

# Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng thực vật, môi trường khoáng và pH lên sự hình thành mô sẹo từ lát cắt thân non cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.)

Phạm Thị Mỹ Trâm<sup>1,2,\*</sup>, Ngô Kế Sương<sup>3</sup>, Lê Thị Thuỷ Tiên<sup>2</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## TÓM TẮT

Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.) thuộc họ Boraginaceae, là cây dược liệu quý, được dân tộc Mường ở tỉnh Hoà Bình gọi là cây "ung thư". Xạ đen đã được chứng minh có hoạt tính ức chế sự phát triển của khối u ác tính, chống oxy hoá, tăng cường sức đề kháng của cơ thể người... Nghiên cứu này tập trung vào việc khảo sát sự tạo mô sẹo xốp từ lát cắt thân cây Xạ đen có khả năng làm nguyên liệu nuôi cấy huyền phù tế bào để thu nhận hợp chất có hoạt tính sinh học. Các yếu tố khảo sát bao gồm chất điều hoà sinh trưởng thực vật, môi trường khoáng và độ pH. Kết quả cho thấy tất cả các nghiệm thức khảo sát đều kích thích sự hình thành mô sẹo từ lát cắt (0,5–1,0 mm) thân non Xạ đen. Trong đó, mẫu cấy trên môi trường B5 có pH 5,8 bổ sung 2,4-D 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L hình thành mô sẹo thứ cấp có dạng xốp với tỉ lệ cao nhất (85%) và mô sẹo tăng sinh tốt nhất với khối lượng tươi sau 4 tuần nuôi cấy đạt 0,054 g. Nhằm đánh giá sự hiện diện của các hợp chất tự nhiên trong mô sẹo và so sánh với cây ngoài tự nhiên, dịch chiết ethanol từ lá, cành khô và mô sẹo tươi cây xạ đen được sử dụng để phân tích định tính. Kết quả cho thấy có sự hiện diện của các nhóm hợp chất trong mô sẹo như acid hữu cơ, phenolic, tannin, alkaloid và flavonoid giống như trong thân và lá cây này 2 năm tuổi trồng trong vườn thực nghiệm.

**Từ khoá:** *Ehretia asperula* Zoll. et Mor., lát cắt thân non, mô sẹo xốp, cây Xạ đen, hợp chất hữu cơ

<sup>1</sup>Trường Đại học Thủ Dầu Một, Bình Dương

<sup>2</sup>Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM, Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Sinh học Nhiệt đới Tp. HCM

## Liên hệ

**Phạm Thị Mỹ Trâm**, Trường Đại học Thủ Dầu Một, Bình Dương

Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: tramppm@tdmu.edu.vn

## Lịch sử

- Ngày nhận: 05-6-2019
- Ngày chấp nhận: 16-01-2020
- Ngày đăng: 06-6-2020

DOI:10.32508/stdjns.v4i2.763



## Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



## MỞ ĐẦU

*Ehretia asperula* Zoll. et Mor. thuộc họ Boraginaceae, được gọi là cây Xạ đen, thường mọc hoang trên các vùng núi cao. Do có giá trị dược liệu cao nên gần đây cây Xạ đen đã bắt đầu được trồng ở các tỉnh Sơn La, Hòa Bình, Hà Nam và Quảng Bình<sup>1</sup>.

Theo y học cổ truyền, Xạ đen có vị thơm mát, là vị thuốc đa công dụng. Cây có tác dụng hữu hiệu trong điều trị mụn nhọt, tiêu ung thũng, tiêu viêm, giải độc, giảm tiết dịch, tăng cường sức đề kháng của cơ thể<sup>2</sup>. Năm 1997, Kuo và Kuo<sup>3</sup> cho biết dịch chiết cồn từ vỏ cây Xạ đen có thể ức chế sự phân chia của tế bào ung thư gan (Hepatocellular carcinoma, hep G2), ung thư mũi (nasopharynx carcinoma), ung thư ruột kết (colon carcinoma) và kháng virus HIV H-9. Năm 1999, Lê Thế Trung và cộng sự<sup>4</sup> đã phát hiện 4 loại hợp chất chính ở cây Xạ đen là flavonoid, quinone, saponin triterpenoid và pyrocatechin có tác dụng hạn chế sự phát triển của u ác tính. Nhiều hợp chất từ cây Xạ đen cũng ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn gây bệnh, điển hình là *Staphylococcus aureus*<sup>5</sup>. Với những giá trị về y học như trên nên hiện nay, cây Xạ đen được sử dụng nhiều trong việc hỗ trợ điều trị ung thư và vì vậy việc thu nhận hợp chất có hoạt tính sinh

học từ cây Xạ đen rất cần thiết.

Nhằm bảo tồn giống cây quý cũng như tạo nguồn nguyên liệu cho ngành dược, cây Xạ đen đã được nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp *in vitro*<sup>6-9</sup>, phương pháp gieo hạt và giâm hom<sup>10</sup>.

Việc tạo sinh khối thực vật *in vitro* có chứa các chất có hoạt tính sinh học cao hơn so với cây trồng ngoài tự nhiên đã được chứng minh ở *Panax ginseng*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Coleus blumei*...<sup>11</sup>. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của auxin, cytokinin, môi trường khoáng và pH môi trường lên sự tạo mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen, bước đầu tạo nguyên liệu cho sự nuôi cấy tế bào trong môi trường lỏng để thu sinh khối có chứa các hoạt chất có giá trị trong y học.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Khúc cắt thân non của cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.) 2 năm tuổi trồng trong vườn, được cung cấp bởi Vườn ươm Bắc Bộ, thôn Đồng Hội, xã Đại Đình, huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc.

### Phương pháp

**Trích dẫn bài báo này:** Trâm P T M, Sương N K, Tiên L T T. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng thực vật, môi trường khoáng và pH lên sự hình thành mô sẹo từ lát cắt thân non cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.). *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(2):458-467.

### Chuẩn bị mẫu cấy

Khúc cắt thân non 1 tuần tuổi, có màu xanh nhạt, từ cây Xạ đen được khử trùng lần lượt 1 phút trong ethanol 70<sup>0</sup> và 10 phút trong dung dịch javel 20%. Rửa mẫu sạch bằng nước cất vô trùng (5 lần). Mẫu cấy là các lát cắt ngang thân non ở vị trí từ lá số 2 đến lá số 6 tính từ ngọn, không mang chồi bên. Độ dày lát cắt 0,5–1,0 mm.

### Tạo mô sẹo Xạ đen

Môi trường tạo sẹo là môi trường MS<sup>12</sup> hoặc B5<sup>13</sup>, bổ sung inositol 100 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 7,5 g/L và các chất điều hoà sinh trưởng thực vật (chất ĐHSTTV) cần khảo sát. Quá trình tạo mô sẹo được tiến hành trong tối, ở nhiệt độ 25 ± 2<sup>0</sup>C, độ ẩm 70 ± 2%.

### Khảo sát ảnh hưởng của naphthalene acetic acid (NAA) lên sự hình thành mô sẹo

Lát cắt thân non Xạ đen được đặt trên môi trường MS bổ sung NAA với nồng độ lần lượt là 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 và 3,5 mg/L.

### Khảo sát ảnh hưởng của kinetin (KIN) kết hợp với NAA lên sự hình thành mô sẹo

Lát cắt thân non Xạ đen được đặt trên môi trường MS bổ sung KIN 0,1 mg/L kết hợp với NAA với nồng độ lần lượt là 3,5; 4,0; 4,5 và 5,0 mg/L.

### Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) kết hợp với NAA hoặc benzyl adenine (BA) lên sự hình thành mô sẹo

Lát cắt thân non cây Xạ đen được đặt trên môi trường MS bổ sung chất ĐHSTTV theo Bảng 1.

**Bảng 1: Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên sự tạo mô sẹo<sup>8,14,15</sup>**

Chất ĐHSTTV	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	BA (mg/L)
Nghiệm thức			
1	0,4	0	0,1
2	1,0	0	0
3	1,5	1,0	0

### Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng với pH khác nhau lên sự hình thành mô sẹo

Lát cắt thân non cây Xạ đen được nuôi cấy trên môi trường MS và B5 ở 2 điều kiện pH 5,3 và 5,8 với nồng

độ chất điều hoà sinh trưởng tốt nhất ở thí nghiệm trước.

### Xác định sự hiện diện của một số nhóm hợp chất tự nhiên

Chuẩn bị dịch chiết từ bột lá khô (các lá từ vị trí số 7 tính từ ngọn đến hết các lá trên cành), cành khô và mô sẹo tươi Xạ đen 5 tuần tuổi, mỗi loại 5 g, được ngâm chiết 3 lần, mỗi lần với 30 mL dung môi ethanol 96<sup>0</sup>. Lọc, thu dịch và cô đến thể tích còn 50 mL. Dịch chiết đã cô đặc được dùng để định tính acid hữu cơ, phenolic và tannin, alkaloid và flavonoid. Phương pháp định tính được trình bày ở Bảng 2.

### C chỉ tiêu theo dõi sự hình thành mô sẹo

Kết quả được ghi nhận mỗi tuần và liên tục trong 5 tuần. Chỉ tiêu theo dõi gồm ngày xuất hiện mô sẹo, hình thái mô sẹo, số lượng mẫu cấy tạo mô sẹo xộp và khối lượng tươi mô sẹo.

Tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo xộp X (%) được xác định theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{a}{A} \times 100$$

Trong đó: X: Tỉ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo xộp (%)

a: Số mẫu hình thành mô sẹo xộp

A: Số mẫu cấy ban đầu

### Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV, sự khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p \leq 0,05$ .

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của NAA lên sự hình thành mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen

Auxin và cytokinin có vai trò quan trọng trong cảm ứng phân chia tế bào vô trật tự để hình thành các khối sẹo<sup>18</sup>. Khối sẹo cứng hay xộp phụ thuộc rất nhiều vào loại chất điều hoà sinh trưởng, riêng lẻ hay kết hợp cũng như hàm lượng sử dụng. Nguyên liệu thích hợp cho nuôi cấy huyền phù tế bào là những khối mô sẹo gồm các tế bào rời nhau, dễ phân tán và tăng sinh trong môi trường lỏng<sup>19</sup>.

Trong thí nghiệm này, lát cắt thân non cây Xạ đen được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung NAA với nồng độ thay đổi nhằm cảm ứng sự hình thành mô sẹo. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả được ghi nhận ở Bảng 3.

Ở ngày thứ tư của quá trình nuôi cấy, sự xuất hiện những cụm nhỏ tế bào ở vị trí vết thương (trừ nghiệm thức đối chứng) được ghi nhận. Sau 2 tuần, các mô

**Bảng 2: Phản ứng định tính nhóm hợp chất tự nhiên<sup>16,17</sup>**

Nhóm chất	Phản ứng hóa học	Quan sát phản ứng xảy ra
Acid hữu cơ	2 mL dịch chiết + một ít tinh thể Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dung dịch sủi bọt khí
Phenolic và tannin	2 mL dịch chiết + 2 mL H <sub>2</sub> O + vài giọt FeCl <sub>3</sub> (1%)	Dung dịch chuyển sang màu xanh đậm
Alkaloid	2 mL dịch chiết + 3-4 giọt thuốc thử Bouchardat	Dung dịch kết tủa màu đỏ nâu
Flavonoid	1 mL dịch chiết + 1 mL Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (10%)	Dung dịch chuyển sang màu vàng

**Bảng 3: Ảnh hưởng của NAA lên sự hình thành mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy**

NAA (mg/L)	Tỉ lệ mẫu cấy tạo sẹo (%)	Tỉ lệ mẫu cấy tạo sẹo thứ cấp xấp (%)	Khối lượng tươi mô sẹo (g)	Hình thái mô sẹo
Đối chứng	0	0	0	-
1,0	60	0	0,010 ± 0,003 <sup>a</sup>	Cứng, trắng trong
1,5	75	0	0,019 ± 0,007 <sup>ab</sup>	Cứng, trắng đục
2,0	60	0	0,013 ± 0,005 <sup>a</sup>	Cứng, trắng đục
2,5	100	0	0,027 ± 0,008 <sup>bc</sup>	Cứng, trắng đục
3,0	100	41	0,026 ± 0,005 <sup>bc</sup>	Phần lớn là mô sẹo cứng, trắng trong, một vài chỗ trên mẫu cấy xuất hiện mô sẹo xốp
3,5	100	41	0,035 ± 0,006 <sup>d</sup>	Phần lớn là mô sẹo cứng, trắng trong, một vài chỗ trên mẫu cấy xuất hiện mô sẹo xốp

\*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với  $p \leq 0,05$ .

sẹo sơ cấp màu trắng đục hoặc trắng trong xuất hiện nhiều hơn và sau 4 tuần thì có sự hình thành mô sẹo thứ cấp. Ở môi trường nuôi cấy có NAA nồng độ từ 1,0 đến 2,5 mg/L, mô sẹo thứ cấp cứng, màu trắng đục hoặc trắng trong. Trên môi trường có NAA 3,0 mg/L hay NAA 3,5 mg/L, mô sẹo thứ cấp có dạng mềm và xốp hơn với tỷ lệ 41% (Hình 1). Như vậy, hình thái và tỉ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo cũng như mô sẹo xốp khác nhau tùy thuộc vào nồng độ NAA sử dụng. Nhìn chung, mô sẹo có dạng cứng khi hình thành trên môi trường có NAA. Một vài nghiên cứu trước cũng ghi nhận sự hình thành mô sẹo cứng trên môi trường có NAA như trường hợp cây sâm nam *Cyclea peltata* Lam. khi mẫu thân được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung NAA với nồng độ lần lượt 0,1; 0,5; 1; 2 và 3 mg/L (Bhagya và Chandrashekar, 2013)<sup>20</sup>.

### Ảnh hưởng của KIN kết hợp với NAA lên sự hình thành mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen

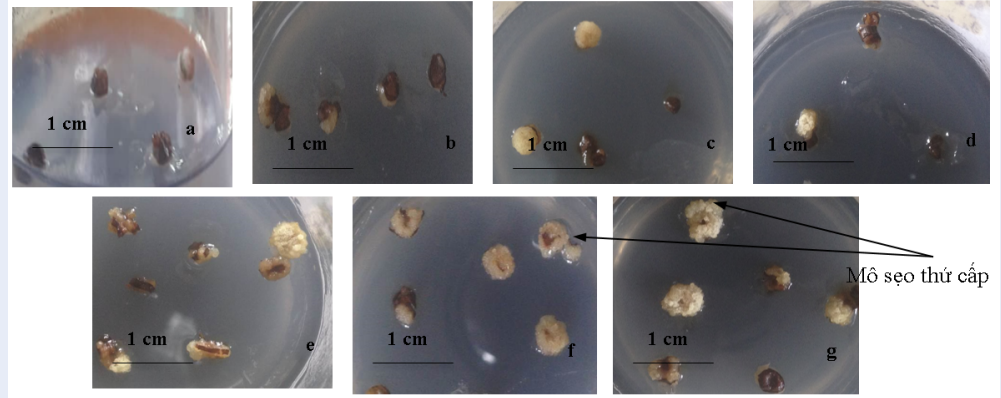
Sự tạo mô sẹo chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, bao gồm độ tuổi, tình trạng sinh lý của mẫu cấy cũng như loại và nồng độ auxin và cytokinin sử dụng. Sự cân bằng giữa auxin và cytokinin cần thiết cho sự hình thành và phát triển của mô sẹo. Auxin được sử dụng để cảm ứng tạo sẹo ở nhiều loài thực vật. Cytokinin

chỉ kích thích sự phân chia nhân và tế bào chất khi có sự phối hợp với auxin. Vì thế, sự kết hợp giữa auxin với cytokinin là điều kiện cần thiết để cảm ứng tạo sẹo ở đa số loài thực vật thuộc nhóm song tử diệp<sup>21</sup>.

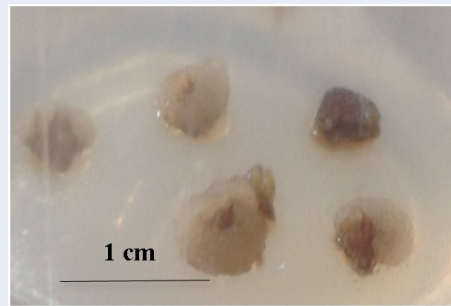
Trong một số nghiên cứu, KIN được ưu tiên sử dụng để cảm ứng mô sẹo xốp. Vì vậy, trong thí nghiệm này KIN 0,1 mg/L được sử dụng phối hợp với NAA có nồng độ từ 3,5 đến 5 mg/L để kích thích tạo mô sẹo xốp từ lát cắt thân non Xạ đen. Ở ngày thứ 5 của quá trình nuôi cấy, mô sẹo bắt đầu hình thành trên bề mặt lát cắt ở một số mẫu cấy và sau 2 tuần, mô sẹo đã phát triển khắp bề mặt mẫu cấy ở các nghiệm thức khảo sát (tỉ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo đạt 100%), tuy nhiên mô sẹo cứng, màu trắng sữa (Hình 2). Đến tuần thứ tư, mô sẹo thứ cấp hình thành, có màu vàng nhạt và cứng được ghi nhận ở tất cả các mẫu cấy.

Như vậy, việc kết hợp KIN với NAA với các nồng độ khảo sát có khả năng thúc đẩy nhanh sự hình thành mô sẹo nhưng lại không hỗ trợ sự tạo mô sẹo xốp từ thân non Xạ đen.

Tương tự, theo Bhagya và Chandrashekar (2013), mẫu cấy từ khúc cắt thân non cây Sâm nam *Cyclea peltata* Lam. trên môi trường MS bổ sung NAA (0,1; 0,5; 1; 2; 3 mg/L) kết hợp với KIN (0,1; 0,5; 1; 2; 3 mg/L) đều hình thành mô sẹo cứng. Sự cảm ứng hình thành mô sẹo và đặc điểm hình thái mô sẹo có



**Hình 1:** Mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung: (a) NAA 0 mg/L (đối chứng); (b) NAA 1,0 mg/L; (c) NAA 1,5 mg/L; (d) NAA 2,0 mg/L; (e) NAA 2,5 mg/L; (f) NAA 3,0 mg/L; (g) NAA 3,5 mg/L



**Hình 2:** Mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung NAA 5,0 mg/L và KIN 0,1 mg/L

thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như điều kiện môi trường, kiểu gene của mẫu cấy, điều kiện nuôi cấy, loại và nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng thực vật<sup>20</sup>.

### **Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với NAA hoặc BA lên sự hình thành mô sẹo**

Sự phối hợp giữa 2,4-D với BA và NAA được thực hiện để cảm ứng sự tạo mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen. Kết quả về sự tạo mô sẹo được ghi nhận ở Bảng 4.

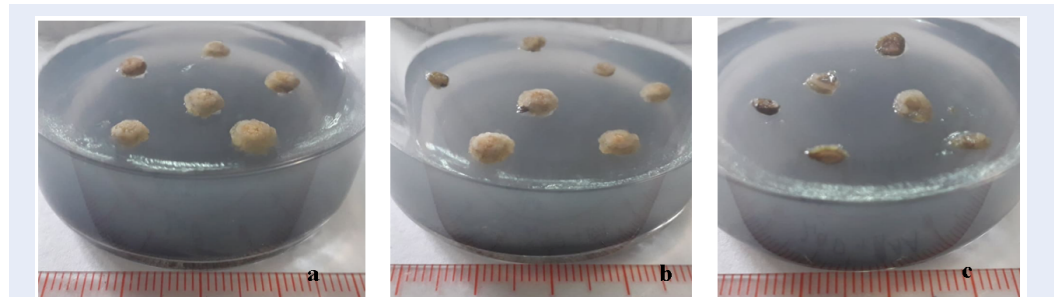
Sau 4 ngày nuôi cấy, mô sẹo bắt đầu xuất hiện trên bề mặt mẫu cấy ở tất cả các nghiệm thức khảo sát. Sau 7 ngày, mô sẹo đã phát triển khắp mẫu cấy (Hình 3). Sau 4 tuần nuôi cấy, mô sẹo thứ cấp phát triển, xốp, mọng nước, màu trắng đục hoặc trắng xanh. Trong đó, mô sẹo trên môi trường chứa 2,4-D 0,4 mg/L kết hợp với BA 0,1 mg/L có khối lượng cao nhất sau 2 tuần và 4 tuần nuôi cấy, tương ứng là 0,027 g và 0,049 g (Bảng 4).

Việc sử dụng chất điều hoà sinh trưởng thực vật phù hợp có ảnh hưởng rất quan trọng đến sự phân chia tế bào của mô hoặc cơ quan thực vật ở điều kiện *in vitro*. Việc bổ sung auxin vào môi trường nuôi cấy là hoàn toàn cần thiết<sup>21</sup>. Auxin là nhóm chất có khả năng thay đổi cơ bản chương trình di truyền sinh lý sẵn có của toàn bộ mô thực vật. Tế bào phản ứng với auxin sẽ trở lại trạng thái chưa biệt hóa và bắt đầu phân chia. 2,4-D là auxin được sử dụng nhiều nhất để cảm ứng sự hình thành mô sẹo. Để tạo mô sẹo từ mẫu cấy cây lá rộng, 2,4-D ở nồng độ từ 5-15  $\mu\text{M}$  thường được sử dụng<sup>22</sup>. Mặc dù 2,4-D có thể thúc đẩy sự phát triển của mô sẹo ở nồng độ cao, nhưng nó cũng có thể ức chế quá trình này<sup>23</sup> khi nồng độ cao hơn mức cần thiết. Sự kết hợp của các chất điều hoà sinh trưởng cũng có thể thành công trong việc tạo mô sẹo xốp ở nhiều loài thực vật bậc cao<sup>18</sup>. Do đó, một số trường hợp, cytokinin được thêm vào môi trường nuôi cấy để phối hợp với auxin trong quá trình kích thích sự hình thành và tăng sinh mô sẹo. Cytokinin tác động mạnh sau auxin lên sự tăng trưởng và phân chia tế bào<sup>21</sup>. Theo nghiên cứu của Zeng và cộng sự (2009)<sup>24</sup>, mô sẹo hình thành từ mẫu cấy lá của cây Nhót đắng (*Elaeagnus angustifolia* L.) trên môi trường MS có 2,4-D 1,0 mg/L và BA 0,5 mg/L tốt hơn so với mẫu cấy trên môi trường có NAA hay TDZ kết hợp với BA, tỉ lệ tạo sẹo đạt 98% và mô sẹo có màu trắng, xốp. Tương tự như vậy, Anusha và cộng sự (2016)<sup>14</sup> cũng cho thấy hình thái mô sẹo từ lá cây Săng máu (*Celastrus paniculatus*) khác biệt rõ rệt khi sử dụng 2,4-D (0,5–2,5 mg/L) riêng rẽ hoặc 2,4-D 1,5 mg/L kết hợp với NAA (0,5–2,5 mg/L). Trong đó, môi trường được bổ sung 2,4-D 1,5 mg/L kết hợp với NAA 1,0 mg/L cảm ứng tạo mô sẹo màu kem, xốp, với tỉ lệ tạo mô sẹo đạt 96,42%.

**Bảng 4:** Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với NAA hay BA lên sự hình thành mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Chất ĐHSTTV (mg/L)	Tỉ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo (%)	Tỉ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo xấp (%)	Khối lượng tươi mô sẹo sau 2 tuần (g)	Khối lượng tươi mô sẹo sau 4 tuần (g)	Hình thái mô sẹo
2,4-D 1,0	-	60	0,026 ± 0,005 <sup>b</sup>	0,042 ± 0,009 <sup>ab*</sup>	Trong, hơi xanh
2,4-D 0,4	BA 0,1	75	0,027 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,049 ± 0,002 <sup>b</sup>	Trắng đục hoặc vàng nhạt
2,4-D 1,5	NAA 1,0	70	0,015 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,01 <sup>a</sup>	Trắng, trong

\*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với  $p \leq 0,05$ .



**Hình 3:** Mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen sau 1 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung: (a) 2,4-D 1,0 mg/L; (b) 2,4-D 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L; (c) 2,4-D 1,5 mg/L và NAA 1,0 mg/L

### Ảnh hưởng của môi trường khoáng và pH lên sự hình thành mô sẹo

Trong nuôi cấy *in vitro*, môi trường khoáng giữ vai trò quan trọng trong việc cảm ứng sự hình thành, tăng sinh và phát sinh hình thái mô sẹo<sup>21</sup>. Mô sẹo xấp được ưu tiên sử dụng để làm nguyên liệu cho quá trình nuôi cấy tế bào trong môi trường lỏng<sup>18</sup>. Ở thí nghiệm này, hai môi trường khoáng MS và B5 bổ sung 2,4-D 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L với pH khác nhau được sử dụng để khảo sát sự hình thành mô sẹo xấp.

Kết quả ở Bảng 5 và Hình 4 cho thấy thành phần khoáng và pH môi trường ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành và tăng sinh mô sẹo cây Xạ đen. Trong thí nghiệm này, mô sẹo sơ cấp bắt đầu hình thành sau 5 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, ở các môi trường có pH 5,3, mẫu cấy ít có sự gia tăng kích thước và tỉ lệ hình thành sẹo thấp. Với pH 5,8, mẫu cấy gia tăng kích thước đáng kể sau 1 tuần nuôi cấy. Sau 4 tuần, các mẫu cấy trên môi trường có pH 5,8 đều có khối lượng tươi cao hơn so với môi trường có pH 5,3. Trong đó, mẫu cấy trên môi trường B5 với pH 5,8 có tỉ lệ tạo sẹo xấp cao nhất (85%) và khối lượng sẹo cũng cao nhất (0,054 g). Mô sẹo phát triển khắp bề mặt mẫu sau 4 tuần nuôi cấy. Mô sẹo có dạng xấp, mọng nước và có

màu trắng đục đến vàng nhạt. Sau 5 tuần, mẫu cấy trên môi trường B5 ở pH 5,8 vẫn phát triển tốt và có màu vàng nhạt (Hình 5). Trong khi đó, mô sẹo ở các nghiệm thức khác xuất hiện màu vàng nâu hoặc nâu đen sau 5 tuần nuôi cấy. Quan sát dưới kính hiển vi, mô sẹo chắc gồm các tế bào dính chặt vào nhau trong khi mô sẹo xấp gồm nhiều tế bào rời rạc (Hình 6).

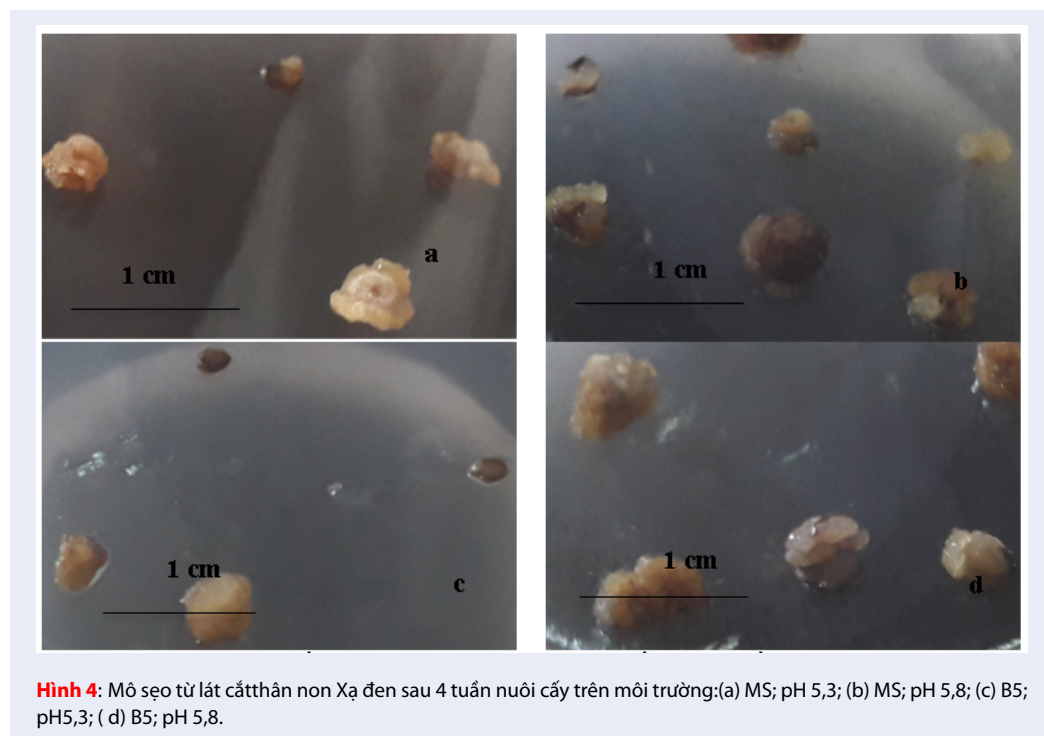
Hình thái mô sẹo chịu ảnh hưởng không những bởi chất điều hoà sinh trưởng thực vật ngoại sinh mà còn chịu ảnh hưởng bởi thành phần và hàm lượng khoáng. Theo Lê Thị Thuỷ Tiên và cộng sự (2006), mô sẹo từ thân non *Taxus wallichiana* Zucc. (thông đỏ Lâm Đồng) phát triển tốt hơn trên môi trường B5 bổ sung 2,4-D 4 mg/L kết hợp với KIN 1 mg/L so với môi trường MS với thành phần và hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng thực vật tương tự<sup>25</sup>.

pH môi trường nuôi cấy là yếu tố rất quan trọng đối với sự hình thành mô sẹo, ảnh hưởng đến sự di chuyển của các ion, hấp thu dưỡng chất (đặc biệt là  $^{+}NH_4$  và  $NO_3^{-}$ )<sup>26</sup> và chất điều hoà sinh trưởng thực vật<sup>18</sup>. Ở pH nhất định, một phần các ion  $H^{+}$  sẽ xâm nhập vào thành tế bào để tạo ra độ pH tối ưu cho hoạt động của các enzyme, có tác động nối lỏng thành tế bào<sup>27</sup>; Ion  $H^{+}$  có thể hoạt hóa enzyme phân hủy liên kết giữa các sợi cellulose làm cho chúng lỏng lẻo và tạo điều kiện cho thành tế bào giãn ra dưới tác dụng của áp

**Bảng 5:** Ảnh hưởng của môi trường khoáng và pH lên sự hình thành mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Môi trường	pH	Tỉ lệ tạo mô sẹo xộp (%)	Khối lượng tươi mô sẹo (g)	Màu sắc mô sẹo
MS	5,3	56	0,017 ± 0,002 <sup>a</sup>	Vàng đậm
	5,8	78	0,044 ± 0,001 <sup>b</sup>	Trắng đục hoặc vàng nhạt
B5	5,3	41	0,01 ± 0,003 <sup>a</sup>	Vàng nâu
	5,8	85	0,054 ± 0,009 <sup>c</sup>	Trắng đục hoặc vàng nhạt

\*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với  $p \leq 0,05$ .



**Hình 4:** Mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường: (a) MS; pH 5,3; (b) MS; pH 5,8; (c) B5; pH 5,3; (d) B5; pH 5,8.



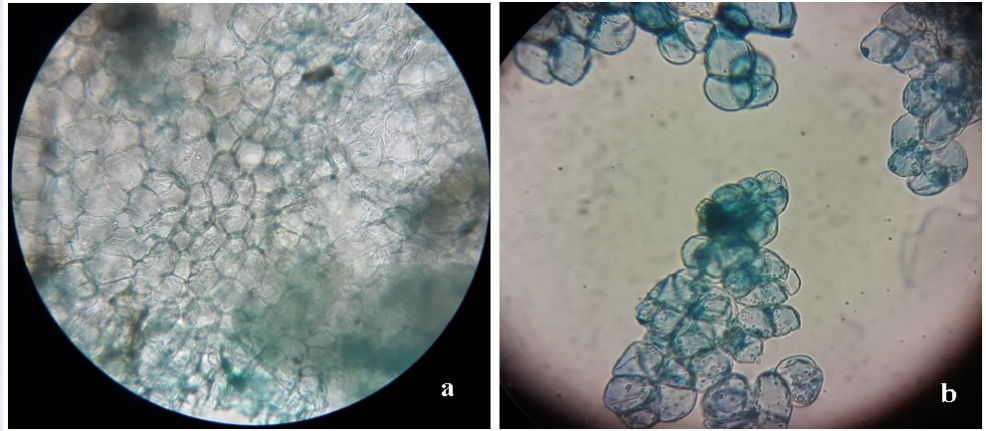
**Hình 5:** Mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường B5, pH 5,8

suất thẩm thấu của không bào trung tâm, kích thích sự tăng trưởng của tế bào<sup>28</sup>. Vì vậy, môi trường và pH thích hợp có thể giúp các tế bào rời nhau và trở nên xộp.

Theo Jayaraman và cộng sự (2014)<sup>18</sup>, mô sẹo từ lá cây Trâm hương (*Aquilaria malaccensis*) trên môi trường MS có pH 5,7 tăng sinh tốt hơn so với các mẫu cấy trên môi trường có pH 5,0; 5,5 và 6,0; mô sẹo xộp xuất hiện nhiều ở môi trường có pH 5,7 có thể là nguyên liệu cho nuôi cấy huyền phù tế bào.

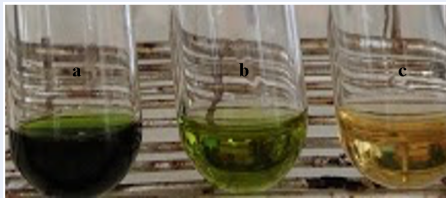
#### **Xác định một số nhóm hợp chất tự nhiên ở lá, cành và mô sẹo Xạ đen**

Thí nghiệm này được thực hiện nhằm xác định sự hiện diện của một số nhóm hợp chất tự nhiên trong dịch chiết EtOH từ mô sẹo xộp 5 tuần tuổi, hình thành từ



**Hình 6:** Tế bào mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen 5 tuần tuổi dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 (a) Mô sẹo cứng; (b) Mô sẹo xốp

lát cắt thân non cây Xạ đen và so sánh với các dịch chiết từ lá và cành cây Xạ đen 2 năm tuổi trồng trong vườn thực nghiệm. Dịch chiết từ lá khô, cành khô và mô sẹo tươi cây Xạ đen (Hình 7) được thu nhận và kết quả định tính các hợp chất tự nhiên được trình bày ở Bảng 6.



**Hình 7:** Dịch chiết EtOH từ lá (a), cành (b) và mô sẹo Xạ đen (c)

Kết quả ở Bảng 6 cho thấy, ở cả 2 dịch chiết (lá và mô sẹo), nhóm hợp chất acid hữu cơ, phenolic và tannin, alkaloid, flavonoid đều có phản ứng dương tính với thuốc thử. Riêng mẫu dịch chiết từ cành không có sự xuất hiện phản ứng dương tính với nhóm chất acid hữu cơ. Điều này có thể là do hàm lượng hợp chất trong dịch chiết thấp hơn ngưỡng phát hiện của thuốc thử trong thử nghiệm.

Năm 2006, Ly và cộng sự<sup>2</sup> cũng đã phân lập được các hợp chất chống oxy hóa từ dịch chiết methanol 50% từ lá Xạ đen khô. Tám hợp chất phenolic được định tính bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao và cấu trúc của chúng đã được xác định bằng phương pháp quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Các hợp chất phenolic đều được chứng minh là có hoạt tính chống oxy hóa.

**Bảng 6:** Thành phần một số nhóm hợp chất tự nhiên trong cây và mô sẹo

Hợp chất	Kết quả		
	Lá khô	Cành khô	Mô sẹo
Acid hữu cơ	+	-	+
Phenolic và tannin	+	+	+
Alkaloid	+	+	+
Flavonoid	+	+	+

\*Ghi chú: (-): không hiện diện; (+): hiện diện

Tương tự, năm 2018, Trần Thị Mỹ Trâm và cộng sự<sup>7</sup> đã ghi nhận dịch chiết methanol từ cây xạ đen *in vitro* cũng có sự hiện diện của nhóm alkaloid, phenolic và tannin.

## KẾT LUẬN

Từ các kết quả trên, chúng tôi rút ra một số kết luận sau: (i) Môi trường B5 với pH 5,8 bổ sung 2,4-D 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L là thích hợp nhất cho sự tạo mô sẹo từ lát cắt thân non cây Xạ đen với tỉ lệ mô sẹo xốp đạt 85%, khối lượng tươi mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy 0,054 g. (ii) Mô sẹo Xạ đen tươi 4 tuần tuổi chứa các hợp chất tự nhiên tương tự như ở lá và cành cây Xạ đen 2 năm tuổi trồng trong vườn thực nghiệm, đó là các acid hữu cơ, phenolic và tannin, alkaloid và flavonoid.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trường ĐH Thủ Dầu Một và Trường ĐH Bách Khoa, Đại học Quốc





23. Behbahani M, Shanehsazzadeh M, Hessami MJ. Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. *Sci Agric (Piracicaba, Braz)*. 2011;68(1):69–76. Available from: [DOI:10.1590/S0103-90162011000100011](https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000100011).
24. Zeng FS, Wang WW, Zhan YG, Xin Y. Establishment of the callus and cell suspension culture of *Elaeagnus angustifolia* for the production of condensed tannins. *African Journal of Biotechnology*. 2009;8(19):5005–5010. Available from: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/90296AA8445>.
25. Tiên LTT, Việt BT, Lượng ND. Tìm hiểu về sự tăng trưởng của dịch treo tế bào *Taxus wallichiana* Zucc. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ ĐHQG, Tp HCM*. 2006;9(5):47–51. Available from: <http://vjol.info.vn/index.php/JSTD/article/download/28973/24711>.
26. Ikeda T, Taji A, Hirai M, Yamashita I, Enomoto S, Noguchi M. Association between water status and sucrose metabolism in cell suspension culture of carrot. *Plant Biotechnology*. 1999;16(5):375–379. Available from: [DOI:10.5511/plantbiotechnology.16.375](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.16.375).
27. Skirvin RM, Chu MC, Mary L, Heather Y, Thomas F. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. *Plant Cell Reports*. 1986;5:292–294. Available from: [DOI:10.1007/BF00269825](https://doi.org/10.1007/BF00269825).
28. Nhật DT, Hà TTT, Hương TT, Cương HV, Huy NP. Nghiên cứu sự hình thành mô sẹo và tế bào đơn cây kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Tạp chí Sinh học*. 2012;34(4):505–514. Available from: <http://vjs.ac.vn/index.php/vjbio/article/download/2690/pdf%28Vietnamese%29>.

# Effects of plant growth regulators, mineral medium and pH values on the callus induction of young stem cutting slices of *Ehretia asperula* Zoll. et Mor.

Pham Thi My Tram<sup>1,2,\*</sup>, Ngo Ke Suong<sup>3</sup>, Le Thi Thuy Tien<sup>2</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## TÓM TẮT

Xa den (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.) belongs to the Boraginaceae family, is a precious medicine, called "cancer" tree in Muong at Hoa Binh province traditional medicine. Xa den was shown to inhibit the development of malignant tumors, reduce oxidation, enhance resistance... In this study, we investigated the induction of friable callus in Xa den young stem section that could be further used to culture cell suspension and produce bioactive compounds. In that, we focussed on the effects of the plant growth regulators, mineral media and pH on the formation of friable callus of Xa den. The results showed that all treatments stimulated the formation of callus from Xa den thin stem (0.5-1.0 mm). In particular, samples which were cultured in B5 medium supplemented with 0.4 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA, at pH 5.8 produced highest percentage of secondary callus in friable (85%) and this callus also had highest fresh weight after 4 weeks of culture (0.054 g). To evaluate the presence of natural compounds in the callus and compared to those in cultivated plants, the ethanol extract of dry leaves, branches and fresh callus were used. The results showed the presence of natural compounds in the callus such as organic acid, phenolic, tannin, alkaloid and flavonoid was similar to the one in 2-year-old plant.

**Từ khoá:** *Ehretia asperula* Zoll. et Mor., friable callus, Xa den, young stem section, natural compounds

<sup>1</sup>Thu Dau Mot University, Binh Duong

<sup>2</sup>Ho Chi Minh City University of Technology, VNU-HCM, Vietnam

<sup>3</sup>Institute of Tropical Biology, VAST

## Liên hệ

**Pham Thi My Tram**, Thu Dau Mot University, Binh Duong

Ho Chi Minh City University of Technology, VNU-HCM, Vietnam

Email: tramptm@tdmu.edu.vn

## Lịch sử

- Ngày nhận: 05-6-2019
- Ngày chấp nhận: 16-01-2020
- Ngày đăng: 06-6-2020

DOI :10.32508/stdjns.v4i2.763



## Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Trích dẫn bài báo này:** Tram P T M, Suong N K, Tien L T T. **Effects of plant growth regulators, mineral medium and pH values on the callus induction of young stem cutting slices of *Ehretia asperula* Zoll. et Mor..** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(2):458-467.