

TẠO MÔ SỢ VÀ TÁI SINH CHỒI TỪ MÔ LÁ NON CÂY BÍ KỲ NAM (*HYDNOPHYTUM FORMICARUM* JACK.)

Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn¹

ABSTRACT

Hydnophytum formicarum Jack. is a medicinal plant of Rubiaceae family. Young leaf explants of this plant induced calli at 75% on MS medium supplemented with either 0.5 mg/l NAA alone or in combination with 2 mg/l BA or medium supplemented with 2 mg/l NAA and 2 mg/l BA after 40 days cultured. Calli were soft, friable and green yellow color with roots. Calli were discriminated two types calli with and without roots. Both of them were cultured on MS medium with and without activated charcoal at 1g/l. Results showed that shoot organogenesis in leaf calli was not observed on MS medium with and without activated charcoal at 1 g/l. However, roots cultured with leaf calli formed small compact calli on the surface at rate of 40% after 60 days cultured. Shoot regeneration obtained 54.17% after 90 days from these calli on MS medium complemented with 1 g/l activated charcoal.

Keywords: *Hydnophytum formicarum* Jack., callus induction, root, shoot regeneration

Title: Callus induction and shoot regeneration from young leaf explant of ant plant (*Hydnophytum formicarum* Jack.)

TÓM TẮT

Bí Kỳ Nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.) là một loài thảo dược thuộc họ Rubiaceae. Mô lá non của cây Bí Kỳ Nam tạo mô sẹo 75% sau 40 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l NAA đơn hay kết hợp với 2 mg/l BA hay môi trường bổ sung 2 mg/l NAA kết hợp 2 mg/l BA. Mô sẹo có dạng mềm, rời, màu vàng xanh và có rễ. Mô sẹo được phân biệt thành 2 dạng là mô sẹo và mô sẹo có rễ. Cả hai dạng mô sẹo được tái sinh trên môi trường MS không có hoặc có bổ sung 1 g/l than hoạt tính. Kết quả cho thấy mô sẹo không phát sinh chồi trên cả môi trường không có và có bổ sung 1g/l than hoạt tính. Tuy nhiên, rễ nuôi cấy cùng với mô sẹo tạo mô sẹo nhỏ, chắc và có màu xanh trên bề mặt rễ ở môi trường MS bổ sung 1 g/l than hoạt tính với tỷ lệ khoảng 40% ở 60 ngày sau khi cấy và mô sẹo này hình thành chồi với tỷ lệ 54,17% sau 90 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: *Hydnophytum formicarum* Jack., tạo mô sẹo, rễ, tái sinh chồi

1 GIỚI THIỆU

Cây Bí Kỳ Nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.) thuộc họ Rubiaceae, có nhiều đặc tính thảo dược quý như tác dụng tốt đối với hệ tim mạch, kháng viêm, giúp giảm sự phát ban ở da (Prommee, 1988), chữa bệnh viêm gan, thấp khớp và bệnh tiêu chảy (Đỗ Huy Bích *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2002), chống oxy hóa (Prachayasittikul *et al.*, 2008) và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư (Ueda *et al.*, 2002). Ngoài ra, do trên cây Bí Kỳ Nam có nhiều kiến sinh sống, nên đôi khi cây này được gọi là cây Tổ Kiến. Cây có hình thù đặc biệt do phần thân phù to ra, cho nên nhiều người chơi cây cảnh rất thích thú với các hình thù đặc biệt này. Chính vì những lý do cây có nhiều dược tính quý để làm thuốc và

¹ Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

có hình thù đặc biệt, cho nên nhu cầu về cây này rất lớn và đang bị khai thác quá mức, khiến cây đang lâm vào tình trạng có nguy cơ tuyệt chủng cao và được liệt kê vào sách Đỏ Việt Nam (Đỗ Huy Bích *et al.*, 2004). Trong tự nhiên, nhân giống cây Bí Kỳ Nam thường bằng hạt. Cách nhân giống này tùy thuộc vào mùa vụ. Vì cây rất ít khi ra hoa và có hạt rất nhỏ, nên tỷ lệ nảy mầm của hạt trong tự nhiên rất thấp. Việc nghiên cứu nhân nhanh giống cây Bí Kỳ Nam là cần thiết. Trong các phương pháp nhân giống thì vi nhân giống dễ đạt được hệ số nhân giống cao, có thể đáp ứng được nhu cầu của người sử dụng và giảm được vấn đề khai thác tự nhiên. Trong các kỹ thuật vi nhân giống thì mô lá non thường được sử dụng và thông qua giai đoạn biến đổi thành mô sẹo (callus) và tái sinh thành cây. Nghiên cứu “Tạo mô sẹo và tái sinh chồi từ mô lá non cây Bí Kỳ Nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.) nhằm mục tiêu xác định môi trường có chất điều hòa sinh trưởng trên sự biến đổi cấu trúc mô cây.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Cây Bí Kỳ Nam thu ở đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang được trồng trong Trại Nghiên cứu và Thực nghiệm Nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp

Khử trùng mẫu cây

Mẫu lá non cây Bí Kỳ Nam được rửa nhẹ dưới vòi nước máy, sau đó ngâm trong dung dịch bột giặt trong 10 phút và rửa lại dưới vòi nước. Tiếp theo, mẫu lá được khử trùng bằng dung dịch sodium hypochloride 10% trong điều kiện vô trùng, lắc nhẹ (10 phút), rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó ngâm tiếp trong dung dịch HgCl₂ 0,5‰, lắc nhẹ (30 phút) và rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường đa vi lượng theo Murashige và Skoog (1962), ký hiệu là MS, tùy theo các thí nghiệm có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA và BA, than hoạt tính. Môi trường được khử trùng bằng nồi hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong 20 phút.

2.2.1 Thí nghiệm 1: Hiệu quả của NAA và BA lên sự tạo mô sẹo từ mô lá non

Mẫu lá non sau khi khử trùng được cắt thành mảnh nhỏ có kích thước 0,5 cm² cấy vào môi trường MS bổ sung NAA và BA với các nồng độ khác nhau.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên thừa số hai nhân tố, gồm 8 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức lặp lại 6 lần, mỗi lần lặp lại là một keo chứa 2 mẫu.

Bảng 1: Các nồng độ NAA và BA trong từng nghiệm thức (NT)

Nồng độ NAA (mg/l)	Nồng độ BA (mg/l)	
	0	2
0	NT 1	NT 5
0,5	NT 2	NT 6
1	NT 3	NT 7
2	NT 4	NT 8

Chỉ tiêu theo dõi:

- Tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo.
- Đặc điểm của mô sẹo: hình dạng, màu sắc...

2.2.2 Thí nghiệm 2: Tái sinh chồi trên môi trường MS bổ sung than hoạt tính

Mô sẹo từ thí nghiệm 1 được tách riêng thành 2 dạng để nuôi cấy là mô sẹo và mô sẹo có rễ (mô sẹo được nuôi cấy cùng với rễ), có kích thước khoảng 0,4 x 0,4 cm. Môi trường nuôi cấy là MS không có hoặc có bổ sung 1 g/l than hoạt tính, không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố, gồm 4 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại là một keo chứa 4 mẫu.

Bảng 2: Các nghiệm thức về dạng mô sẹo và môi trường nuôi cấy

Dạng mẫu cấy	Than hoạt tính (mg/l)	
	0	1
Mô sẹo	NT 1	NT 2
Mô sẹo có rễ	NT 3	NT 4

Chỉ tiêu theo dõi:

- Đặc điểm của mô sẹo: hình dạng, màu sắc...
- Tỷ lệ (%) mô sẹo biến đổi cấu trúc.
- Tỷ lệ (%) rễ tạo mô sẹo.
- Tỷ lệ (%) mô sẹo hình thành từ rễ tạo chồi.

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel và phần mềm thống kê MSTATC, kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5%.

Các số liệu là tỷ lệ phần trăm biến động từ 0-100% được chuyển đổi sang dạng $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ (Gomez và Gomez, 1984).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hiệu quả của NAA và BA lên sự tạo mô sẹo từ mô lá non

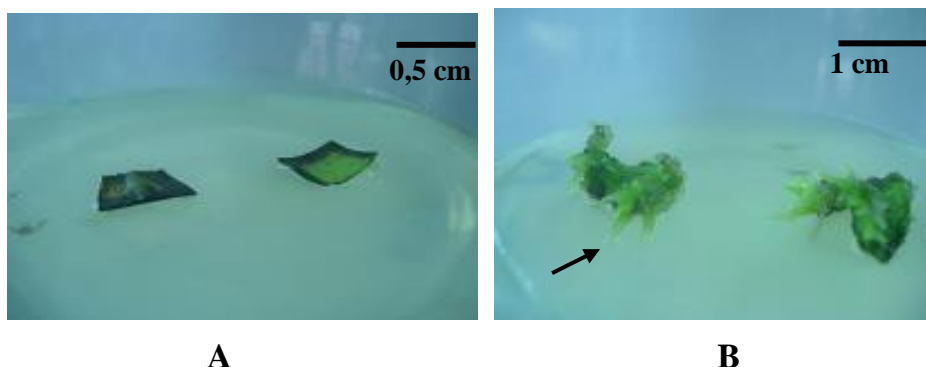
Kết quả bảng 3 cho thấy, ở 20 ngày sau khi cấy (NSKC), mẫu lá non bắt đầu phát triển tạo cấu trúc mô sẹo có dạng mềm, rời, màu vàng xanh và có rễ ở các nghiệm thức có bổ sung 0,5 mg/l và 1 mg/l NAA đơn hay 0,5-2 mg/l NAA kết hợp với 2 mg/l BA đạt tỷ lệ khoảng 25%. Đầu tiên mô sẹo có rễ phát sinh ở vị trí mép cắt của

lá và lan dần vào phía trong của mô lá. Mô lá non trên môi trường MS không có NAA và BA và môi trường bổ sung BA 2 mg/l không có sự tạo mô sẹo (Hình 1).

Bảng 3: Hiệu quả của NAA và BA lên tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo ở 20, 30 và 40 ngày sau khi cấy (NSKC)

Nồng độ (mg/l)	Ngày sau khi cấy (NSKC)			
	20	30	40	
NAA	0	0,00	0,00	0,00 b
	0,5	25,00	50,00	75,00 a
	1	18,75	37,50	43,75 a
	2	6,25	37,50	56,25 a
BA	0	12,50	25,00	37,50
	2	12,50	37,50	50,00
NAA + BA	0 + 0	0,00	0,00	0,00
	0,5 + 0	25,00	50,00	75,00
	1 + 0	25,00	37,50	37,50
	2 + 0	0,00	12,50	37,50
	0 + 2	0,00	0,00	0,00
	0,5 + 2	25,00	50,00	75,00
	1 + 2	12,50	37,50	50,00
	2 + 2	12,50	62,50	75,00
F_{NAA}	ns	ns	**	
F_{BA}	ns	ns	ns	
F_{NAA x F_{BA}}	ns	ns	ns	
CV (%)	264,94	136,17	90,94	

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5%. (ns): Khác biệt không có ý nghĩa thống kê. (**): Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%



Hình 1: Mô lá non không tạo mô sẹo và chết trên môi trường không có NAA và BA (A); Mô lá non tạo mô sẹo có rễ (mũi tên) trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l NAA ở 40 ngày sau khi cấy (B)

Ở thời điểm 20 đến 30 NSKC, tỷ lệ tạo mô sẹo có rễ gia tăng ở các nghiệm thức. Tuy nhiên, không khác biệt ý nghĩa thống kê.

Đến 40 NSKC, tỷ lệ này có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 1% ở môi trường có bổ sung NAA với các nồng độ khác nhau từ 0,5-2 mg/l so với nghiệm thức đối chứng không có bổ sung NAA và BA. Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA đơn hay kết hợp với 2 mg/l BA hay môi trường bổ sung 2 mg/l NAA kết hợp 2 mg/l BA cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao, đạt 75%. Tuy nhiên, giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Theo Hunault (1979, trích từ Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên, 2002), các tế bào thuộc các mô hoặc các cơ quan đã phân hóa

của các cây song tử diệp thường phản phân hóa dưới tác động của auxin (riêng rẽ hay kết hợp với một cytokinin) để cho ra mô sẹo. Mô sẹo được tạo ra ngoài nguyên nhân do các tế bào nhu mô chịu sự phản phân hóa còn do sự phân chia của các tế bào tầng, sự xáo trộn trong các mô phân sinh sơ khởi hay sự xáo trộn trong quá trình tạo cơ quan. Kết quả của thí nghiệm này cho thấy NAA có hiệu quả trong sự phản phân hóa mô để tạo ra mô sẹo từ mô lá non cây Bí Kỳ Nam. Sử dụng môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l NAA đơn hay kết hợp 2 mg/l BA hay bổ sung 2 mg/l NAA kết hợp 2 mg/l BA có hiệu quả cao trong sự tạo mô sẹo, đạt tỷ lệ 75% sau 40 ngày nuôi cấy.

3.2 Tái sinh chồi trên môi trường MS bổ sung than hoạt tính

Kết quả ghi nhận được cả hai dạng mô sẹo trên môi trường MS không có và có bổ sung 1 g/l than hoạt tính, không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật đều sinh trưởng tốt giống như nhau, mô sẹo có sự gia tăng về kích thước. Mô sẹo cũng có dạng mềm và rời, có màu vàng xanh, không có sự biến đổi tạo cấu trúc mới. Đến sau 30 ngày nuôi cấy thì sự sinh trưởng của mô sẹo chậm lại và mô sẹo bắt đầu trở nên vàng. Mô sẹo không có sự hình thành cơ quan chồi trên môi trường này.

Kết quả bảng 4 ghi nhận ở 40 NSKC thì cả hai dạng mô sẹo đều chuyển dần từ màu xanh sang vàng và chết với tỷ lệ khoảng 80%, hầu như không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

Bảng 4: Tỷ lệ (%) mô sẹo vàng và chết trên môi trường MS không có và có bổ sung than hoạt tính ở 40 và 60 ngày sau khi cấy

Dạng mẫu cấy	Than hoạt tính (g/l)	Thời gian nuôi cấy (ngày)	
		40	60
Mô sẹo	0	80%	100%
Mô sẹo có rễ		80%	100%
Mô sẹo	1	60%	100%
Mô sẹo có rễ		80%	100%

Đến thời điểm 60 NSKC, mô sẹo nuôi cấy trên cả hai môi trường MS không có hay có bổ sung than hoạt tính đều chết 100% (Hình 2A). Dạng mô sẹo có rễ trên cả hai môi trường này cũng bị chết hoàn toàn ở vị trí mô sẹo (Bảng 4). Kết quả cho thấy mô sẹo từ mô lá non cây Bí Kỳ Nam sinh trưởng nhanh cả trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Quá trình trao đổi chất diễn ra nhanh, sự cạn kiệt nguồn dinh dưỡng cũng như sự tích lũy các chất do mô tiết ra môi trường làm hạn chế sự sinh trưởng của mẫu cấy và sẽ dẫn đến chết mẫu nếu duy trì quá lâu trên môi trường này đến 60 NSKC.

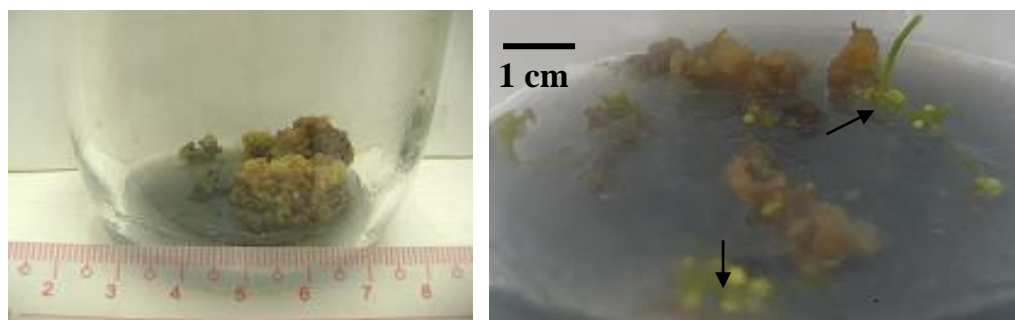
Tuy mô sẹo không tái sinh được chồi và chết khi duy trì quá lâu trên môi trường mà không được cấy chuyển nhưng cấu trúc rễ bất định nuôi cấy cùng với mô sẹo vẫn sống, có màu xanh và phát triển hình thành cấu trúc mới khi được duy trì lâu trên môi trường.

Kết quả trình bày ở bảng 5 cho thấy, ở 60 NSKC, rễ bất định nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1 g/l than hoạt tính có sự gia tăng kích thước, trên bề mặt rễ hình thành các cấu trúc mô sẹo nhỏ, chắc, có màu xanh với tỷ lệ khoảng 40% (Hình 2B). Rễ ở nghiệm thức không có bổ sung than hoạt tính không có sự phát triển tạo cấu trúc mới, rễ vẫn sống và xanh.

Bảng 5: Sự tạo cấu trúc từ rễ trên môi trường MS không có và có bổ sung than hoạt tính

Môi trường MS + Than hoạt tính (g/l)	Tỷ lệ % tạo mô sẹo ^(a)	Tỷ lệ % mô sẹo tạo chồi ^(b)
0	0%	0%
1	40%	54,17%

Ghi chú: Kết quả ghi nhận ở 60 ngày sau khi cấy (a), ghi nhận ở 90 ngày sau khi cấy (b)

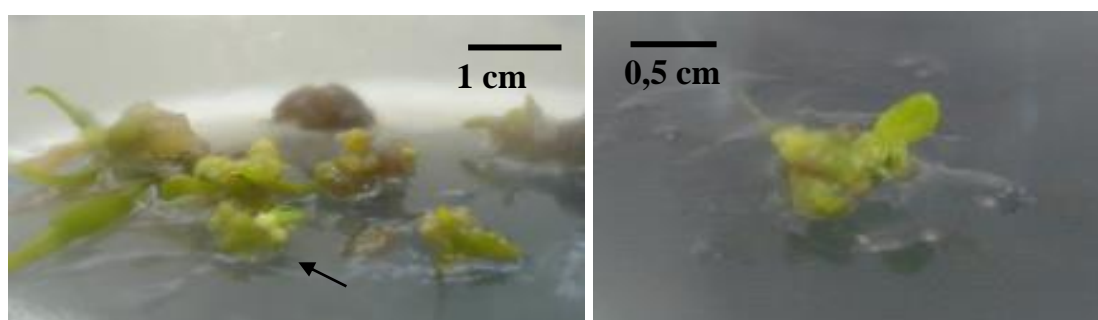


A

B

Hình 2: Mô sẹo bị chết (A) và mô sẹo có rễ với bề mặt rễ tạo mô sẹo (mũi tên) có khả năng phát triển chồi (B) ở 60 ngày sau khi cấy

Tiếp tục duy trì mô sẹo hình thành từ rễ trên môi trường MS bổ sung 1 g/l than hoạt tính đến khoảng 90 ngày sau khi cấy. Kết quả ghi nhận được mô sẹo này xuất hiện mầm chồi với tỷ lệ 54,17% (Bảng 5). Chồi lớn nhất trên môi trường này có một lá với chiều cao khoảng 0,7 cm (Hình 3).



Hình 3: Chồi hình thành từ mô sẹo trên bề mặt rễ ở 90 ngày sau khi cấy

Như vậy trên môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật, đồng thời có bổ sung than hoạt tính 1 g/l, rễ bất định hình thành từ mô lá non cây Bí kỳ nam đã có sự phân hóa tạo mô sẹo trên bề mặt và mô sẹo này có khả năng cảm ứng tạo chồi nếu tiếp tục được duy trì lâu trên môi trường này. Theo George (1996), than hoạt tính có hiệu quả cho sự phát triển của rễ khi rễ đã được hình thành, ngoài ra than hoạt tính còn có hiệu quả hấp thu chất cản và hấp thu các chất điều hòa sinh trưởng nên có thể đã giúp mẫu cây rễ bất định nuôi cấy trên môi trường này có sự điều chỉnh lại nồng độ auxin và cytokinin cảm ứng ban đầu thích hợp cho sự hình thành mô sẹo trên bề mặt rễ. Khi mô sẹo hình thành từ rễ tiếp tục được duy trì lâu trên môi trường có than hoạt tính, có thể sự cân đối về nồng độ auxin và cytokinin trong mẫu cây do tác dụng hấp thu của than hoạt tính thích hợp nên đã cảm ứng tế bào phân chia và phát sinh cơ quan chồi.

Kết quả thí nghiệm cho thấy mô sẹo được tạo ra từ mô lá non trên môi trường MS có bổ sung NAA và BA có dạng mềm, rời và có rễ, sinh trưởng nhanh cả trên môi

trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật, không có hoặc có bổ sung 1 g/l than hoạt tính. Tuy nhiên, mô sẹo trên môi trường này không tạo chồi, chỉ có mô sẹo nhỏ, có dạng chắc tạo ra trên bề mặt rễ ở 60 NSKC có khả năng tái sinh chồi trên môi trường MS bổ sung 1 g/l than hoạt tính với tỷ lệ 54,17% ở 90 NSKC.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

- Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l NAA đơn hay kết hợp với 2 mg/l BA hay môi trường bổ sung 2 mg/l NAA kết hợp 2 mg/l BA có hiệu quả cao trong sự tạo mô sẹo, đạt tỷ lệ 75% sau 40 ngày nuôi cấy. Mô sẹo có dạng mềm, rời, màu vàng xanh và có rễ.
- Mô sẹo không phát sinh chồi trên cả môi trường không có và có bổ sung 1g/l than hoạt tính. Rễ nuôi cấy cùng với mô sẹo tạo mô sẹo nhỏ, chắc và có màu xanh trên bề mặt rễ ở môi trường MS bổ sung 1 g/l than hoạt tính với tỷ lệ khoảng 40% ở 60 NSKC và mô sẹo này hình thành chồi với tỷ lệ 54,17% sau 90 ngày nuôi cấy.

4.2 Đề nghị

- Mô sẹo tạo ra từ mô lá non với tỷ lệ cao và có khả năng sinh trưởng nhanh nên cần tiếp tục nghiên cứu môi trường thích hợp cho sự tái sinh chồi.
- Tiếp tục nghiên cứu môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của chồi và thuần dưỡng cây con ra nhà lưới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập và Trần Toàn. 2004. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. Tập I*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- George Edwin F. 1996. *Plant propagation by tissue culture Part 2 In practical*, 2nd Edition, Exegtics Limited.
- Gomez Kwanchai A. and Arturo A. Gomez. 1984. *Statistical procedures for agricultural research, 2nd Edition*, John Wiley & Sons, Inc., p. 306-308.
- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15, pp. 473-497.
- Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên. 2002. *Công nghệ tế bào*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyen, M. T., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, Q. L., Watanabe, H. and Kadota, S. 2004. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, pp. 1414-1421.
- Prachayasittikul, S., Buraparungsang, P., Worachartcheewan, A., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Ruchirawat, S. and Prachayasittikul, V. 2008. Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack., *Molecules*, 13, pp. 904-921.
- Prommee, P. 1988. *Thai traditional medicine*, Mahachulalongkon Publishing, Bangkok, p. 51.
- Ueda, J. Y., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Tran, Q. L., Tran, Q. K., Hariyama, Y., Saiki, I. and Kadota, S. 2002. Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, pp. 753-760.