

KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU TRONG TÁI SINH CÂY TRINH NỮ HOÀNG CUNG (*CRINUM LATIFOLUM* L.) TỪ MÔ SẸO

QUÁCH THỊ LIÊN, NGUYỄN ĐỨC THÀNH

Viện Công nghệ sinh học

Trinh nữ hoàng cung (TNHC) hay còn gọi là hoàng cung trinh nữ (*Crinum latifolium* L.) thuộc họ Thủy tiên (Amaryllidaceae) là cây thuốc được nhân dân Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam dùng củ, lá sào nóng, đắp ngoài để chữa đau nhức trong thấp khớp. Nó cũng được nhân dân ta biết đến như một vị thuốc có tác dụng xung huyết, được dùng để trị thấp khớp, đắp mụn nhọt, áp xe. Dịch của TNHC được dùng làm thuốc nhỏ chữa đau tai [2].

Gần đây, tác dụng chống ung thư của cây TNHC đã được phát hiện, làm nó trở thành một cây thuốc có giá trị trong việc điều trị một số dạng ung thư.

Theo kết quả phân tích thành phần hóa học của cây TNHC Việt Nam của tác giả Nguyễn Văn Bằng và cộng sự [1] thì cây có chứa alcaloit, saponin, axit hữu cơ, axit amin và chất chống oxy hóa.

Alcaloit là nhóm chất quan trọng nhất bao gồm lycorin, hippadin, ambellin và các dẫn chất của chúng. Các alcaloit này chỉ tìm thấy ở loài TNHC và một số loài thuộc họ Amaryllidaceae mà không tồn tại ở bất cứ một họ nào khác. Điều này nói lên tính độc đáo về mặt hóa học của cây TNHC.

Theo nghiên cứu của Ghosal' và cộng sự [6] lycorin có tác dụng ức chế quá trình sinh tổng hợp protein và ADN trong tế bào của chuột, đồng thời ức chế sự sinh trưởng *in vitro* của tế bào u báng trong chuột. Trong điều kiện *in vitro*, lycorin giảm sức sống của tế bào u một cách đáng kể. Nó làm đình trệ quá trình sinh tổng hợp các tiền chất của poliovirut và bản thân poliovirus cũng như các polypeptidaza đặc hiệu, vì vậy có tác dụng kháng virut mạnh. Chất này ức chế quá trình sinh tổng hợp protein trong tế bào có nhân bằng cách ngăn cản sự hình thành

các liên kết peptit. Những tác dụng sinh học tương tự cũng đã được ghi nhận với dihydrolycorin, pseudolycorin... Những alcaloit này triệt hạ sự sinh trưởng của tế bào Hela và quá trình sinh tổng hợp protein trong tế bào u báng và làm chậm quá trình sinh tổng hợp ADN.

Lycorin-1-0-glucosit ở liều lượng μg hoạt hóa phân bào lympho lách của chuột với độc tính cấp rất thấp (>200 mg/kg ip- intraperitoneal) và vì vậy nó được xem như chất kích miễn dịch tiềm tàng.

Hippadin có khả năng kết hợp với cấu trúc steroid, được xem là cơ sở của sự ổn định tế bào và điều hòa trao đổi chất của tế bào.

Như vậy, các alcaloit của TNHC vừa có tác dụng chống ung thư, vừa có tác dụng kích thích miễn dịch.

Tiếp thu những kết quả nghiên cứu của nước ngoài và kinh nghiệm chữa bệnh của nhân dân, nhiều thầy thuốc Việt Nam đã sử dụng lá cây TNHC để điều trị một số bệnh ung thư có kết quả tốt. Bệnh viện Hữu nghị Hà Nội dùng lá TNHC điều trị thành công cho hàng nghìn bệnh nhân từ 50-80 tuổi bị u xơ tiền liệt tuyến đã có chỉ định mổ và tỷ lệ khỏi rất cao (97%). Viện Dược liệu (trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước KH 11-05-02-02) đã kết hợp TNHC với một vài dược liệu khác, cho ra đời viên thuốc panacrin có tác dụng ức chế sự hình thành khối u, hạn chế di căn và kéo dài thời gian sống của động vật thí nghiệm. Thuốc đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng [3].

Nói tóm lại, TNHC đang trở thành cây thuốc có giá trị trong việc điều trị một số dạng ung thư. Nhu cầu về số lượng và chất lượng nguyên liệu để sản xuất thuốc đối với cây ngày một gia tăng. Mà nguồn nguyên liệu chỉ khai thác từ

hoang dại, phân tán, chất lượng không đồng đều, trữ lượng còn giới hạn và đang bị cạn kiệt. Việc nghiên cứu đưa cây TNHC vào trồng trọt để cung cấp nguyên liệu cho việc chế biến thuốc ở quy mô công nghiệp là rất cần thiết. Cần phải nghiên cứu quy trình nhân nhanh cây giống.

Có hai phương pháp nhân giống chính: phương pháp hữu tính và phương pháp vô tính. Phương pháp hữu tính (nhân giống bằng hạt) cho hệ số nhân cao, dễ bảo quản và vận chuyển. Tuy nhiên, nếu nhân giống bằng hạt có thể cho những cá thể không đồng nhất về mặt di truyền, dẫn đến không ổn định về mặt chất lượng (hàm lượng, hoạt chất không ổn định), gây khó khăn khi đưa vào dây chuyền sản xuất công nghiệp.

Để khắc phục vấn đề này, nhiều tác giả đưa ra quy trình nhân giống vô tính (chiết, ghép, giâm), và quy trình nhân giống vô tính *in vitro*.... Nhân giống vô tính tạo ra cây con đồng nhất về mặt di truyền do duy trì được các tính trạng của cây bố mẹ [9], tạo khả năng sản xuất những nguyên liệu có tiêu chuẩn ổn định cho công nghiệp, cho cây con có sức đề kháng cao, rút ngắn thời gian từ trồng đến thu hoạch, tạo điều kiện tăng vụ, tăng sản phẩm, qua đó tăng hiệu quả kinh tế. Nhưng nhân giống vô tính truyền thống cũng có nhược điểm nhất định: nhiễm bệnh qua nguyên liệu giống, hệ số nhân

giống thấp chỉ đạt 5-7 lần [5], khối lượng giống lớn, kông kênh, khó vận chuyển, bảo quản khó khăn....

Để góp phần giải quyết những khó khăn này, chúng tôi nghiên cứu khả năng nhân nhanh cây giống *in vitro*. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày "Những kết quả bước đầu trong việc tái sinh cây trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium* L.) từ mô sẹo". Việc tái sinh cây từ mô sẹo hoặc tạo chồi từ protocôm sẽ góp phần vào việc nhân nhanh giống cây quan trọng này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Cây TNHC (*Crinum latifolium* L.) thuộc họ Thủy tiên (Amaryllidaceae) được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy.

2. Phương pháp

Rửa sạch vật liệu (lá, thân, củ) bằng nước và xà phòng, tráng bằng nước cất vô trùng. Khử trùng vật liệu bằng cồn 70° trong thời gian 30 giây, tiếp tục khử trùng bằng dung dịch thủy ngân HgCl₂ 0,05-0,1% trong thời gian 5, 10, 15 phút (5 phút/lần). Rửa lại bằng nước cất vô trùng.

Bảng 1

Môi trường tạo mô sẹo và tái sinh cây

Môi trường	Tạo mô sẹo		Tái sinh cây	
	MSQ1	MSQ2	TSC1	TSC0
Thành phần cơ bản	MS	MS	MS	MS
Đường sucroza (g/l)	20	20	30	30
Thạch (g/l)	7,5	7,5	8	8
Nước dừa (ml/l)	20	20	100	100
Kinetin (mg/l)	1	1	<u>6</u>	<u>1</u>
Inositol (mg/l)	200	200	-	-
NAA (mg/l)	<u>6,5</u>	1	0,2	0,2
BAP (mg/l)	<u>3,5</u>	-	1	1
Axit nicotic (mg/l)	<u>0,5</u>	-	-	-
BI (mg/l)	1	-	-	-
Casein (mg/l)	-	<u>400</u>	-	-
pH	5,7	5,7	5,6	5,6

Mẫu sau khi khử trùng được cấy lên các môi trường tạo mô sẹo khác nhau trên nền môi trường cơ bản MS [7] có bổ sung một số chất điều hòa sinh trưởng (bảng 1). Điều kiện nuôi cấy ở $28\pm 2^\circ\text{C}$, trong buồng tối.

Mô tạo được đem cấy chuyển sang môi trường tái sinh cây trên nền môi trường cơ bản MS có bổ sung một số chất điều hòa sinh trưởng khác [4]. Điều kiện nuôi cấy ở $28\pm 2^\circ\text{C}$, từ 8 giờ sáng đến 16 giờ chiều, cường độ ánh sáng 2000 lux.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Khử trùng mẫu

Điều kiện vô trùng quyết định sự thành bại của quá trình nuôi cấy *in vitro*. Do đó, mẫu trước khi đưa vào nuôi cấy, ngoài việc chọn cây sạch bệnh và bộ phận sạch bệnh, cần phải được khử trùng. Việc khử trùng đảm bảo sạch nấm, vi khuẩn nhưng không làm chết mẫu. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng với mẫu cây trinh nữ hoàng cung

Chế độ	Hóa chất	Số lần xử lý (5 phút/lần)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ sống (%)
I	HgCl 0,1 %	1	55	10	35
II		2	20	15	65
III		3	20	80	0

Từ kết quả thu được, chúng tôi có một số nhận xét sau:

- Chế độ khử trùng I (1 lần, 5 phút/lần) cho tỷ lệ nhiễm cao (55%), nên tỷ lệ sống thấp (35%).

- Chế độ khử trùng III (3 lần, 5 phút/lần): tỷ lệ nhiễm giảm xuống còn 20%, nhưng tỷ lệ chết cao (80%).

- Chế độ khử trùng II (2 lần, 5 phút/lần): tỷ lệ nhiễm 20%, tỷ lệ chết thấp (15%), do đó tỷ lệ sống là 65%.

Như vậy, chế độ khử trùng thích hợp với mẫu cây TNHH là chế độ khử trùng II.

2. Giai đoạn tạo mô sẹo

Mô sẹo là nguyên liệu khởi đầu cho các nghiên cứu quan trọng như: phân hóa mô và tế bào, chọn dòng tế bào, tách protoplast, sản xuất các chất hoạt tính sinh học... Nuôi cấy mô sẹo là khâu rất quan trọng trong nuôi cấy mô tế bào.

Mẫu khử trùng được cấy trên 2 loại môi trường tạo mô MSQ1, MSQ2 sau 10-15 ngày bắt đầu tạo mô sẹo. Trên 2 môi trường khác nhau, tốc độ phát triển, màu sắc và cấu trúc của mô tạo được rất khác nhau:

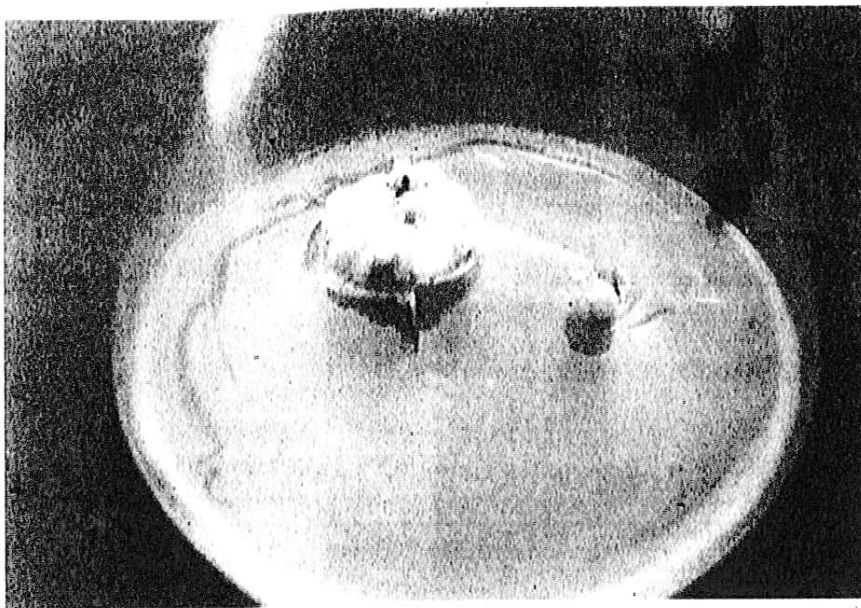
Trên môi trường MSQ2 có bổ sung casein 400 mg/l + NAA 1mg/l [8]: mô phát triển chậm,

trên bề mặt vật liệu phủ một lớp dịch nhớt trắng trong, lớp dịch nhớt này hóa mô; tiếp tục được phủ một lớp dịch nhớt khác trên toàn bộ bề mặt lớp mô trước. Sau 6-7 tuần, hình thành khối mô rắn chắc, chặt liền một khối, vàng tươi, lớp dịch dần ít đi.

Sau 8-9 tuần, khối mô có màu vàng xanh, phát triển đồng đều, chậm; trên bề mặt xuất hiện các mấu xanh nhỏ, đây là giai đoạn thích hợp cấy chuyển sang môi trường tái sinh.

Trên môi trường MSQ1 có bổ sung NAA 6,5 mg/l + BAP 3,5 mg/l + axit nicotinic 0,5 mg/l, từ các vết thương của vật liệu (vết cắt) mô sùi mô dạng hạt, mô phát triển mạnh, từ trong khối mô dần các lớp mô khác. Khối mô màu vàng nâu tối, xốp, hàm lượng nước cao.

Những kết quả thu được cho thấy cả hai loại môi trường tạo mô MSQ1, MSQ2 cho khả năng tạo mô tốt. Tuy nhiên, môi trường MSQ2 cho mô sẹo có triển vọng hơn trong việc tái sinh cây. Có thể hàm lượng casein 400 mg/l + NAA 1 mg/l bổ sung trong môi trường MSQ2 có tác động tốt đến quá trình phân hóa cơ quan, các tổ chức hình thành các cấu trúc hình thái dẫn đến việc tạo chồi, rễ và cây hoàn chỉnh của cây TNHH. Điều này phù hợp với kết quả thu được trong phân tái sinh cây.



Hình 1. Mô sẹo trên môi trường MSQ2

3. Giai đoạn tái sinh cây

Trong kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thì việc ứng dụng các chất điều hòa sinh trưởng là hết sức quan trọng. Hai nhóm chất được sử dụng nhiều nhất là auxin và cytokinin. Sự có mặt và cân bằng của hai nhóm chất này quyết định việc hình thành rễ hay hình thành chồi, cũng như quyết định tỷ lệ rễ hay chồi tái sinh.

Sau 15-20 ngày cấy chuyển sang môi trường tái sinh cây MSC1, chúng tôi thấy rõ sự sai khác trong sự phát triển giữa 2 loại mô tạo được từ 2 môi trường trên:

Mô tạo từ môi trường MSQ1 không thấy có sự phát triển, khối mô chuyển màu tối dần.

Mô tạo từ môi trường MSQ2 sau 15-20 ngày bắt đầu phát triển trở lại. Từ các mấu nhỏ và các ngách của khối mô, có sự phân hóa khác biệt: mô xanh dần đến xanh thẫm, hình thành các đỉnh sinh trưởng. Tuy nhiên, mô sẹo nuôi cấy trên các môi trường tái sinh cây khác nhau (TSC1, TSC0) thì sự sinh trưởng cũng như tỷ lệ nảy mầm khác nhau.

Mô nuôi cấy trên môi trường TSC0: sinh khối phát triển mạnh, tái sinh rễ mạnh mẽ, tái sinh chồi rất thấp.

Mô nuôi cấy trên môi trường TSC1: từ các

đỉnh sinh trưởng phân hóa thành các chồi, tỷ lệ tái sinh chồi cao, tái sinh rễ thấp.

Mô có nguồn gốc từ môi trường MSQ1 không có khả năng tái sinh.

Tỷ lệ tạo chồi trên hai loại môi trường tái sinh cây (TSC1, TSC0) là khác nhau. Do tỷ lệ tái sinh trên môi trường TSC0 quá thấp, mà chính trong khối mô cũng chứa một lượng cytokinin nội sinh. Vì vậy, chúng tôi chưa có kết luận khi bổ sung kinetin vào môi trường tái sinh cây ở ngưỡng 1 mg/l.

Trên môi trường TSC1 (bổ sung kinetin 6 mg/l) cho tỷ lệ tái sinh cây lớn hơn trên môi trường TSC0 (bổ sung kinetin 1 mg/l). Điều này cho thấy bổ sung một lượng cytokinin 6 mg/l là khá hợp lý cho quá trình tái sinh cây từ mô sẹo.

Tóm lại, nồng độ cytokinin bổ sung vào môi trường có ảnh hưởng đến khả năng tái sinh cây.

Tuy nhiên, tỷ lệ auxin/cytokinin bổ sung thích hợp cho việc tái sinh cây từ mô sẹo cần tiếp tục nghiên cứu.

III. KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được, rút ra các kết luận sau:

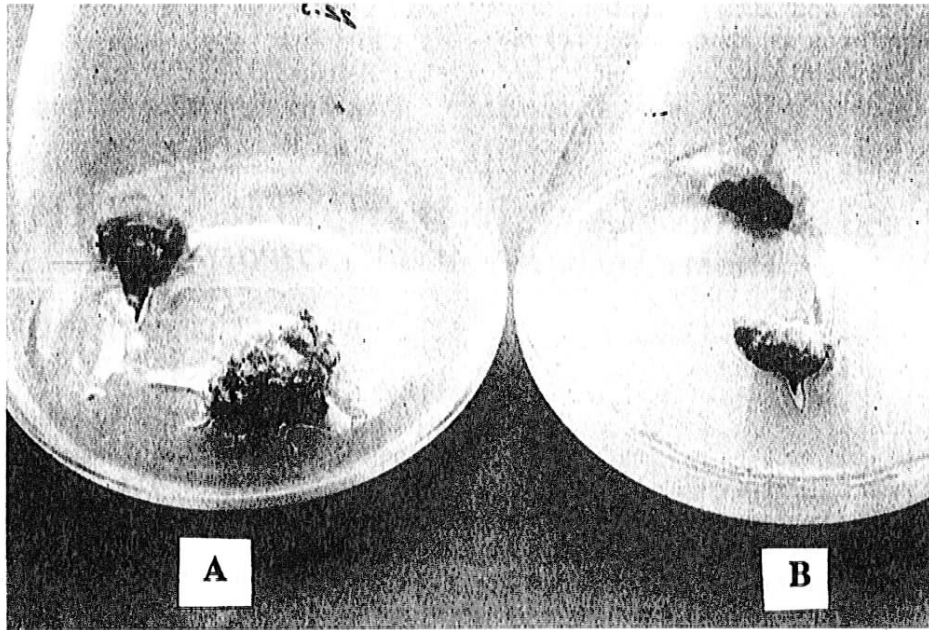
1. Khử trùng vật liệu tốt nhất bằng dung

dịch HgCl 0,1% với thời gian 10 phút trong 2 lần, mỗi lần 5 phút.

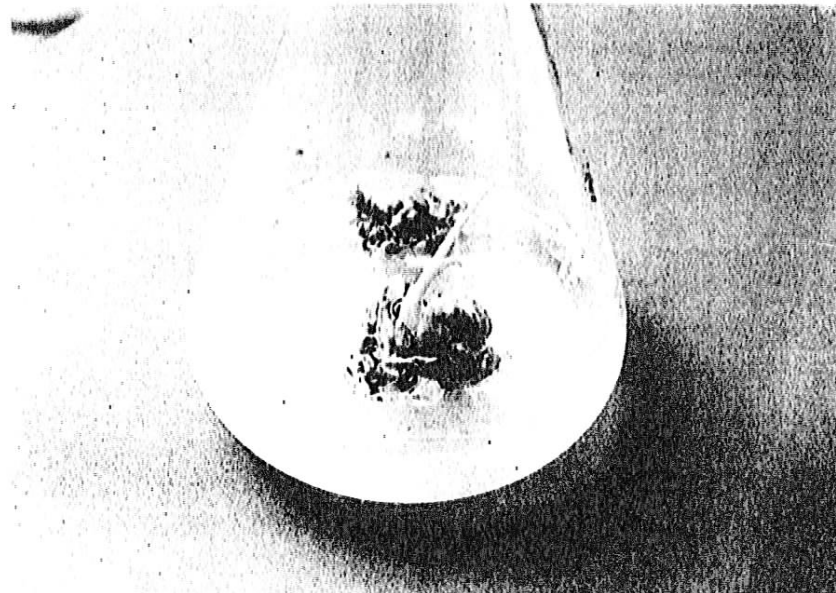
2. Môi trường thích hợp để tạo mô sẹo là môi trường MSQ2 (thành phần cơ bản là MS có bổ sung 400 mg/l casein, 1 mg/l NAA).

3. Mô sẹo có nguồn gốc từ các môi trường khác nhau có khả năng tái sinh cây khác nhau.

4. Môi trường thích hợp cho tái sinh cây từ mô sẹo là môi trường TSC1 (thành phần cơ bản là MS có bổ sung 6 mg/l kinetin, 0,2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP).



Hình 2. Nuôi cấy mô sẹo trên môi trường tái sinh cây
A: Mô từ MSQ2; B: Mô từ MSQ1



Hình 3. Chồi tái sinh từ mô sẹo trên môi trường TSC1

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Bằng và cs., 1997: Tạp chí Dược học, 7-9.
2. Võ Văn Chí, 1997: Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học, Hà Nội.
3. Phạm Kim Mãn, 1999: Nghiên cứu thuốc ức chế u panacrin từ nguồn dược liệu Việt Nam dùng trong điều trị ung thư. Báo cáo nghiệm thu đề tài khoa học cấp nhà nước, mã số 11-05-02-02.
4. Nguyễn Đức Thành, 2000: Nuôi cấy mô tế bào thực vật - Nghiên cứu và ứng dụng. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Viện Dược liệu, 1976: Kỹ thuật trồng cây thuốc. NXB Y học, Hà Nội.
6. Ghosal S., Saini K. S., Rardan S., 1985: Phytochemistry, 24(10): 2141- 2156.
7. Murashige T. and Skoog F., 1962: Physiol. Plant., 15: 473- 497.
8. Chee P. P., 1996: Plant Cell Report, 16: 184-187.
9. Petrop D. Ph., 1989: Di truyền học và cơ sở chọn giống. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.

PRELIMINARY RESULTS ON THE PLANT REGENERATION FROM CALLUS OF *CRINUM LATIFOLIUM L.*

QUACH THI LIEN, NGUYEN DUC THANH

SUMMARY

In this paper, preliminary results on the plant regeneration from callus of *Crinum latifolium L.* are presented. The calli were obtained from leaf and stem fragments of the mature trees. The calli were established on Murashige and Skoog medium supplemented with auxin and cytokinin in different concentrations and combinations.

A medium MSQ2 supplemented with 400 mg/l casein, 200 mg/l inositol, 1 mg/l kinetin was suitable for the induction and the growth of the calli derived from both leaf and stem.

Plants were successfully regenerated from the callus grown on MSQ2 medium using a TSC1 medium supplemented with 6 mg/l kinetin, 0,2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP.

Ngày nhận bài: 28-2-2002