

TÌM HIỂU SỰ PHÁT SINH HÌNH THÁI CHỒI TRONG NUÔI CÂY *IN-VITRO* CÂY NHÀU (*MORINDA CITRIFOLIA* L.)

Nguyễn Thị Ngọc Hương, Võ Thị Bạch Mai

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 01 tháng 09 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 16 tháng 03 năm 2010)

TÓM TẮT: Cây Nhàu *Morinda citrifolia* L. là cây dược liệu quý, được dùng để chữa nhiều loại bệnh như mất ngủ, đau lưng, huyết áp cao... Với mục đích tìm hiểu sự phát sinh hình thái chồi phục vụ cho việc nhân giống cây trong tương lai, chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của BA, Zeatin và NAA trên sự hình thành chồi ở trụ hạ diệp cây Nhàu. Kết quả cho thấy, sự phát sinh hình thái chồi ở cây Nhàu trải qua 3 giai đoạn. Trong quá trình này, zeatin 1mg/l kích thích sự hình thành sơ khởi chồi trong tối (sau 2 tuần) nhanh hơn BA ở cùng nồng độ. Khi phối hợp NAA 0,1mg/l và Zeatin 1mg/l sẽ làm chồi chậm xuất hiện (sau 5 tuần). Kết quả đo hô hấp và hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật cũng được thảo luận để làm rõ những thay đổi sinh lý trong sự hình thành chồi.

Từ khóa: *Morinda citrifolia* L., phát sinh hình thái rễ, chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

1. MỞ ĐẦU

Từ lâu, nhân dân ta cũng như nhiều dân tộc khác trên thế giới như Campuchia, Thái Lan, Ấn Độ ... đã sử dụng lá, thân, rễ và trái của cây Nhàu *Morinda citrifolia* L. để chữa nhiều loại bệnh như: huyết áp cao, loét dạ dày, viêm khớp, ung thư...

Đặc biệt, damnacanthol được trích từ rễ Nhàu là một tác nhân kìm hãm chức năng của gen *ras*-gen gây ung thư phổi, ruột kết, và tuyến tụy (Hiramatsu và cộng sự, 1993). 1-methoxy-2-foremlyl-3-hydroxyanthraquinone từ rễ Nhàu có thể đàn áp sự xâm nhiễm của HIV lên các tế bào MT-4 (Umezawa và cộng sự, 1992)... Tuy nhiên hiện nay, việc nhân giống cây thuốc quý này chủ yếu được thực hiện bằng cách gieo hạt trong thời gian dài (cây có thể được trồng bên ngoài khoảng 2 – 12 tháng sau khi nảy mầm) nhưng rất dễ bị sâu bệnh tấn công. Cây 8 – 12 tuần tuổi thường bị bệnh do nấm tạo đốm ở lá, giun tròn tạo nốt hoặc ký sinh làm thối rễ... (Nelson, 2003). Xuất phát từ nhu cầu thực tế về nguồn dược liệu với năng suất cao, sạch bệnh, thời gian thu hoạch ngắn, trong bài này chúng tôi tiến hành phân tích sự thay đổi hình thái và sinh lý trong quá trình phát sinh chồi từ trụ hạ diệp của cây nhằm hoàn thiện quy trình nhân giống cây thuốc này trong tương lai.

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Trụ hạ diệp của các cây *in-vitro* 1 tháng tuổi nảy mầm từ hạt (được nuôi trong điều kiện

nhệt độ $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $55 \pm 10\%$, ánh sáng $2000 \text{ lux} \pm 200 \text{ lux}$).

2.2. Phương pháp

2.1.1. Thí nghiệm tạo chồi

Khúc cắt trụ hạ diệp từ cây *in-vitro* 1 tháng tuổi (dài 1 cm) được đặt trên môi trường MS có bổ sung BA 1 – 3 mg/l và zeatin 1 mg/l riêng rẽ hay phối hợp với NAA 0,1mg/l.

Các mô cấy được che tối và đặt trong phòng nuôi có nhiệt độ $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $55 \pm 10\%$. Thời điểm xuất hiện chồi đầu tiên, tỷ lệ tạo chồi và số chồi được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy. Cường độ hô hấp và hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được ghi nhận tại các thời điểm 0, 1, 2 và 4 tuần sau khi nuôi cấy.

2.1.2. Quan sát hình thái giải phẫu

Lát cắt ngang, dọc qua trụ hạ diệp sau 1 và 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung zeatin 1mg/l được nhuộm 2 màu và quan sát dưới kính hiển vi quang học và chụp ảnh..

2.1.3. Đo cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của trụ hạ diệp nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung zeatin 1 mg/l được xác định tại các thời điểm 0 – 4 tuần bằng máy đo sự trao đổi khí (Hansatech) ở 28°C , trong tối. Kết quả thể hiện bằng lượng oxygen thoát ra/g trọng lượng tươi/ giờ.

2.1.4. Ly trích, phân đoạn và xác định hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật sinh trong mẫu lá và trụ hạ diệp tại các thời

điểm nuôi cấy khác nhau (trên môi trường MS có bổ sung zeatin 1 mg/l) được ly trích và phân đoạn bằng phương pháp trên sắc kí bản mỏng Silicagel F₂₄₅ (Meidner, 1984; Bùi Trang Việt, 1992; Yokota và cộng sự, 1980), với dung môi di chuyển là Chloroform: Metanol: Acid acetic (theo tỷ lệ 80:15:5), ở nhiệt độ 30°C. Hoạt tính của IAA, Zeatin, GA₃ và ABA được ước lượng bằng các sinh trắc nghiệm (Nguyễn Thị Ngọc Lang, 1970, trong Bùi Trang Việt, 1989).

2.1.5. Xử lý thống kê

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

3. KẾT QUẢ

3.1. Sự phát sinh chồi từ khúc cắt trụ hạ diệp

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA ở các nồng độ khác nhau và zeatin 1 mg/l trên sự hình thành chồi bất định từ trụ hạ diệp *in-vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

| Nghiệm thức | Thời gian xuất hiện chồi (tuần) | Tỷ lệ tạo chồi (sau 4 tuần) (%) | Số chồi (Sau 4 tuần) |
|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| Đối chứng (MS) | 8 | 0,0 ± 0,0 ^a | 0,0 ± 0,0 ^a |
| MS + BA 1 mg/l | 3 | 19,8 ± 4,4 ^b | 0,3 ± 0,1 ^a |
| MS + BA 2 mg/l | 3 | 79,2 ± 8,3 ^d | 2,2 ± 0,6 ^b |
| MS + BA 3 mg/l | 3 | 59,7 ± 5,0 ^c | 1,4 ± 0,3 ^b |
| MS + zeatin 1 mg/l | 2 | 96,5 ± 3,1 ^e | 3,6 ± 0,2 ^c |

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức 95%.

Cả hai loại cytokinin là BA và Zeatin đều kích thích sự hình thành chồi từ khúc cắt trụ hạ diệp. Tuy nhiên, trên môi trường MS có bổ

sung zeatin 1 mg/l, chồi xuất hiện sớm nhất (ở tuần 2) với tỷ lệ và số chồi cao nhất ở tuần 4. (bảng 1, ảnh 1).

Bảng 2. Ảnh hưởng của NAA 0,1 mg/l và zeatin 1 mg/l trên sự hình thành chồi bất định từ trụ hạ diệp *in-vitro* sau 5 tuần nuôi cấy

| Nghiệm thức | Thời gian xuất hiện sẹo (tuần) | Thời gian xuất hiện chồi (tuần) | Thời gian xuất hiện rễ (tuần) | Tỷ lệ tạo chồi sau 5 tuần (%) | Tỷ lệ tạo rễ (%) |
|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Đối chứng (MS) | 5 | 5 | - | 30,0 ± 14,1 ^a | 0,0 ± 0,0 ^a |
| MS + zeatin 1 mg/l | 1 | 2 | - | 93,4 ± 6,6 ^b | 0,0 ± 0,0 ^a |
| MS + NAA 0,1 mg/l + zeatin 1 mg/l | 1 | 5 | 3 | 10,6 ± 6,8 ^a | 63,5 ± 16,5 ^b |

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức 95%.

Sự phối hợp giữa NAA 0,1 mg/l và zeatin 1 mg/l giúp trụ hạ diệp dễ hình thành rễ nhưng thời gian tạo chồi chậm hơn (ở tuần 5) với tỷ lệ thấp hơn môi trường MS bổ sung zeatin 1 mg/l sau 5 tuần nuôi cấy (bảng 2, ảnh 2).

3.2. Các thay đổi hình thái trong sự phát sinh chồi trực tiếp từ trụ hạ diệp trên môi trường MS có bổ sung Zeatin 1 mg/l

Dưới tác động của Zeatin, các tế bào nhu mô dưới biểu bì bắt đầu phân chia ở tuần thứ nhất và hình thành các trung tâm phân chia ở tuần thứ 2 (ảnh 3). Các trung tâm phân chia tiếp tục phát triển ở vùng ngoại vi (ảnh 4) để hình thành chồi. Sự phân chia cũng xảy ra trên khắp vùng nhu mô vỏ để sau đó phân hóa thành hệ thống mạch dẫn (ảnh 5). Cuối cùng các chồi

ở ngoại vi có sự nổi mạch với trụ trung tâm thông qua sự lắp ráp các đoạn mạch dẫn đã được tạo ra trước đó (ảnh 6).

3.3. Sự thay đổi cường độ hô hấp trong sự phát sinh chồi từ trụ hạ diệp

Bảng 3. Cường độ hô hấp của trụ hạ diệp sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung Zeatin 1 mg/l.

| Thời gian (tuần) | Cường độ hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g TLT}/\text{giờ}$) |
|------------------|---|
| 0 | $5,90 \pm 0,90^a$ |
| 1 | $8,43 \pm 0,33^b$ |
| 2 | $10,41 \pm 1,07^c$ |
| 4 | $8,97 \pm 1,02^a$ |

Các số trung bình trong hàng với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức 95%.

Trên môi trường MS có bổ sung Zeatin 1 mg/l, cường độ hô hấp ở trụ hạ diệp bắt đầu tăng mạnh ở tuần thứ 1, cao nhất ở tuần thứ 2, và giảm ở tuần 4 (bảng 3)

3.4. Sự thay đổi hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong sự phát sinh chồi từ trụ hạ diệp

Hoạt tính zeatin và acid abscisic tăng mạnh trong 2 tuần đầu, và giảm xuống ở tuần 4. Hoạt tính auxin giảm ở tuần 1 và duy trì không đổi qua các tuần. Tỷ lệ cytokinin/auxin gia tăng trong 2 tuần đầu. Hoạt tính gibberelin giảm mạnh ngay tuần đầu tiên (bảng 4).

Bảng 4. Hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong trụ hạ diệp sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung Zeatin 1 mg/l.

| Thời gian (tuần) | Hoạt tính (mg/l) | | | | Tỷ lệ cytokinin /auxin |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------------|
| | IAA | Zeatin | ABA | GA ₃ | |
| 0 | $3,03 \pm 0,37^b$ | $0,46 \pm 0,02^a$ | $1,77 \pm 0,00^a$ | $17,33 \pm 0,44^b$ | 0,15 |
| 1 | $2,08 \pm 0,26^a$ | $0,61 \pm 0,07^b$ | $6,19 \pm 0,93^b$ | $4,47 \pm 0,44^a$ | 0,29 |
| 2 | $2,19 \pm 0,47^a$ | $0,80 \pm 0,11^c$ | $6,60 \pm 0,06^b$ | $4,73 \pm 0,12^a$ | 0,37 |
| 4 | $2,01 \pm 0,44^a$ | $0,49 \pm 0,05^a$ | $1,36 \pm 0,01^a$ | $5,67 \pm 0,41^a$ | 0,24 |

Các số trung bình trong hàng với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức 95%.

4. THẢO LUẬN

Ở cây Nhàu, trụ hạ diệp dễ dàng hình thành chồi khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung các loại cytokinin. Cho nên trên cùng vật liệu là trụ hạ diệp cây Nhàu, zeatin và BA có tác động kích thích ra chồi khác nhau. Zeatin ở nồng độ 1 mg/l có thể làm mẫu cấy đạt tỷ lệ tạo chồi gần 100% trong khi BA chỉ có thể đạt tỷ lệ tạo chồi cao nhất khoảng 80% ở nồng độ 2 mg/l. Điều đó có thể do zeatin là chất điều hòa tăng trưởng thực vật có nguồn gốc nội sinh nên dễ dàng được mô cấy hấp thu và kích thích sự tạo chồi. Cytokinin kích thích sự phân chia tế bào, nhất là khi phối hợp với auxin. Dù hỗ trợ auxin trong sự tăng trưởng nhưng cũng có sự đối kháng giữa cytokinin (giúp sự tạo chồi)

auxin (giúp sự tạo rễ) (Bùi Trang Việt, 2000). Vì vậy, khi phối hợp NAA 0,1 mg/l và zeatin 1 mg/l giúp trụ hạ diệp tạo rễ nhưng kìm hãm sự hình thành chồi.

Để có hoạt tính, chất điều hòa tăng trưởng thực vật phải được cố định trên thể nhận chuyên biệt của tế bào đích, các thể nhận này có thể khác nhau tùy thuộc vào mô đích (Bùi Trang Việt, 2000). Ở trụ hạ diệp, các tế bào ở vùng vỏ là các tế bào đích nhận sự tác động của zeatin và hình thành chồi lần lượt qua 3 giai đoạn. Giai đoạn 1 bắt đầu bằng sự phân chia của các tế bào nhu mô vỏ ngay dưới biểu bì để hình thành các trung tâm phân chia. Ở giai đoạn 2, song song với sự phát triển của trung tâm phân chia để hình thành chồi ở ngoại vi vùng vỏ, các tế bào nhu mô vỏ bên trong phân chia mạnh mẽ để tạo thành hệ thống mạch dẫn. Cuối cùng ở giai đoạn 3, chồi ở ngoại vi sẽ nổi

mạch với trụ trung tâm thông qua sự lấp ráp các đoạn mạch dẫn đã được tạo ra trước đó.

Trong sự tạo chồi ở trụ hạ diệp cây Nhàu, hoạt tính zeatin và acid abscisic tăng mạnh trong 2 tuần đầu, và giảm xuống ở tuần 4. Sự gia tăng hoạt tính zeatin trong 2 tuần đã kích thích mạnh sự phân bào tạo các trung tâm phân chia ở vùng nhu mô vỏ. Sự phân chia tế bào diễn ra mạnh mẽ cần những sản phẩm hữu cơ được tạo ra từ quá trình biến dưỡng và năng lượng ATP được sinh ra trong quá trình hô hấp (Taiz và Zeiger, 2002). Đây cũng là lý do cường độ hô hấp cũng tăng cao ở tuần thứ 2 ứng với sự gia tăng của hoạt tính zeatin. Sự hạ thấp hoạt tính auxin ở tuần 1 và duy trì không đổi dẫn đến gia tăng tỷ lệ cytokinin/auxin trong 2 tuần đầu. Tỷ lệ này sẽ quyết định chiều hướng phát sinh hình thái, do đó mô cây nghiêng về sự phát sinh chồi. Mặt khác, trong sự phát sinh chồi, gibberelin ức chế sự hình thành sơ khởi chồi ở một số cây thân gỗ. Vì thế

sự hạ thấp hoạt tính gibberelin trong trụ hạ diệp là cần thiết để thúc đẩy quá trình hình thành chồi.

5. KẾT LUẬN

– Sự phát sinh chồi ở trụ hạ diệp cây Nhàu trải qua 3 giai đoạn: Sự hình thành trung tâm phân chia ở ngoại vi vùng vỏ, nhu mô vỏ bên trong phân chia mạnh mẽ tạo hệ thống mạch dẫn và sự nối mạch giữa chồi mới hình thành với trụ trung tâm thông qua các đoạn mạch dẫn.

– Trụ hạ diệp có khả năng phát sinh chồi tốt nhất khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung zeatin 1mg/l.

– Xử lý phối hợp giữa NAA 0,1 mg/l và zeatin 1 mg/l giúp trụ hạ diệp dễ hình thành rễ nhưng thời gian tạo chồi chậm hơn.

STUDY ON SHOOT MORPHOGENESIS *IN-VITRO* OF *MORINDA CITRIFOLIA* L.

Nguyen Thi Ngoc Huong, Vo Thi Bach Mai
University of Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: *Morinda citrifolia* L. is a valuable medicinal plant, used to treat many diseases, such as sleeplessness, backache, high blood pressure... To study the shoot morphogenesis in *Morinda citrifolia* L. for propagation in the future, we examined the effects of BA, Zeatin and NAA on adventitious shoot formation of hypocotyl. The results showed that the regeneration of adventitious shoot comprised three steps of morphogenesis. In this process, Zeatin 1mg/l stimulated the formation of shoot primordia in dark (after a week), earlier than BA at the same concentration. Shoot generation was slow (after five weeks) on MS medium supplemented with 0,1mg/l and Zeatin 1mg/l. Roles of respiration rate and endogenous hormones were discussed to understand the physiological changes in the adventitious root formation.

Keywords: endogenous hormones, *Morinda citrifolia* L., shoot morphogenesis.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Võ Thị Bạch Mai, *Sự phát triển chồi và rễ*, NXB Đại học Quốc gia TP. HCM, (2004).
- [2]. Bùi Trang Việt, *Sinh Lý Thực Vật Đại Cương, Phần II: Phát triển*, NXB Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, (2000).
- [3]. Edwin F. G., *Plant propagation by tissue culture, Part 2: In practice*, Exegetics Limited, 613 – 936 (1996)
- [4]. Hiramatsu T., Imoto M., Koyano T., Umezawa K., Induction of normal phenotypes in ras-trans formed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. *Cancer Lett*, 73: 161-180 (1993)
- [5]. Umezawa K., Isolation of 1-methoxy-2-foremyl-3-hydroxyanthraquinone from

- Morinda citrifolia* and neoplasm inhibitors containing the same. *Japan Kokai Tokyo Koho*, 736:94-87 (1992).
- [6]. Meidner, *Class Experiments in Plant Physiology*. George Allen and Unwin (London), 169 pages, (1984).
- [7]. Nelson S. C., *Morinda citrifolia* L.: Rubiaceae (Rubiaceae) Coffee family. *Permanet Agriculture Resources (PAR)* (2003).
- [8]. Taiz L. and Zeiger E., *Plant physiology*, 3th edition, Sinauer Associates, (2002).
- [9]. Yokota T., Murofushi N., Takahashi N., *Extraction, purification, and identification. Hormonal regulation of development I Molecular aspects of plant hormones*, Edited by J.MacMillan – Encyclopedia of plant physiology, New series, Sringer New York. 9: 113-201 (1980).