

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY MÔ SẸO ĐỂ THU SINH KHỐI TỪ CÂY ĐƠN NEM (*MAESA BALANSAE* MEZ.)

QUÁCH THỊ LIÊN, NGUYỄN ĐỨC THÀNH

Viện Công nghệ sinh học

Cây đơn nem - *Maesa balansae* Mez. thuộc họ Côm nguội (Myrsinaceae) là một cây thuốc được sử dụng nhiều trong y học dân gian ở Việt Nam và Trung Quốc. Cây được sử dụng như một loại thuốc chữa ghẻ lở, mụn nhọt, nổi ngứa mề đay, đặc biệt là các bệnh ngoài da của người dân sống trong vùng ngập lũ. Ngoài ra, cây còn được dùng để tẩy giun sán, chống say rượu, chữa đau dạ dày [1-3].

Gần đây, cây đơn nem được phát hiện có tác dụng chữa một số bệnh hiểm nghèo. Germonprez và cs. [7] phát hiện được hợp chất antiprotozoal saponin ở cây đơn nem có tác dụng kháng ký sinh trùng *Leishmania*, nấm *Eizma* ... và rất có hiệu quả trong điều trị bệnh AIDS, Eizma.

Một vấn đề đặt ra là cây đơn nem là cây rừng sống hoang dại, phân tán nên việc cung cấp nguồn nguyên liệu cả về số lượng và chất lượng đều bị hạn chế. Do vậy, việc nghiên cứu nhân nhanh cây đơn nem vào trồng trọt quy mô công nghiệp nhằm cung cấp nguồn nguyên liệu ổn định là rất cần thiết.

Ngày nay, kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật đã mở ra một tiềm năng lớn trong công tác chọn, tạo và nhân nhanh giống cây trồng. Đồng thời mở ra triển vọng sử dụng kỹ thuật này để nuôi sinh khối lớn có khả năng tổng hợp các hoạt chất sinh học để thu nhận các hoạt chất đó trên quy mô công nghiệp.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu điều kiện nuôi cấy mô sẹo để thu sinh khối từ cây đơn nem.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Cây đơn nem được thu từ các vùng đồi núi

thuộc xã Mỹ Yên, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên.

2. Phương pháp

Phương pháp nuôi cấy tạo mô sẹo: mẫu cây được khử trùng, cắt thành những miếng nhỏ có độ dài 0,5 cm; mảnh lá có kích thước 0,5 × 0,5 cm và cấy lên môi trường tạo mô sẹo: môi trường MS + 3% sucroza, 10% nước dừa, 0,8% agar và bổ sung các chất kích thích sinh trưởng (auxin) với các nồng độ khác nhau. Bình đựng mẫu nuôi cấy để trong phòng tối.

Nuôi cấy mô sẹo để thu nhận sinh khối: mô sẹo được tách thành những miếng nhỏ có kích thước 0,5 × 0,5 × 0,5 cm, cấy trên môi trường nuôi cấy mô MS + 0,2% sucroza, 10% nước dừa, 0,8% agar và bổ sung thêm một số chất như 2,4-D (2,4- axít dichlorophenoxyaxêtic), IAA (axít indol axêtic), casein, inositol với các nồng độ khác nhau. Mỗi môi trường tiến hành theo dõi trong 10 bình tam giác có thể tích 250 ml. Nuôi cấy trong phòng tối. Sau 100 ngày nuôi cấy, dùng panh cấy gắp hết mô ra khỏi bình, cân trọng lượng mô thu được.

Phương pháp định tính saponin: định tính saponin trong mô sẹo bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nghiên cứu ảnh hưởng của auxin lên quá trình tạo mô sẹo

Trong kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào, auxin đóng vai trò chính trong quá trình hình thành mô sẹo. Ở thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các auxin đến quá trình hình thành mô sẹo.

Mẫu đơn nem sau khi khử trùng được cấy

lên môi trường MS + 3% sucroza + 10% nước dừa + 0,1% agar và bổ sung các auxin 2,4-D, NAA với các nồng độ khác nhau: 1, 2, 3, 4 mg/l. Các bình nuôi cấy mẫu được đặt trong buồng tối ở nhiệt độ 25±2°C.

Thời gian tạo mô được tính từ khi cấy mẫu đến khi mô sẹo bắt đầu hình thành. Hình thái của mô sẹo: mô sẹo bắt đầu hình thành có màu

trắng từ các vùng bị tổn thương (chỗ cắt) trên mẫu, không đồng đều trên mỗi miếng mẫu thường tập trung một chỗ; mô dạng hạt, nhỏ ly ty, trắng tuyết. Sau đó mô sẹo lan dần ra, hình thành kín trên bề mặt miếng mẫu và chuyển dần sang màu trắng vàng hoặc trắng đục hơi xám (tùy thuộc trên các môi trường nghiên cứu khác nhau). Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của các auxin đến khả năng tạo mô sẹo của cây đơn nem

Công thức	Auxin	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ tạo mô sẹo %		
			6 ngày	9 ngày	12 ngày
MT1	2,4-D	1	40	73,33	80
MT2		2	53,33	86,67	93,33
MT3		3	73,33	100	100
MT4		4	60	86,67	100
MT5	NAA	1	33,33	73,33	73,33
MT6		2	55,33	86,67	86,67
MT7		3	73,33	100	100
MT8		4	66,67	93,33	100

Kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy: nhìn chung, sau 12 ngày nuôi cấy, cả 8 công thức đều cho tỷ lệ tạo mô cao hơn hoặc bằng 73,33%, như vậy cả 2 loại auxin 2,4-D và NAA đều có tác dụng tốt đến khả năng tạo mô sẹo từ mẫu cây đơn nem. Tuy nhiên, các chất khác nhau (2,4-D và NAA), nồng độ các chất khác nhau thì thời gian tạo mô sẹo khác nhau và tỷ lệ tạo mô cũng khác nhau.

Đối với 2,4-D, khi tăng nồng độ từ 1 lên 2 và 3 mg/l thì tỷ lệ tạo mô tăng từ 40 lên 55,53 và 73,33% sau 6 ngày nuôi cấy và từ 73,33 lên 86,67 và 100% sau 9 ngày nuôi cấy.

Khi tăng nồng độ 2,4-D lên tới 4 mg/l, kết quả là thời gian tạo mô sẹo chậm hơn, sau 12 ngày mới đạt 100% và tỷ lệ tạo mô giảm rõ rệt: sau 6 ngày từ 73,33 xuống 60% và sau 9 ngày từ 100% xuống 86,67%. Từ kết quả trên, chúng tôi nhận thấy khi tăng nồng độ 2,4-D lên cao tới 4 mg/l đã làm giảm quá trình tạo mô sẹo.

Đối với NAA, khi tăng nồng độ từ 1 lên 2 và 3 mg/l thì tỷ lệ tạo mô tăng: sau 6 ngày cấy từ

33,33 lên 57,33 và 73,33%, và sau 9 ngày cấy từ 73,33 lên 86,67 và 100%.

Công thức MT7 chứa 3 mg/l NAA tạo mô sẹo sớm và có tỷ lệ tạo mô sẹo cao.

Khi tăng nồng độ NAA lên tới 4 mg/l (ở công thức MT8) thì tỷ lệ tạo mô sẹo giảm nhưng giảm không đáng kể (so với công thức MT7); sau 6 ngày nuôi cấy chỉ giảm từ 73,33% xuống 66,67%, sau 9 ngày nuôi cấy giảm từ 100% xuống 93,33%, tuy nhiên sau 12 ngày nuôi cấy cũng đạt 100%. Như vậy, ở ngưỡng nồng độ NAA 4 mg/l, đã bắt đầu gây ức chế sự hình thành mô sẹo.

Như vậy, đối với cây đơn nem, cả 2,4-D và NAA đều có tác dụng tốt đến quá trình hình thành mô sẹo. Công thức MT3 chứa 3 mg/l 2,4-D và công thức MT7 chứa 3 mg/l NAA là tốt nhất, cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao và thời gian tạo mô sớm. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả của Ikenaga T. và cs [4] khi sử dụng 2,4 D và NAA để tạo mô sẹo từ cây *Solanum aculeatissimum* Jacq., sau hai tuần hầu hết trên

các mẫu sống đã tạo mô sẹo.

2. Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng lên khả năng sinh trưởng và phát triển của mô sẹo

Trong thí nghiệm này, chúng tôi nghiên cứu sự sinh trưởng phát triển của mô sẹo trên các môi trường nuôi cấy MS + 2% sucroza + 0,8% agar + 10% nước dừa + 0,4 g/l casein + 0,2 g/l inositol có bổ sung auxin, xytokinin ở các nồng độ khác nhau.

Trên hầu hết các môi trường nuôi cấy, mô sẹo sinh trưởng tốt, nhanh, mạnh; mô có hàm lượng nước cao, xốp, cho lượng sinh khối lớn. Dựa vào hình thái của mô sẹo, có thể chia ra làm 3 loại:

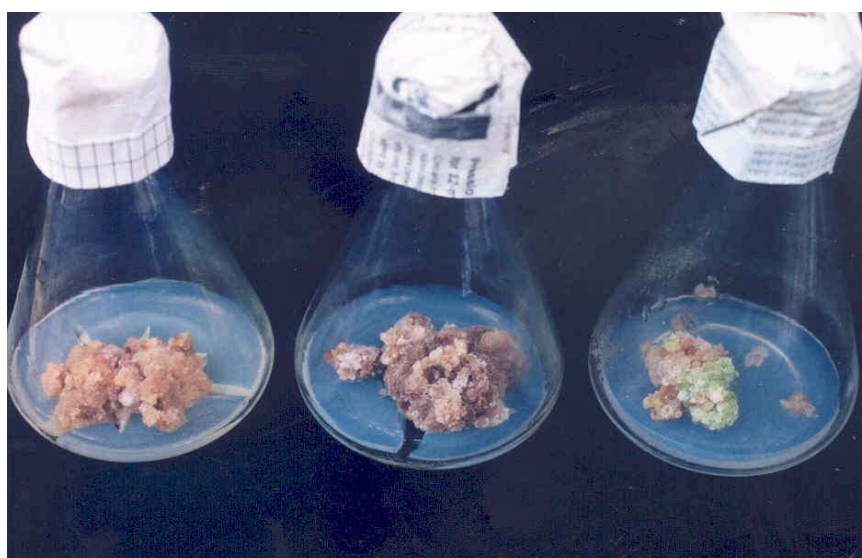
- Loại 1: mô sẹo thu được sau khi nuôi cấy trên các môi trường SK7, SK8 là những mô sẹo sinh trưởng chậm, rắn chắc, liền một khối; trên khối mô, xuất hiện những mô xanh (lục hóa), trên bề mặt mô sẹo càng về sau thì phủ lớp mô sẹo mới trắng tuyết. Nhìn toàn bộ khối mô sáng xanh, đẹp.

- Loại 2: mô sẹo thu được sau khi nuôi cấy trên các môi trường SK1, SK2, SK3, SK4 (có

nồng độ 2,4-D 1 mg/l và tổ hợp với các chất xytokinin (kinetin, BAP) ở các nồng độ khác nhau) là những mô sẹo sinh trưởng phát triển nhanh, mô xốp, rời rạc, có hàm lượng nước cao; mô vàng, trắng, đều cả phần trên và phần dưới chân mô.

- Loại 3: mô sẹo thu được sau khi nuôi cấy trên các môi trường SK5, SK6 là những mô sẹo sinh trưởng phát triển mạnh, mô xốp, nhưng không rời rạc; thời gian nuôi cấy càng dài, màu sắc của mô càng thay đổi. Phần đế mô màu xẫm dần, trên mặt màu sáng hơn, thỉnh thoảng điểm một vài chỗ mô trắng sáng. Ở 2 môi trường này không có 2,4-D, mà có NAA 1 mg/l, 0,5 mg/l BAP và tổ hợp với kinetin ở nồng độ 2 mg/l và 4 mg/l.

Kết hợp việc theo dõi hình thái của mô sẹo trên các môi trường nghiên cứu, chúng tôi tiến hành thu nhận sinh khối mô trên các môi trường đó. Cân đo trọng lượng mô ướt thu được. Sau đó, thổi khô khối lượng mô ướt thu được trong bàn cấy vô trùng đến trọng lượng không đổi. Cân đo trọng lượng mẫu khô, và đánh giá hàm lượng nước có trong mẫu mô nuôi cấy. Kết quả được trình bày ở bảng 2.



Hình 1. Ảnh hưởng của môi trường đến sự phân hóa hình thái của mô sẹo

Ghi chú: bên phải: mô trên môi trường SK7; bên trái: mô trên môi trường SK2; giữa: mô trên môi trường SK6

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến thu nhận sinh khối

Công thức	2,4-D (mg/l)	NAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	BAP (mg/l)	Sau 100 ngày nuôi cấy			
					M _u (g/bình)	M _k (g/bình)	Hàm lượng nước (%)	Hàm lượng chất khô(%)
SK1	1	–	2	0,5	20,61	1,257	93,90	6,10
SK2	1	–	4	0,5	19,89	1,303	93,48	6,52
SK2	1	–	0,5	2	19,03	1,050	94,44	5,52
SK4	1	–	0,5	4	17,78	1,045	94,13	5,58
SK5	–	1	2	0,5	18,27	1,096	94,00	6,00
SK6	–	1	4	0,5	17,09	1,160	93,21	6,79
SK7	–	1	0,5	2	13,35	1,316	90,14	9,86
SK8	-	1	0,5	4	11,67	1,82	84,30	15,70

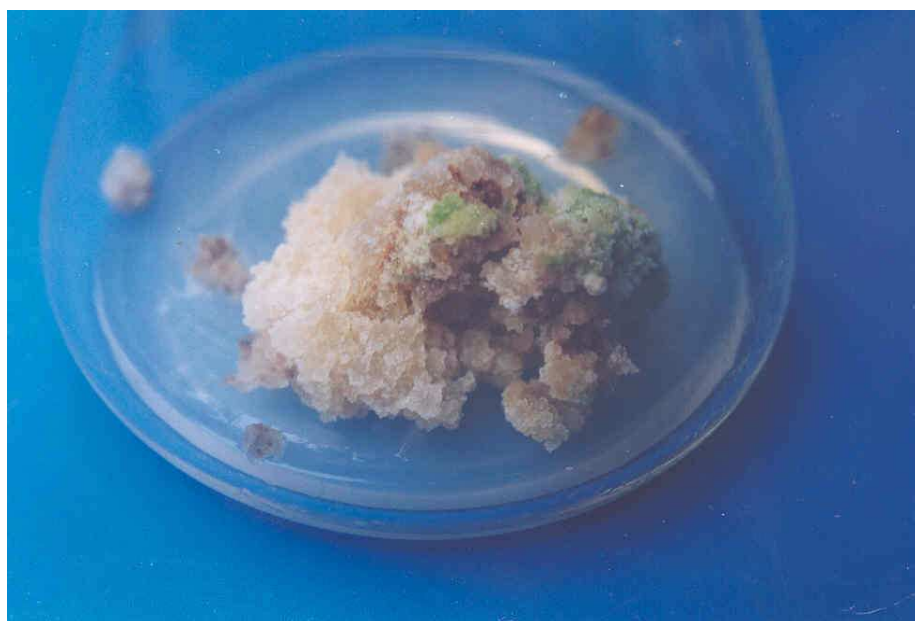
Kết quả trong bảng 2 cho thấy:

Hầu hết trọng lượng mô ướt thu được trên các môi trường nuôi cấy là rất cao, từ 17,09 - 20,61 g/bình.

Riêng trên hai môi trường SK7, SK8 với tổ hợp NAA/BAP là 1/2, 1/4, có bổ sung thêm 0,5 mg/l kinetin, thu được trọng lượng mô ướt thấp hơn, chỉ đạt 13,35 g/bình và 11,67 g/bình.

Tuy nhiên, trọng lượng mô khô thu được (sau khi thổi khô đến trọng lượng không đổi) trên các môi trường nuôi cấy lại cho kết quả

ngược lại. Trên các môi trường SK1, SK2, SK3, SK4, SK5, SK6 thu được trọng lượng mô khô thấp, chỉ đạt 5,22 - 6,79% trọng lượng mô ướt thu được; điều này có nghĩa là hàm lượng nước trong mô trên các môi trường rất cao 93,21% - 94,44%. Như vậy, các môi trường có bổ sung 2,4-D 1 mg/l và các môi trường bổ sung NAA 1 mg/l tổ hợp với kinetin 2 mg/l, 4 mg/l cho sinh trưởng mô tốt nhưng hàm lượng nước trong mô cao nên thu được trọng lượng mô khô thấp, chỉ đạt 5,42 - 6,79% của trọng lượng mô ướt.



Hình 2. Mô sẹ trên môi trường SK7

Trên các môi trường SK7, SK8, thu được trọng lượng mô ướt thấp (11,67 g/bình, 13,35 g/bình) nhưng sau khi thổi khô thu được trọng lượng mô khô rất cao, cao nhất trong các môi trường. Trên môi trường SK8 trọng lượng khô đạt 15,6% và trên môi trường SK7 đạt 9,86% trọng lượng mô ướt. Hàm lượng nước trong mô thu được từ hai môi trường SK7, SK8 tuy vẫn khá cao nhưng so với mô từ các môi trường khác thì đã thấp hơn rất nhiều, chỉ là 90,14% và 84,30%.

Khi so sánh trọng lượng mô thu được trên các môi trường SK5, SK6, SK7, SK8 có cùng nồng độ NAA 1 mg/l và những tổ hợp auxin/cytokinin khác nhau, chúng tôi thấy: trên hai môi trường SK5 và SK6 (tổ hợp với kinetin nồng độ 2 và 4 mg/l), mô phát triển nhanh, sinh khối mô ướt thu được cao nhưng hàm lượng nước trong mô cao nên thu được trọng lượng mô khô thấp. Trên hai môi trường SK7 và SK8 (tổ hợp với BAP nồng độ 2 và 4 mg/l) thì ngược lại, mô sinh trưởng phát triển chậm, trọng lượng mô ướt thấp nhưng hàm lượng chất khô thu được cao. Từ kết quả thu được, chúng tôi có nhận xét trên các môi trường nuôi cấy có tổ hợp auxin/cytokinin khác nhau thì sự sinh trưởng phát triển của mô là khác nhau và sự phát triển sinh khối của mô cũng khác nhau. Zong JJ. và cs [8] cũng chỉ ra rằng khả năng sinh trưởng của mô tế bào, sự tổng hợp các hoạt chất sinh học và năng suất của hoạt chất đạt được thay đổi khi nuôi cấy *Panax quinquefolium* trên các môi trường có các chất auxin khác nhau và các tổ hợp auxin/xytokinin khác nhau.

Jayakumaran N. A. và cs. [5] nuôi cấy *Coscinium fenestratum* trên các môi trường có bổ sung các auxin khác nhau như 2,4D và NAA cũng có kết luận rằng sinh trưởng của mô tế bào, sự tổng hợp các hoạt chất sinh học (becberin) là khác nhau. Tác giả còn kết luận khi dùng NAA thay cho 2,4 D và kết hợp với BAP thì hoạt chất sinh học thu được tăng từ 1,97% đến 4,07% của sinh khối thu được.

Tuy nhiên, xét về trọng lượng mô thu được trên cả 8 loại môi trường nuôi cấy thì cả 8 loại đều cho trọng lượng mô khô cao. Hai môi trường SK7 và SK8 cho hàm lượng chất khô cao; nhưng hai môi trường SK1 và SK2 cũng cho sinh khối mô thu được cao, M_k đạt 1,257 g/bình và 1,303 g/bình.

Như vậy, với mục đích nghiên cứu nuôi cấy mô để thu nhận sinh khối thì hai môi trường SK7 và SK8 với tổ hợp NAA/BAP là 1/2, 1/4, có bổ sung 0,5 mg/l kinetin, là tốt nhất. Ngoài ra, hai môi trường SK1 và SK2 cũng cho sinh khối mô cao.

3. Định tính saponin trong mô nuôi cấy

Sau khi nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh trưởng phát triển của mô sẹo, thu nhận sinh khối mô, chúng tôi tiến hành đánh giá ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy mô sẹo lên sự tổng hợp và tích lũy saponin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Phương pháp này cho phép xác định nhanh và có hiệu quả sự hiện diện của saponin.

Mẫu mô sẹo thu được từ các môi trường trình bày ở phần trên được đánh số thứ tự ký hiệu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 theo bảng 2. Mẫu hợp chất saponin chuẩn ký hiệu là C.

Trong quá trình chiết xuất và cô cạn dịch chiết, chúng tôi nhận thấy: ở tất cả các mẫu mô trong quá trình cô cạn chân không đều tạo bọt, chất kết tủa màu trắng trong các dung môi như etanol, metanol. Khi hòa chất kết tủa trong nước thấy tan. Các tính chất vật lý này chứng tỏ có saponin trong dịch chiết mẫu mô.

Sơ đồ kết quả sắc ký lớp mỏng của phân đoạn thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Kết quả sắc ký lớp mỏng 8 mẫu mô nuôi cấy *in vitro*

Ghi chú: C: mẫu hợp chất chuẩn, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: hợp chất thu được từ các mẫu mô nuôi cấy trên các môi trường thứ tự là SK1, SK2, SK3, SK4, SK5, SK6, SK7, SK8.

Từ kết quả sắc ký thu được, chúng tôi có nhận xét sau: trên sắc ký đồ của phân đoạn có 6 vạch chưa xác định được bản chất. Nhưng trên cơ sở so sánh với mẫu chuẩn trên sắc ký đồ, có thể khẳng định rằng trong các mẫu mô của cây đơn nem thu được có chứa hợp chất có bản chất saponin.

III. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đối với mẫu cây đơn nem, công thức MT3 (MS +3 mg/l 2,4-D) và công thức MT7 (MS + 3 mg/l NAA) là tốt nhất cho quá trình hình thành mô sẹo, cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao và thời gian tạo mô sớm.

2. Các môi trường nghiên cứu đều cho thu nhận sinh khối mô cao và có khả năng tổng hợp, tích lũy nhóm chất saponin; các môi trường cho trọng lượng mô khô cao nhất là SK7 (MS + 1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP) và SK8 (MS + 1 mg/l NAA + 4 mg/l BAP); các mẫu mô đều có chứa hợp chất có bản chất saponin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Võ Văn Chi**, 1997: Từ điển cây thuốc Việt Nam. Nxb. Y học, Hà Nội.
2. **Phạm Hoàng Hồ**, 1999: Cây cỏ Việt Nam, 1: 674-675. Nxb. Trẻ.
3. **Đỗ Tất Lợi**, 1999: Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam: 129-130, Nxb. Y học, Hà Nội.
4. **Ikenaga T., Hadayani R., Oyama T.**, 2000: Plant Cell Report, 19: 1240-1244.
5. **Jayakumar N. A. et al.**, 1992: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 29: 7-10.
6. **Murashige T., Skoog F.**, 1962: Physiol. Plant, 15: 473-497.
7. **Nils Germonprez et al.**, 2000), Valorisation of the Biodiversity: development of a new antileishmania drug from the medicinal plant *Maesa balansae* Mez. *Inter application pullic under the Patent Co (PCT)*. A61K35/78 CO7C.
8. **Zhong J. J., Bai Y., Wang S. J.**, 1997: Journal of Biotechnology, 45: 227-234.

STUDY ON TISSUE CULTURE CONDITIONS OF *MAESA BALANSAE* MEZ. FOR MASS PRODUCTION

QUACH THI LIEN, NGUYEN DUC THANH

SUMMARY

Maesa balansae Mez. is a valuable herb, which has been used in traditional vietnamese medicine. A mixture of antiprotozoal saponins was isolated from the leaves of *Maesa balansae* Mez. In this paper, we report the results of the study on tissue culture conditions for this plant. The *Maesa* tissue culture was carried out in MS medium, supplemented with auxin and cytokinine in different concentrations and combinations.

All of the 8 investigated culture media were suitable for mass production of *Maesa* and its bioactive components. However, the SK7 medium (MS + 1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP) and the SK8 medium (MS + 1 mg/l NAA + 4 mg/l BAP) were the most efficient.

Ngày nhận bài: 30-12-2002