

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU SỰ TẠO DỊCH TREO TẾ BÀO CÂY ĐÌNH LĂNG *POLYSCIAS FRUTICOSA* L. HARMS

Phạm Thị Tố Liên, Võ Thị Bạch Mai
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG – HCM

1. MỞ ĐẦU

Đình lăng có hai hợp chất chính quan trọng là polyacetylen và saponin, các hợp chất này có nhiều ở rễ và lá (Vo DH, Yamamura S, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K, Nguyen TN, Hoang MC, 1998). Saponin triterpen có tác dụng tích cực chống oxy hóa, chống stress (Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Ánh Như, 2002).

Tuy nhiên lượng saponin triterpen tự nhiên trong cây Đình lăng khá hạn chế, không đủ đáp ứng nhu cầu về dược liệu. Để thu nhận một lượng lớn các hợp chất tự nhiên mà không phụ thuộc vào nguồn thực vật trồng trong tự nhiên, người ta tiến hành nuôi cây mô để thu sinh khối, đặc biệt là nuôi cấy tế bào (Ahn, C. H., W. M. Yoon và csv, 1996; Mathur, A., Y. N. Shuklav và csv, 1994).

Chúng tôi trình bày các kết quả bước đầu nghiên cứu sự tạo dịch treo tế bào và thu nhận rễ từ dịch treo tế bào cây Đình lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms nhằm tạo một lượng lớn các dòng tế bào ổn định và rễ tạo thành từ dịch treo dùng làm vật liệu để li trích và thu nhận saponin.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mô sẹo 14 tuần tuổi có nguồn gốc từ lá non của cây Đình lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms *in vitro* được nuôi trên môi trường MS có bổ sung 2,4 – D 2mg/l và 20% nước dừa (Lê Thiên Thư, Võ Thị Bạch Mai, 2005).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tạo mô sẹo từ lá của chồi trong *in vitro*

Sử dụng lá non của cây *in vitro*, tạo vết thương thẳng góc với lá và đặt các lá này trên môi trường MS có bổ sung 2, 4 – D 2mg/l và 20% nước dừa. Theo dõi biểu hiện của mẫu cấy và sự gia tăng trọng lượng tươi sau 14 tuần nuôi cấy.

2.2.2. Tạo dịch treo tế bào

Chuyển 2gam mô sẹo (phần mềm, dễ tách rời) 14 tuần tuổi từ môi trường MS có bổ sung 2, 4 – D 2mg/l và 20% nước dừa sang 50ml có chứa 10ml môi trường lỏng với các nồng độ auxin thay đổi như sau:

- MS1: MS có bổ sung 2, 4 – D 1mg/l và 20% nước dừa
- MS2: MS có bổ sung 2, 4 – D 1,5mg/l và 20% nước dừa
- MS3: MS có bổ sung 2, 4 – D 2mg/l và 20% nước dừa
- MS4: MS có bổ sung IAA 1mg/l và 20% nước dừa
- MS5: MS có bổ sung IAA 1,5mg/l và 20% nước dừa
- MS6: MS có bổ sung IAA 2mg/l và 20% nước dừa

Các erlen được đặt trên máy lắc với vận tốc 80 vòng/phút, nhiệt độ $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ánh sáng 1000 ± 200 lux. Các mẫu được cấy chuyển 11 lần/tuần. Quan sát sự tăng trưởng của dịch treo tế bào bằng kính hiển vi qua 3 giai đoạn: phân chia, tách rời, tạo nhóm.

2.2.3. Khả năng tạo rễ từ dịch treo tế bào

Chuyển 2ml tế bào lắng của dịch treo tế bào từ môi trường MS với 2, 4 – D 1mg/l (môi trường tạo dòng tế bào ổn định) sang các erlen 50ml có chứa 8ml môi trường có bổ sung auxin 1mg/l và nồng độ cytokinin thay đổi như sau:

- MSR1: MS có bổ sung 2, 4 – D 1mg/l, BA 0,5 mg/l và 20% nước dừa
- MSR2: MS có bổ sung 2, 4 – D 1mg/l, BA 1 mg/l và 20% nước dừa
- MSR3: MS có bổ sung 2, 4 – D 1mg/l, BA 2 mg/l và 20% nước dừa.

Theo dõi thay đổi về mặt tế bào trong dịch treo dẫn đến sự tạo rễ.

2.2.4. Quan sát hình thái giải phẫu: Quan sát sự biến đổi mô sẹo đến khi tạo dịch treo tế bào ở các giai đoạn và sự tạo rễ từ dịch treo tế bào.

3. KẾT QUẢ

3.1. Tạo mô sẹo từ lá của chồi trong *in vitro*

Sau một tuần các vết cắt thẳng góc với lá có khả năng tạo thành mô sẹo. Mô sẹo được tạo trên môi trường có bổ sung 2, 4 – D 2mg/l. Tế bào mô sẹo xuất hiện xung quanh vị trí vết thương của lá và tiếp tục gia tăng kích thước theo thời gian. Sau 8 tuần nuôi cấy mô sẹo có trọng lượng tươi tăng trưởng ổn định.

3.2. Tạo dịch treo tế bào

Mô sẹo được tạo thành và ổn định sau 14 tuần tuổi được chuyển sang môi trường lỏng có nồng độ auxin giảm một nửa (MS có bổ sung 2, 4 – D 1mg/l và 20% nước dừa), đây là môi trường có khả năng phóng thích các tế bào riêng lẻ và các dòng tế bào ổn định có đặc tính gần giống nhau.

Sự phóng thích các nhóm tế bào và các tế bào đơn từ mô sẹo khoảng sau 3 tuần nuôi cấy. Dịch treo tế bào ổn định sau 4 -5 lần cấy chuyển. Dịch treo tế bào có màu vàng nhạt, kích thước của các cụm tế bào không đều nhau. Quan sát dưới kính hiển vi các tế bào hình tròn, nguyên sinh chất đậm đặc.

Bảng 1. Sự tạo dịch treo tế bào cây Đinh lăng trong các môi trường có nồng độ auxin thay đổi theo thời gian

Môi trường	Nhận xét về tình trạng của dịch treo tế bào		
	Sau 3 tuần	Sau 5 tuần	Sau 8 tuần
MS1	Các tế bào bắt đầu được phóng thích	Có sự phân chia tế bào (hình 3)	Tạo được tế bào có khả năng sinh phôi (hình 1, 4)
MS2	-nt-	-nt-	Một số ít tế bào có khả năng sinh phôi
MS3	-nt-	Sự phân chia tế bào rất ít	Không tạo được tế bào có khả năng sinh phôi
MS4	-nt-	-nt-	-nt-
MS5	-nt-	-nt-	-nt-
MS6	-nt-	-nt-	-nt-

3.3. Khả năng tạo rễ từ dịch treo tế bào

Sau 8 tuần được nuôi trên môi trường MS lỏng có bổ sung 2,4 – D 1mg/l và 20% nước dừa thì các tế bào ổn định có vách mỏng, đẳng kính, tế bào chất đậm đặc. Những tế bào này được chuyển sang các môi trường tạo rễ khác nhau. Môi trường có khả năng tạo được rễ là môi trường MS có bổ sung 2, 4 – D 1mg/l, BA 2 mg/l và 20% nước dừa.

Các tế bào nuôi trong môi trường có khả năng tạo rễ được theo dõi đến khi rễ tăng trưởng (hình 2).

Bảng 2: Sự tạo rễ từ dịch treo tế bào trong các môi trường có nồng độ auxin và cytokinin khác nhau theo thời gian.

Môi trường	Nhận xét về sự tạo rễ trong các môi trường của dịch treo tế bào	
	Sau 2 tuần	Sau 4 tuần
MSR1	Không có sự tạo thành phôi hình cầu	Dịch treo tế bào bắt đầu chết và hóa nâu trong môi trường nuôi cấy.
MSR2	Phôi hình cầu được tạo thành nhưng rất ít.	Các phôi hình cầu phát triển thành phôi hình tim
MSR3	Phôi hình cầu được tạo thành nhiều hơn so với môi trường MSR2 (hình 5)	Các phôi hình cầu phát triển thành phôi hình tim, và rễ bắt đầu xuất hiện (hình 2)

3.4. Quan sát hình thái giải phẫu

Quan sát quá trình tạo mô sẹo từ lá và thấy có sự biến đổi về mặt hình thái sau 2 tuần nhận thấy có sự phân phân hóa của tế bào nhu mô. Quan sát các dòng tế bào có khả năng sinh phôi thấy các tế bào này có quá trình phát triển giống như quá trình phát triển của phôi hợp tử. Gồm các giai đoạn phát triển phôi hình cầu, phôi hình tim, và phát sinh cơ quan. Các cơ quan này được giải phẫu nhuộm hai màu và quan sát dưới kính hiển vi cho thấy chúng có cấu trúc của rễ.

4. THẢO LUẬN

Trong thí nghiệm chúng tôi sử dụng lá non của cây Đinh lăng *in vitro* để tạo vết thương và trên môi trường có sự hiện diện của auxin mạnh là 2, 4 – D 2mg/l có bổ sung 20% nước dừa để tạo mô sẹo. Mô sẹo là đám tế bào không phân hóa, có đặc tính phân chia mạnh, mô sẹo được tạo ra do những xáo trộn trong quá trình tạo cơ quan, nhất là sự tạo rễ, thân non hay những mảnh thân non của cây trưởng thành để cho mô sẹo trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, dưới tác dụng của một auxin mạnh.

Mô sẹo được tạo thành phụ thuộc vào việc sử dụng auxin riêng lẻ hay kết hợp với cytokinin, bản chất và nồng độ của auxin (Bùi Trang Việt, 2000). Mặc khác auxin, đặc biệt là 2, 4 – D được sử dụng thường xuyên trong sự cảm ứng tạo mô sẹo ở nhiều loài thực vật. Ngoài ra auxin cần thiết để tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi ở nhiều loài thực vật (Amirato, 1983; Kysely và Jacobsen, 1990; Lazzer và csv, 1987).

Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào tùy thuộc chủ yếu vào các quá trình: sự phân chia tế bào, sự tạo nhóm tế bào, sự tách rời tế bào quá trình này tùy thuộc chủ yếu vào sự hiện diện của auxin ở nồng độ thích hợp trong nuôi cấy, vào nguồn gốc của mô sẹo, quá trình nuôi cấy mô sẹo và các thành phần khác trong môi trường. Hàm lượng auxin cao thường làm tăng sự tách rời của tế bào, nhất là khi có sự kết hợp cytokinin hay nước dừa (Torres, 1989; Bùi Trang Việt, 2000).

Phôi thể hệ là phôi được thu nhận từ tế bào thể hệ (tế bào 2n), theo con đường sinh phôi thể hệ, các tế bào thể hệ đóng vai trò sinh phôi hợp tử và sự phát triển cũng như phôi hợp tử. Hai giai đoạn của sự thu nhận phôi thể hệ là: (Edwin, 1996; Bùi Trang Việt, 2000)

- Tạo các tế bào có khả năng sinh phôi với sự hiện diện của auxin riêng lẻ hay kết hợp với cytokinin.

- Tiến hóa phôi thể hệ, giảm hay loại bỏ auxin trong môi trường nuôi cấy, có thể thu được sự phát sinh cơ quan ở giai đoạn này.

Trong giai đoạn đầu của thí nghiệm chúng tôi sử dụng 2, 4 – D 2mg/l để cảm ứng tạo mô sẹo, nhưng trong quá trình tiến hóa phôi thể hệ thì hàm lượng 2, 4 – D được giảm đi một nửa. Vì vậy trong môi trường này thu được những dòng tế bào có khả năng sinh phôi (hình 4), từ những tế bào này sẽ tạo được rễ trên môi trường MS có bổ sung 2, 4 – D 1mg/l, BA 2 mg/l và 20% nước dừa.

5.KẾT LUẬN

Mô sẹo 14 tuần tuổi của cây Đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms nuôi trên môi trường MS có bổ sung 2, 4 –D 2mg/l và 20% nước dừa là vật liệu tốt nhất để sử dụng làm vật liệu tạo dịch treo tế bào. Môi trường lỏng MS có bổ sung 2, 4 – D 1mg/l và 20% nước dừa là môi trường thu nhận các dòng tế bào cây Đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms có khả năng sinh phôi. Đó là các tế bào vách mỏng, đẳng kính, nhân to, tế bào chất đậm đặc.

Môi trường lỏng MS có bổ sung 2, 4 – D 1mg/l, BA 2 mg/l và 20% nước dừa là môi trường mà các dòng tế bào có khả năng sinh phôi của cây Đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms tạo được rễ. Từ số lượng lớn rễ này có thể thu nhận saponin bằng các phương pháp li trích.

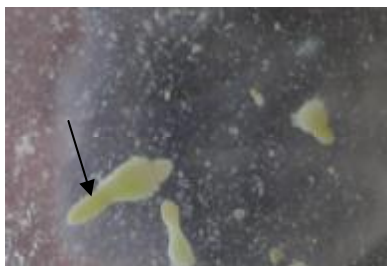
TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Ahn, C. H., W. M. Yoon, et al. *Effects of auxin and sucrose on cell growth and production of phenolic compounds in cell suspension culture of Panax ginseng C.A. Meyer*. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 37 (2): 340 – 344.(a) Dep. Hortic., Paichai Univ., Taejeon 302 – 735, South Korea, (1996).
- [2]. Dicosmo F., Masawa M. *Plant Cell Culture Secondary Metabolism*. CRC Press, (1996).
- [3]. Lê Thiên Thư, Võ thị Bạch Mai. *Nghiên cứu về sự phát sinh hình thái trong nuôi cấy in-vitro cây Đinh lăng (Polyscias Fruticosa)*. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh. Tập 8 Số 11, trang 47-51, (2005).
- [4]. Mathur, A., Y. N. Shukla, et al. *Saponin production in callus and cell suspension culture of Panax quinquefolium*. Phytochemistry Oxford 35 (5): 1221 – 1225. (a) Plant Tissue culture Div., Cent. Inst. Med. and Aromatic Plants, P. O CIMAP, Lucknow 226015 India, (1994).

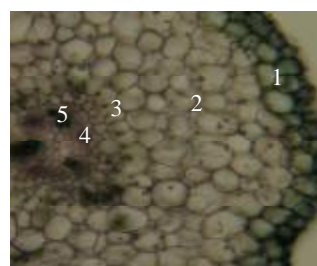
PHỤ LỤC



Hình 1. Dịch treo tế bào trên MS có 2,4-D 1mg/l



Hình 2. Dịch treo tế bào trên MS có 2, 4 – D 1mg/l và BA 2mg/l



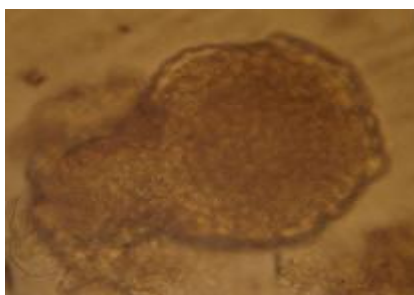
Hình 7. Lát cắt ngang của rễ từ dịch treo 1, biểu bì; 2, nhu mô; 3, nội bì; 4, libe; 5, mộc



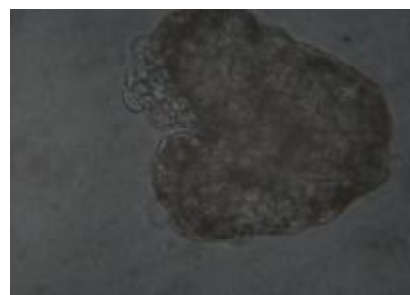
Hình 3. Tế bào đang phân chia



Hình 4. Tế bào có thể sinh phôi



Hình 5. Phôi hình cầu



Hình 6. Phôi hình tim