hình thái và sinh hóa dẫn đến hình thành phôi soma. Phôi soma có thể hình thành trực tiếp từ bề mặt mẫu cấy hoặc gián tiếp thông qua mô sẹo. Mô sẹo thường được cảm ứng trên môi trường có bổ sung auxin ở hàm lượng cao và sau đó được chuyển sang môi trường không có bổ

sung chất điều hòa tăng trưởng thực vật hoặc môi trường bổ sung auxin ở nồng độ thấp hơn giúp cho sự phát triển của những tế bào cảm ứng sinh phôi. Tế bào mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung NAA 2mg/l và BA 0.5mg/l được cảm ứng trên môi trường MS có bổ sung 2,4 D 1mg/l và tạo những tế bào có khả năng sinh phôi. Đặc điểm hình thái của tế bào sau khi được cảm ứng để phát sinh phôi là sự di chuyển của nhân tế bào về gần vách và sự phân chia nhân xảy ra giữa tế bào và hình thành 2 tế bào con bất đối xứng (Iantcheva A., Vlahova M., Atanassov A., 2005). Tiếp theo sự phân chia bất đối xứng là giai đoạn 4, 8 tế bào. Sự phân chia tiếp theo dẫn đến sự hình thành khối tiền phôi với sự hiện diện lớp biểu bì ban đầu và khối phôi hình cầu, phôi hình cầu, phôi hình tim và phôi tử diệp.

5. KẾT LUẬN

Mô sẹo lá trên môi trường MS bổ sung 2,4D 1mg/l sau 2 tuần được chuyển sang môi trường MS bổ sung NAA và BA sau 8 tuần tạo được những tế bào có khả năng sinh phôi. Mô sẹo được cảm ứng tạo tế bào sinh phôi trên môi trường MS có bổ sung 2,4D 1mg/l sau 1 tuần và chuyển sang môi trường MS sau 2 tuần đã có sự xuất hiện của phôi hình cầu. Phôi hình cầu chuyển sang môi trường MS có bổ sung NAA ,BA và nước dừa 10% phát triển qua các giai đoạn phôi hình tim và phôi tử diệp.

STUDY ON SOMATIC EMBRYOGENESIS OF CALLUS IN *POLYGONUM MULTIFLORUM* THUNB. LEAF *IN VITRO*

Huynh Thi Dan San, Vo Thi Bach Mai
University of Natural Sciences, VNU-HCM

***ABSTRACT**: Somatic embryogenesis is a technology to propagation plant. Somatic embyos can be produced indirectly via callus. In this study, we observe somatic embryogenesis of callus in Polygonum multiflorum thunb. in vitro. Callus in the Murashide and Skoog medium (MS) supplied NAA 2mg/l and BA 0.5 mg/l after 8 weeks is used as the material for the research. It is transferred MS with 2,4 D 1 mg/l in 1 week and MS without plant growth regulator. After 2 weeks, globulars appear. To transfer globular to MS with NAA 0.5 mg/l, BA 0.5 mg/l and 10% coconut milk, heart and cotyledonary appear.*

***Key words:** Polygonum multiflorum Thunb., callus, somatic embryogenesis, hormone plant.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Bùi Trang Việt. *Sinh lý Thực vật Đại cương*. Phần II: Phát triển, NXB Đại học Quốc gia Tp.HCM (2000)

[2]. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Ngọc Kim Vy, Nguyễn Như Hà Vy và Đinh Văn Khiêm. Nghiên cứu khả năng hình thành mô sẹo, tái sinh chồi và nhân giống cây Hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.). *Tạp chí Công nghệ sinh học* 4 (4), 507-518, (2006)

[3]. Đỗ Tất Lợi. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học, trang 833-836 (2005)

[4]. Iantcheva A., Vlahova M., Atanassov A.. Somatic Embryogenesis in Genera *Medicago*: an Overview. *Plant Cell Monogr* (2), 285- 304, (2005)

[5]. George E.F., Hall M.A. and De Klerk G.-J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 1: The Background. Springer (2008)

[6]. Lin L.C., Nalawade S.M., Mulabagal V., Yeh M.S. and Tsay H.S.. Micropropagation of *Polygonum multiflorum* Thunb. and Quantitative Analysis of the Anthraquinones Emodin and Physcion Formed in *in Vitro* Propagated Shoots and Plants. Bio Pharm Bull 26 (10), 1467-1471, (2003)