

Sinh phôi soma từ mô lá cây Bạch hoa xà thiệt thảo (*Hedyotis diffusa* Willd.)

- Nguyễn Thị Kim Anh
- Hoàng Thị Thu Thắm
- Phan Ngô Hoang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

Email: pnhoang@hcmus.edu.vn

(Bài nhận ngày 25 tháng 10 năm 2017, nhận đăng ngày 18 tháng 12 năm 2017)

TÓM TẮT

Bạch hoa xà thiệt thảo (*Hedyotis diffusa*) là loại thảo dược thuộc họ Cà phê (*Rubiaceae*), được sử dụng để điều trị các căn bệnh liên quan đến bạch cầu và kháng sự tăng trưởng của tế bào ung thư. Ngoài ra, cây còn chứa hai loại triterpen là oleanolic acid, ursolic acid và flavonoid có tác dụng chống viêm, kháng khuẩn, hạ đường huyết, chống sự phát triển các gốc tự do, giảm lipid máu và kháng ung thư [1]. Trong nghiên cứu này, các phân đoạn của lá từ cây Bạch hoa xà thiệt thảo in vitro 3 tuần tuổi được cô lập và nuôi cấy trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1mg/L kết hợp với IAA hay NAA với nồng độ thay đổi 0,1; 0,2; hay 0,4 mg/L. Sự sinh phôi soma từ mô lá đạt tỉ lệ 100 % trên các môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1 mg/L kết

MỞ ĐẦU

Gần đây, việc sử dụng thảo dược để điều trị một số bệnh nan y ngày càng phổ biến vì hiệu quả cao lại ít biểu hiện tác dụng phụ. Cây Bạch hoa xà thiệt thảo (*Hedyotis diffusa*) đã được sử dụng nhiều trong các bài thuốc y học cổ truyền để điều trị hạn chế sự phát triển tế bào ung thư và một số loại bệnh khác nhau [2, 3]. Các công bố khoa học trên thế giới hiện nay đang tập trung vào phân tích, khảo sát và chứng minh được lý của dịch trích, trong khi các công trình nghiên cứu về nuôi cấy in vitro cây Bạch hoa xà thiệt thảo chưa có nhiều. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật lên khả năng phát sinh phôi soma từ mô lá nhằm xác định một

hợp IAA 0,1 mg/L hay IAA 0,2 mg/L, phôi soma phát sinh cũng trải qua các giai đoạn phát triển tương tự của phôi hữu tính: phôi hình cầu, hình tim, hình cá đuối và phôi trưởng thành. Số lượng chồi tăng trưởng sau giai đoạn phát triển phôi trên các môi trường này cũng đạt giá trị rất cao. Trên những phân đoạn của mỗi lá, số lượng phôi soma xuất hiện cũng khác nhau: phần giữa và phần gốc lá có số phôi phát sinh cao hơn hẳn so với ngọn lá. Những biến đổi hình thái và vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng nội sinh trong quá trình phát sinh phôi đã được phân tích; mối liên hệ giữa vị trí khác nhau trên một lá, cường độ hô hấp của các lá, hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật và sự sinh phôi soma được thảo luận.

trưởng thực vật, cường độ hô hấp, phôi soma kỹ thuật nuôi cấy in vitro trong mục đích nhân giống và khai thác loại dược liệu này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây Bạch hoa xà thiệt thảo (*Hedyotis diffusa*) in vitro 3 tuần tuổi tăng trưởng từ hạt trên môi trường MS [4] với đa lượng giảm 50 % (MS $\frac{1}{2}$), sacarose 30 g/l, nhiệt độ 27 \pm 2 °C, ánh sáng 2.500 \pm 500lx (12/12) và ẩm độ không khí 75 \pm 5 %, tại phòng thí nghiệm Sinh lý thực vật, Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Phương pháp

Sự sinh phôi soma từ mô lá

Các lá ở vị trí 2 và 3 (tính từ ngọn) của cây in vitro 3 tuần tuổi được cô lập, tạo vết thương vuông

góc với gân chính và đặt lên môi trường: MS $\frac{1}{2}$ (đôi chúng), MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1mg/L kết hợp với IAA hoặc NAA có nồng độ thay đổi 0,1 đến 0,4 mg/L. Theo dõi sự phát sinh phôi ở mỗi nghiệm thức theo thời gian.

Ảnh hưởng của vật liệu nuôi cấy lên quá trình phát sinh phôi soma

Các lá ở vị trí 2 và 3 (tính từ ngọn) từ cây *in vitro* 3 tuần tuổi được cô lập, tạo vết thương vuông góc với gân chính và chia làm 3 phân đoạn (ngọn, giữa và gốc lá) sau đó đặt trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung BA 1 mg/L kết hợp IAA 0,2 mg/L. Theo dõi sự phát sinh phôi soma ở mỗi nghiệm thức theo thời gian.

Phân tích biến đổi hình thái trong quá trình phát sinh phôi

Sự biến đổi hình thái của mẫu cấy được quan sát trực tiếp bằng mắt thường hoặc dưới kính hiển vi soi nổi; những thay đổi cấu trúc của mô, phôi soma, chồi hay mô sẹo được quan sát dưới kính hiển vi quang học sau khi giải phẫu ngang và nhuộm hai màu.

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Mẫu cấy phát sinh từ các nghiệm thức được ly trích và cô lập trên bản mỏng silicagel F254 (1.0554, Merck), với hệ dung môi di chuyển isopropanol: ammonium hydroxide: H₂O (10:1:1) ở 30±2 °C. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng

thực vật nội sinh IAA, zeatin, GA3 và ABA được xác định nhờ sinh trắc nghiệm [5].

Cường độ hô hấp

Hô hấp của mẫu cấy được xác định bằng điện cực oxygen của máy Leaf Lab 2 (Hansatech, Anh). Cường độ hô hấp được tính dựa trên lượng oxygen thay đổi trong buồng đo ($\mu\text{molO}_2/\text{g}$ trọng lượng tươi/ giờ).

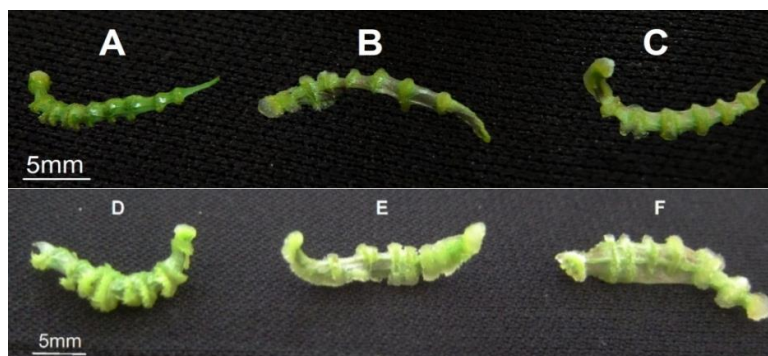
Xử lý số liệu

Số liệu ghi nhận từ các thí nghiệm được xử lý thống kê nhờ chương trình SPSS 20.0 cho windows. Sự phân hạng, chia nhóm theo công thức Duncan, Dunnett dựa trên những khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$ (p : probability), các giá trị khác biệt được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau kèm theo sau số trung bình.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự sinh phôi soma từ tế bào mô lá

Sau 3 ngày nuôi cấy, mô lá bắt đầu có biểu hiện đáp ứng, tại các vùng vết thương thấy rõ được sự phù lên, đến ngày thứ 5 có thể quan sát thấy mô sẹo. Mô lá ở ngày thứ 7 trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1mg/L kết hợp IAA 0,1 mg/L hoặc 0,2 mg/L hay NAA 0,1 mg/L đều ghi nhận sự xuất hiện các nốt và chồi. Các phẫu thức cắt ngang và nhuộm hai màu đỏ carmin-xanh iod cho thấy có sự hiện diện của phôi soma, trong khi đó các mô lá trên môi trường đối chứng MS $\frac{1}{2}$ không có hiện tượng này (Hình 1).



Hình 1. Mô lá sau 7 ngày nuôi cấy trên các môi trường: (A) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,1 mg/L; (B) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,2 mg/L; (C) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,4 mg/L; (D) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,1 mg/L; (E) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,2mg/L; (F) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,4 mg/L

Trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1 mg/L kết hợp IAA 0,1 mg/L hay IAA 0,2 mg/L sự biệt hóa tạo phôi sớm nhất vào ngày thứ 7, với tần suất xuất hiện phôi soma rất cao. Trong khi đó, trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1mg/L kết hợp NAA 0,1mg/L sự tạo phôi xuất hiện vào khoảng ngày thứ 12 sau sự nuôi cấy với tần suất thấp hơn nhiều (Bảng 1).

Bảng 1. Tần suất xuất hiện phôi soma từ mô lá trên các môi trường nuôi cấy khác nhau, sau 7 ngày

Nghiệm thức	Tần suất xuất hiện phôi (%)
MS $\frac{1}{2}$	0 \pm 0 ^c
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,1mg/L	100 \pm 0 ^a
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,2mg/L	100 \pm 0 ^a
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,4mg/L	0 \pm 0 ^c
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,1mg/L	44,42 \pm 7,04 ^b
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,2mg/L	0 \pm 0 ^c
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,4mg/L	0 \pm 0 ^c

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì sự khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Cụm chồi phát sinh trên mẫu cấy bao gồm chồi được tạo thành trực tiếp từ tế bào mô sẹo và chồi được tạo thành từ quá trình phát sinh phôi soma (Hình 2).

Số lượng chồi phát sinh nhiều trên các môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1 mg/L kết hợp IAA 0,1 mg/L hoặc IAA 0,2 mg/L (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng lên sự tạo cụm chồi từ mô lá, sau 3 tuần

Nghiệm thức	Số chồi
MS $\frac{1}{2}$	0,00 \pm 0,00 ^d
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,1 mg/L	67,50 \pm 0,87 ^a
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,2 mg/L	72,20 \pm 7,81 ^a
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,4 mg/L	10,50 \pm 0,96 ^c
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,1 mg/L	20,33 \pm 1,09 ^b
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,2 mg/L	12,33 \pm 1,12 ^{bc}
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,4 mg/L	9,50 \pm 0,99 ^c

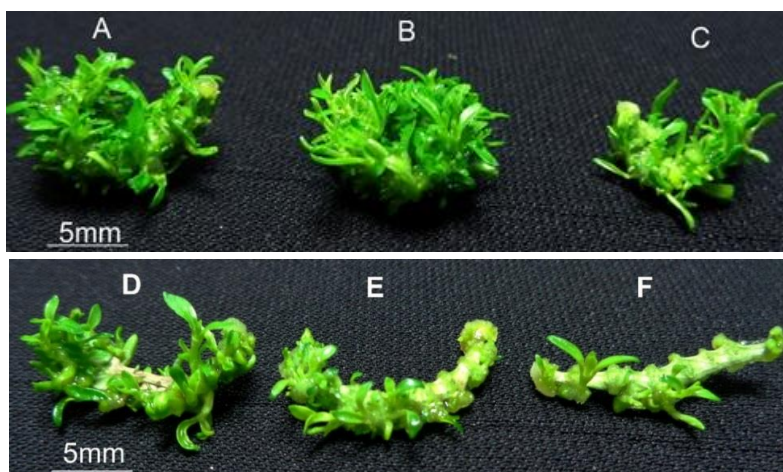
Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì sự khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Trong các mẫu cấy có sự phát sinh phôi soma, trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1mg/L kết hợp IAA 0,1 mg/L hay IAA 0,2 mg/L tương ứng với số chồi được tạo ra nhiều nhất trên hai môi trường này luôn có cường độ hô hấp cao (Bảng 3).

Bảng 3. Cường độ hô hấp của mô lá trên các môi trường nuôi cấy khác nhau sau 10 ngày

Nghiệm thức	Cường độ hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g TLT}/\text{giờ}$)
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,1 mg/L	72,53 \pm 4,46 ^a
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,2 mg/L	68,26 \pm 3,34 ^a
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,4 mg/L	33,67 \pm 2,52 ^c
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,1 mg/L	37,74 \pm 1,03 ^{bc}
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,2 mg/L	44,77 \pm 1,37 ^b
MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,4 mg/L	33,98 \pm 2,53 ^c

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì sự khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

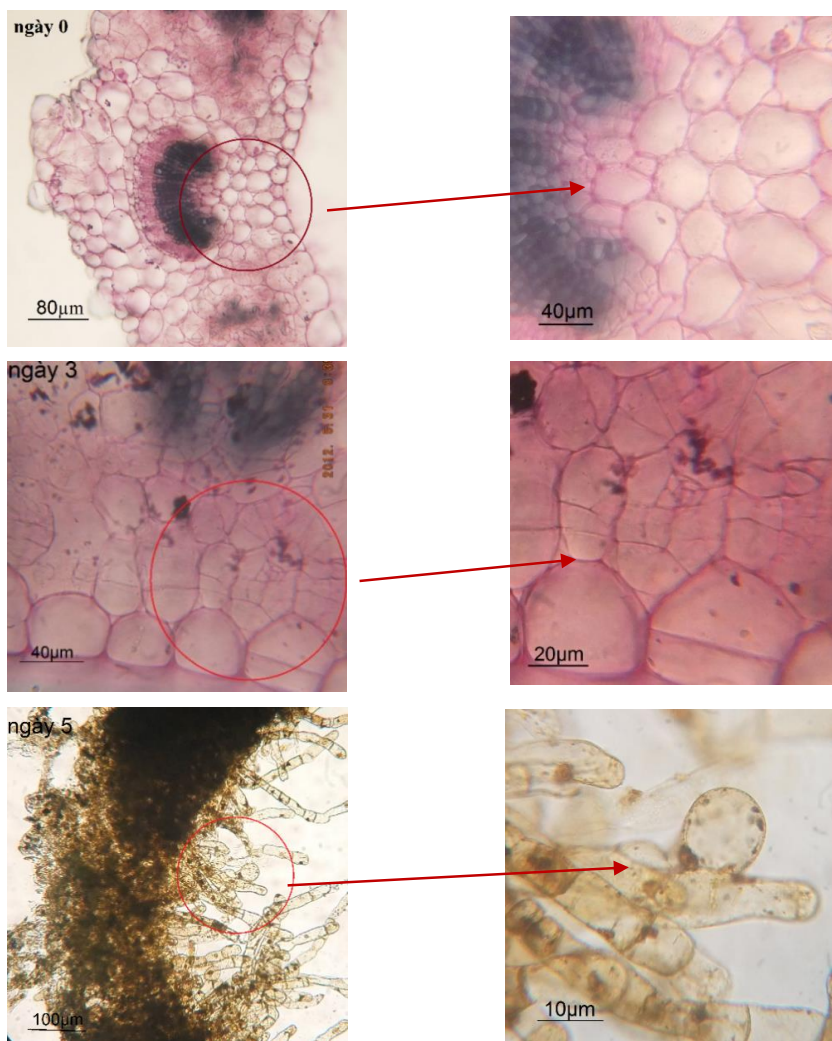


Hình 2. Cụm chồi từ mô lá sau 3 tuần trên các môi trường khác nhau: (A) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,1 mg/L; (B) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,2 mg/L; (C) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,4 mg/L; (D) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,1 mg/L; (E) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,2 mg/L; (F) MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và NAA 0,4 mg/L

Phân tích biến đổi hình thái trong quá trình phát sinh phôi soma

Trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L sau 3 ngày mẫu cấy đã có biểu

hiện đáp ứng với môi trường, lát cắt giải phẫu ghi nhận sự phân chia của tế bào biểu bì và nhóm tế bào dưới biểu bì; đến ngày thứ 5 tế bào mô sẹo xuất hiện tại các vết thương với nhiều hình dạng khác nhau: dài, tròn, oval (Hình 3).



Hình 3. Phẫu thức cắt ngang qua vùng tạo mô sẹo lá trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,2 mg/L theo thời gian

Phôi soma phát sinh từ lá trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L đã được ghi nhận qua các bước theo trình tự biến đổi tương tự phôi hữu tính: phôi hình cầu với biểu bì

rất rõ ở ngày thứ 7, từ ngày thứ 8 sau nuôi cấy có thể ghi nhận được phôi hình tim, ngày thứ 9 phôi hình cá đuối được hình thành và sau ngày thứ 10 cực chồi và cực rễ xuất hiện (Hình 4).

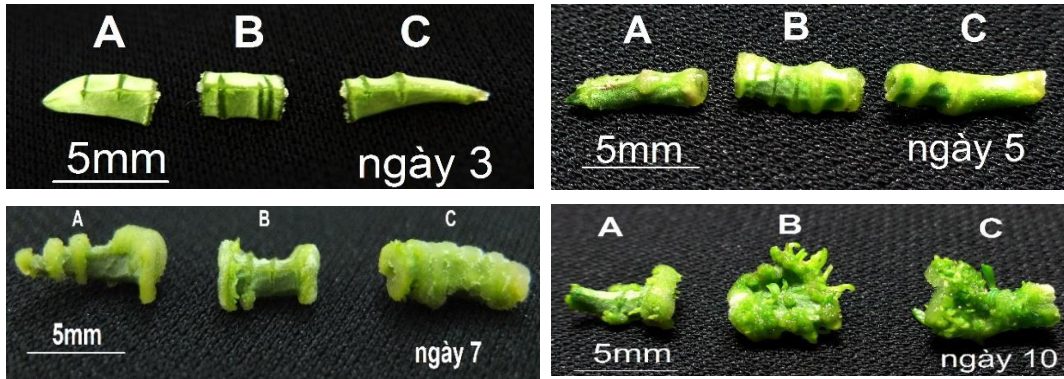


Hình 4. Các giai đoạn phát sinh phôi soma từ mô lá trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 và IAA 0,2mg/L theo thời gian

Ảnh hưởng của vật liệu nuôi cấy lên quá trình phát sinh phôi soma

Sau 3 ngày nuôi cấy, cả ba phần đoạn của lá đều có đáp ứng với môi trường nuôi cấy; ngày thứ 5, mô sẹo xuất hiện tại vết cắt trên cả 3 phần

đoạn của lá; từ ngày thứ 7, mẫu cấy phần giữa và phần gốc lá bắt đầu xuất hiện các nốt và chồi trong khi phần ngọn lá vẫn chưa xuất hiện chồi. Trên cả ba loại mẫu cấy đều xuất hiện rất nhiều chồi sau ngày thứ 10 (Hình 5).



Hình 5. Các phân đoạn của mẫu cấy lá trên môi trường MS½ có bổ sung BA 1 và IAA 0,2 mg/L theo thời gian: (A) ngọn lá; (B) giữa lá; (C) gốc lá

Tần suất xuất hiện phôi được ghi nhận tại ngày thứ 7 sau khi đặt cấy mô lá trên môi trường cho thấy phần giữa lá luôn có phôi xuất hiện, trong khi phần ngọn lá hiếm khi ghi nhận được hiện tượng này (Bảng 4).

Các chồi phát sinh từ phần giữa lá thường có kích thước nhỏ hơn so với hai phân đoạn còn lại của lá. Ở thời điểm sau 3 tuần nuôi cấy, số lượng chồi tiếp tục gia tăng nhưng vẫn chưa có sự xuất hiện của rễ (Hình 6); số lượng chồi phát sinh từ phân đoạn giữa lá đạt giá trị cao nhất, trọng lượng

tươi cũng cao hơn hẳn so với phần ngọn lá tuy nhiên trọng lượng khô thì không có khác biệt trên cả ba nghiệm thức (Bảng 5).

Bảng 4. Tần suất xuất hiện phôi soma từ các phân đoạn của lá sau 7 ngày trên môi trường MS½ có bổ sung BA 1mg/L và IAA 0,2 mg/L

Nghiệm thức	Tần suất xuất hiện phôi (%)
Phân ngọn lá	7,14 ± 4,61 ^b
Phân giữa lá	100 ± 0,00 ^a
Phân gốc lá	96,43 ± 3,57 ^a

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì sự khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05



Hình 6. Cụm chồi hình thành từ các phân đoạn của lá sau 3 tuần trên môi trường MS½ có bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L: (A) ngọn lá; (B) giữa lá; (C) gốc lá

Bảng 5. Ảnh hưởng của vật liệu nuôi cấy lên sự phát sinh cụm chồi, sau 3 tuần

Nghiệm thức	Số chồi	Trọng lượng tươi (mg)	Trọng lượng khô (mg)
Phân ngọn lá	18,80 ± 1,07 ^b	46,08 ± 0,86 ^b	4,36 ± 0,19 ^a
Phân giữa lá	28,60 ± 2,14 ^a	52,23 ± 1,53 ^a	5,00 ± 0,18 ^a
Phân gốc lá	23,50 ± 2,59 ^{ab}	52,15 ± 2,27 ^{ab}	4,97 ± 0,25 ^a

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì sự khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Nhìn chung, hoạt tính zeatin, IAA và GA₃ ở phân đoạn giữa và gốc lá luôn cao hơn so với ngọn lá, đồng thời trên môi trường MS_{1/2} có bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L cũng luôn cao hơn so với môi trường MS_{1/2}.

Ngược lại, hoạt tính ABA ở phân đoạn giữa và gốc lá luôn thấp hơn so với ngọn lá và trên môi trường MS_{1/2} có bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L rất thấp so với môi trường đối chứng MS_{1/2} (Bảng 6).

Bảng 6. Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh từ các phân đoạn của lá trong quá trình phát sinh phôi soma, sau 7 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức		Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật (µg/l)			
		IAA	Zeatin	ABA	GA ₃
MS _{1/2}	ngọn lá	0,06 ± 0,01 ^d	0,07 ± 0,01 ^d	1,77 ± 0,08 ^a	0,67 ± 0,05 ^d
	giữa lá	0,06 ± 0,01 ^d	0,05 ± 0,02 ^{cd}	1,05 ± 0,11 ^b	1,03 ± 0,02 ^c
	gốc lá	0,09 ± 0,01 ^c	0,10 ± 0,02 ^c	1,14 ± 0,02 ^b	2,74 ± 0,16 ^a
MS _{1/2} có BA 1 và IAA 0,2mg/L	ngọn lá	0,09 ± 0,01 ^{bc}	0,10 ± 0,01 ^{bc}	0,69 ± 0,05 ^c	0,60 ± 0,01 ^d
	giữa lá	0,12 ± 0,00 ^{ab}	0,15 ± 0,01 ^a	0,37 ± 0,02 ^d	1,00 ± 0,02 ^c
	gốc lá	0,13 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^{ab}	0,34 ± 0,08 ^d	2,19 ± 0,11 ^b

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì sự khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Trên môi trường MS_{1/2} có bổ sung BA 1 mg/L kết hợp với các loại auxin khác nhau, mô lá có biểu hiện đáp ứng với môi trường ngay sau 3 ngày nuôi cấy, sau 5 ngày tế bào mô sẹo được hình thành có thể quan sát dưới kính hiển vi soi nổi; đến ngày thứ 7 trên môi trường MS_{1/2} có bổ sung BA 1 mg/L kết hợp IAA 0,1 mg/L hay IAA 0,2 mg/L hay NAA 0,1 mg/L có thể ghi nhận được sự xuất hiện của phôi hình cầu. Sự hình thành phôi soma ở thực vật chịu ảnh hưởng bởi các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, trong đó auxin đóng vai trò quan trọng trong quá trình khử phân hóa và tế bào đi vào trạng thái có khả năng sinh phôi, ngay cả trường hợp mô cấy không còn là mô non hay chưa trưởng thành [6]. Sự hiện diện của auxin riêng lẻ hay kết hợp với cytokinin là cần thiết cho sự thành lập các tế bào hay nhóm tế bào có khả năng sinh phôi, tuy nhiên auxin với nồng độ cao sẽ cản sự phát triển các giai đoạn tiếp theo của phôi soma. Trong giai đoạn phát triển, auxin ngoại bào là không cần thiết, đôi khi chính sự hiện diện của auxin ngoại bào còn ngăn cản sự di chuyển hữu cực của auxin nội bào dẫn đến sự ức chế sinh phôi [7]. Trong thí nghiệm này, khi sử dụng BA kết hợp với IAA hay NAA

với các nồng độ khác nhau đã ảnh hưởng không giống nhau đến sự phát sinh phôi soma (Bảng 1). Các công bố của Jha và cộng sự [8], Trần Thị Tuyết Nhung và cộng sự [9] cho thấy các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được sử dụng ở các nồng độ khác nhau là một trong những yếu tố xác định sự hình thành mô sẹo và phát sinh phôi soma sau đó ở cây *Jatropha curcashay Pseuderanthemum palatiferum*. Trong nghiên cứu này, trên môi trường có bổ sung BA 1 mg/L kết hợp với IAA 0,1 mg/L hay IAA 0,2 mg/L đều cho tỷ lệ phát sinh phôi 100 %, trong khi tăng hàm lượng IAA tăng lên 0,4 mg/L thì không có sự phát sinh phôi. Theo quá trình phát sinh phôi cần có auxin để cảm ứng một số quá trình, tuy nhiên hàm lượng auxin cao sẽ kích thích tế bào phân chia mạnh để tạo khối mô sẹo hơn là hướng các tế bào đi vào con đường biệt hóa sinh phôi soma [6]. Ngược lại, khi thay thế IAA bằng NAA, tỷ lệ phôi soma hình thành bị giảm ngay, ngay cả NAA ở nồng độ 0,1 mg/L và khi tiếp tục tăng nồng độ NAA lên 0,2 hay 0,4 mg/L thì cũng không ghi nhận được sự tạo phôi (Bảng 1). Kết quả thí nghiệm trên cây Bạch hoa xà thiệt thảo này một lần nữa cho thấy vai trò của loại

và lượng auxin tác động trên quá trình sinh phôi soma, góp phần kiểm chứng các luận điểm về ảnh hưởng của hormone thực vật trong quá trình sinh phôi đã công bố trước đó.

Những mẫu cây trên hai môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1 mg/L kết hợp với IAA 0,1 mg/L hay IAA 0,2 mg/L có cường độ hô hấp đạt giá trị cao trong giai đoạn phát sinh phôi soma. Quá trình hình thành và phát triển phôi soma trải qua các bước phân chia và phân hóa tế bào rất cần năng lượng ATP, nên biểu hiện gia tăng hô hấp là phù hợp (Bảng 3). Ngoài ra, nhiều công bố cũng cho thấy không chỉ hormone thực vật tác động trực tiếp quá trình phát sinh phôi soma mà các yếu tố khác như tuổi sinh lý, trạng thái mô cây, ... cũng có những ảnh hưởng không nhỏ đến các quá trình phát sinh đặc biệt là quá trình phát sinh phôi soma. Khi khảo sát các phân đoạn khác nhau trên cùng một lá được đặt lên cùng một môi trường cảm ứng tạo phôi soma (MS $\frac{1}{2}$ có BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L) chúng tôi đã ghi nhận được sự khác biệt về số lượng phôi soma phát sinh (Bảng 5). Sự phân hóa tế bào là bước đầu tiên để tế bào tiếp tục tiến tới các bước phân hóa mới, quá trình này không chỉ phụ thuộc vào loại và nồng độ các chất điều hòa tăng trưởng thực vật mà còn phụ thuộc vào khả năng đáp ứng của mô cây. Thực tế cho thấy, sự xuất hiện của các nốt và chồi xảy ra sớm nhất ở mẫu cây phần giữa của lá và tần suất xuất hiện phôi soma cao ở phần giữa và gốc lá (trong khi phần ngọn lá tần suất này rất thấp), như thể mầm mô từ phần giữa và gốc lá đã đáp ứng rất tốt với môi trường để phát sinh và phát triển phôi trong nghiên cứu này.

Ở thực vật, phôi soma có thể được hình thành trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua giai đoạn hình thành mô sẹo, phôi soma có thể có nguồn gốc từ một tế bào hay cụm tế bào. Phôi được hình thành từ tế bào biểu bì thì có nguồn gốc một tế bào và nếu từ tế bào dưới biểu bì thì có nguồn gốc từ cụm tế bào [8]. Ngoài ra, có quan điểm cho rằng phôi phát sinh từ 1 tế bào có thể thấy được giai đoạn

phân chia của tế bào đầu tiên, phôi có thể kết nối với mô mẹ ban đầu thông qua dây treo, trong khi phôi phát sinh từ cụm tế bào ban đầu sẽ được quan sát như một chỗ lồi lên từ mô mẹ và thường trộn vào với mô mẹ [9]. Với kết quả giải phẫu qua gân chính của lá sau 3 ngày nuôi cấy, chúng tôi ghi nhận được sự phân chia của cả tế bào biểu bì và tế bào dưới biểu bì và ở ngày thứ 5 có sự phân chia tạo mô sẹo (Hình 3), tiếp sau đó phôi soma hình thành trải qua các bước tạo phôi hình cầu, phôi tim, phôi cá đuối và sự hiện diện cực chồi, cực rễ (Hình 4). Do vậy, có thể nói sự phát sinh phôi soma ở đây đã được cảm ứng từ các tế bào mô sẹo có nguồn gốc từ tế bào nhu mô dưới biểu bì, trải qua quá trình tương tự sự phát sinh phôi hợp tử tự nhiên phôi không có giai đoạn phôi lá mầm mà đi vào giai đoạn hình thành mô phân sinh và phát triển thành chồi hoàn chỉnh sau đó.

Hàm lượng hormone thực vật có sự thay đổi rõ đối với mẫu cây phát sinh phôi so với mẫu cây đặt trên môi trường đối chứng MS $\frac{1}{2}$. Kết quả sinh trắc nghiệm ở ngày thứ 7 (tương ứng giai đoạn phôi hình cầu hình thành trên mẫu cây) cho thấy hàm lượng IAA tăng trên phần giữa và phần cuối của lá so với mẫu đặt trên môi trường đối chứng MS $\frac{1}{2}$. Rõ ràng lượng auxin trong các mẫu cây tăng lên đáp ứng cho sự phân phân hóa kích thích mạnh sự phân chia tế bào, phát sinh và phân cực của phôi soma. Bên cạnh đó, lượng cytokinin cũng tăng lên đối với phần lá ghi nhận có phôi hình cầu xuất hiện; vì quá trình phát sinh phôi soma, tế bào cần được phân chia mà không bị kiểm hãm bởi những tế bào xung quanh cho thấy cytokinin đóng vai trò quan trọng ở giai đoạn này. Cytokinin có tác động mạnh nhất ở giai đoạn xảy ra sự phân chia tế bào tích cực để hình thành phôi hình cầu [10].

Trên cùng điều kiện môi trường nuôi cấy MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1mg/L kết hợp với IAA 0,2mg/L lượng chồi trên phần giữa và phần gốc lá rất khác biệt, hai phần này tạo được nhiều chồi và trọng lượng tươi của cụm chồi cũng cao hơn so với phần ngọn lá mặc dù trọng lượng khô của cụm

chồi lại không có khác biệt nhiều giữa ba vị trí khác nhau trên cùng một lá (Bảng 5). Các tế bào ở phần giữa và gốc lá dường như đáp ứng với môi trường nuôi cấy dễ dàng hơn so với phần ngọn lá trong quá trình tạo chồi; hoặc có thể do mật độ hay cấu trúc tế bào của các vùng lá khác nhau cũng ảnh hưởng đến tần xuất tạo phôi soma cũng như phát triển hình thành chồi; vấn đề này nhóm tác giả sẽ tiếp tục tìm hiểu trong tương lai.

KẾT LUẬN

Mô lá cây Bạch hoa xà thiệt thảo *in vitro* phát sinh phôi soma với tần suất rất cao trên môi trường MS½ có bổ sung BA 1mg/L kết hợp với IAA 0,1 hay 0,2 mg/L. Phôi soma phát sinh đã trải qua các giai đoạn phát triển tương tự như phôi hữu tính: phôi hình cầu, hình tim, hình cá đuôi và phôi

trưởng thành. Đặc biệt, số lượng phôi soma xuất hiện từ các phân đoạn của lá cũng khác nhau: phần giữa và phần gốc lá có số phôi phát sinh cao hơn so với ngọn lá. Hàm lượng IAA, Zeatin nội sinh tăng cao ở ngày thứ 7 trong sự phát sinh phôi soma, cường độ hô hấp của cụm chồi ở ngày thứ 10 trên môi trường MS½ có BA 1 và IAA 0,1 mg/L là cao nhất.

Kiểu phát sinh phôi soma trên cây Bạch hoa xà thiệt thảo *in vitro* này có thể là mô hình nhân giống nhằm tạo nguồn nguyên liệu sạch cung cấp cho ngành dược liệu. Ngoài ra, khi kết hợp khảo sát tác động của chất lượng tia sáng thông qua sử dụng ánh sáng đơn sắc (LED) có thể định hướng cho việc thu nhận hợp chất thứ cấp hiệu quả hơn đối với loại dược liệu này trong tương lai.

Somatic embryogenesis in the leaf tissue of *Hedyotis diffusa* Willd.

- **Nguyen Thi Kim Anh**
- **Hoang Thi Thu Tham**
- **Phan Ngo Hoang**

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Hedyotis diffusa is a valuable medicinal herb belong to the Rubiaceae family. It is widely used in the treatment of various types of cancer and other diseases related to leukemia. Besides, the plant usually contains triterpenoids (oleanolic acid, ursolic acid) and flavonoids which have a range of pharmacological activities of anti-inflammatory, antibacterial, hypoglycemic, anti-free radicals, reducing blood lipids and anti-cancer. Leaf segments of 3 weeks old *H. diffusa* were cultured on half strength Murashige and Skoog (½MS) medium supplemented with different concentrations of indole acetic acid (IAA; 0.1, 0.2 and 0.4 mg/L) or α -naphthalene acetic acid (NAA; 0.1, 0.2 and 0.4 mg/L) and benzyladenine (BA) at

a concentration of 1mg/L. In this study, the highest percentage of somatic embryogenesis was obtained using 0.1 mg/L IAA and 1 mg/L BA, and 0.2 mg/L IAA and 1 mg/L BA. The somatic embryos develop through a series of morphological stages: globular type, heart, torpedo and mature embryos. Besides, the highest number of shoots per explant was achieved in the same media. The middle and the distal end segments were found the most suitable for somatic embryogenesis. Morphological changes and the role of endogenous hormones in somatic embryo formation were analyzed. The position of the leaf segments of the same leaf, respiration rate, and endogenous hormone and somatic embryo formation were also discussed.

Keywords: *Hedyotis diffusa* Willd., phytohormones, respiration rate, somatic embryogenesis

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C. Soica, C. Oprean, F. Borcan, C. Danciu, C. Trandafirescu, D. Coricovac, M. Munteanu, The synergistic biologic activity of oleanolic and ursolic acid in complex with hydroxypropyl- γ -cyclodextrin, *Molecules*, 19, 4, 4924–4940 (2014).
- [2]. Đỗ Tất Lợi, Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, Hà Nội, 250–251 (2004).
- [3]. Phạm Hoàng Hộ, Cây cỏ Việt Nam. NXB Trẻ: 105–123 (2003).
- [4]. T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology*, 15, 473–497 (1962).
- [5]. T. Yokota, N. Murofushi, N. Takahashi, Extraction, purification, and identification, hormonal regulation of development. Molecular aspects of plant hormones, Edited by J. MacMilan – *Encyclopedia of plant physiology*, New series, Springer New York, 9, 113–201 (1980).
- [6]. K. Nomura, A. Komamine, Physiological and morphological aspects of somatic embryogenesis. *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*, 115–131 (1999).
- [7]. K. Mashayekhi-Nezamabadi, The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryos development. *Dr. Sci. Thesis. Justus Liebig University*, Giessen, 4–8 (1999).
- [8]. B.T. Jha, P. Mukherjee, M.M. Datta, Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn, An important biofuel plant, *Plant Biotechnology Reports*, 1, 3, 135–140 (2007).
- [9]. Trần Thị Tuyết Nhung, Phan Ngô Hoàng, Nguyễn Du Sanh, sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo lá cây Hoàn ngọc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Ness) Radlk), *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ ĐHQG-HCM*, 17, 2, 100–107 (2014).
- [10]. K. Mashayekhi-Nezamabadi, The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development. *Dr. Sci. Thesis. Justus Liebig University*, Giessen: 11–22 (2000).