

# Phát triển chồi cây lười rần (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam) trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*

- Lê Anh Tuấn
- Hoàng Thị Thu Thắm
- Phan Ngô Hoang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

( Bài nhận ngày 18 tháng 6 năm 2015, nhận đăng ngày 20 tháng 10 năm 2015)

## TÓM TẮT

Cây Lười rần (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam), một loài thảo dược đã được nghiên cứu và sử dụng trong y học cổ truyền nhằm điều trị rắn cắn, viêm gan và ung thư. Đặc biệt, ursolic acid và oleanolic acid là những hợp chất có hoạt tính sinh học cao trong cây Lười rần có khả năng kháng viêm, kháng khuẩn, chống oxy hoá, kháng sự tăng trưởng tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, khúc cắt thân mang chồi nách được nuôi cấy trên môi trường MS½ bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L cho số chồi phát sinh nhiều nhất; cụm chồi phát sinh từ mô sẹo xuất phát tại nhu mô dưới biểu bì thân cây. Sự tăng

trưởng của cụm chồi trên các điều kiện nuôi cấy khác nhau: tăng hàm lượng sacarose trong môi trường nuôi cấy, tăng cường độ chiếu sáng, hay bổ sung PEG 3 % có những biểu hiện khác biệt. Cụm chồi phát sinh mạnh dưới cường độ ánh sáng 7.500 lx và đặc biệt trong điều kiện nuôi cấy này, cường độ hô hấp và lượng ursolic acid và oleanolic acid tăng cao nhất. Cường độ hô hấp và vai trò các chất điều hòa tăng trưởng nội sinh trong sự tái sinh chồi cũng như trong quá trình đáp ứng của chồi với các điều kiện nuôi cấy khác nhau cũng được phân tích và thảo luận.

**Từ khóa:** cây Lười rần, cường độ ánh sáng, PEG, phát sinh chồi, ursolic acid và oleanolic acid.

## MỞ ĐẦU

Trong y học, khi nguồn dược liệu thiên nhiên ngày càng khan hiếm thì việc nghiên cứu và sử dụng các loại thảo dược càng được quan tâm. Cây Lười rần (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam) là một thảo dược đã được sử dụng trong y học cổ truyền để chữa rắn cắn, viêm tấy, viêm gan...[1], ursolic acid và oleanolic acid trong cây Lười rần có khả năng kháng viêm, kháng khuẩn, chống oxy hoá, kháng sự tăng trưởng tế bào ung thư da ở người và tế bào ung thư phổi ở chuột [2-5]. Hiện tại, các công trình công bố về cây Lười rần

chủ yếu tập trung vào sự ly trích và phân tích thành phần hóa học, khảo sát hoạt tính dược lý. Trong khi đó, các nghiên cứu về nhân giống *in vitro* hay biến đổi sinh lý học liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp trên đối tượng này còn rất hạn chế. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày sự phát sinh cụm chồi từ nuôi cấy khúc cắt thân mang chồi nách và bước đầu tìm hiểu một vài yếu tố môi trường ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp một số hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học của cây Lười rần, ngo

hầu cải tiến phương pháp trồng trọt trong mục đích định hướng tạo cây sạch hữu ích trong ngành dược phẩm dược liệu.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Cây Lưỡi rắn (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam) *in vitro* 4 tuần tuổi (có nguồn gốc từ hạt) tăng trưởng trên môi trường MS [6] với đa lượng giảm 50 % (MS $\frac{1}{2}$ ), sacarose 30 g/L, agar 6 g/L. Điều kiện nuôi cấy 27 $\pm$ 2 °C, 2.500 $\pm$ 500 lx (12/12) và độ ẩm 65 $\pm$ 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

*Phát triển chồi từ sự nuôi cấy đoạn thân mang chồi nách.* Các khúc cắt thân 5 mm, mang chồi nách được cô lập từ cây *in vitro* 4 tuần tuổi và đặt cấy trên các môi trường: MS $\frac{1}{2}$  (đối chứng), MS $\frac{1}{2}$  có bổ sung IAA 0,2 mg/L kết hợp BA với các nồng độ thay đổi 0,2; 0,5 hay 1 mg/L. Theo dõi sự phát sinh chồi, ghi nhận số chồi hình thành ở mỗi nghiệm thức theo thời gian.

*Khảo sát ảnh hưởng một số yếu tố lên sự tăng trưởng chồi cây Lưỡi rắn in vitro.* Các khúc cắt thân 5 mm mang chồi nách được cô lập từ cây *in vitro* 4 tuần tuổi và đặt cấy trên các môi trường: MS $\frac{1}{2}$  (đối chứng), MS $\frac{1}{2}$  có bổ sung IAA 0,2 mg/L và BA 1 mg/L và thay đổi các điều kiện nuôi cấy: ánh sáng 7.500  $\pm$  500 lx; sacarose 40 g/L hay bổ sung PEG 3 % vào môi trường nuôi cấy. Theo dõi các biến đổi hình thái, ghi nhận số chồi hình thành, trọng lượng tươi, trọng lượng khô, lượng ursolic acid và oleanolic acid của mẫu cây sau 3 tuần.

*Phân tích hình thái giải phẫu.* Cấu trúc thân, nguồn gốc chồi phát sinh được phân tích sau sự giải phẫu, nhuộm hai màu và quan sát dưới kính hiển vi.

*Xác định lượng ursolic acid và oleanolic acid.* Các mẫu cây *in vitro* được làm khô bằng cách sấy mẫu (120 °C trong 2 giờ đầu và liên tục 60 °C trong 70 giờ tiếp theo), ursolic acid và oleanolic acid được ly trích theo phương pháp của Xia và cộng sự [7]. Lượng ursolic acid và oleanolic acid được xác định thông qua chỉ số OD ở 530 nm [8].

*Cường độ hô hấp.* Cường độ hô hấp của các cụm chồi *in vitro* theo thời gian được xác định bằng máy Oxylab Hansatech ở 27 °C, trong tối. Kết quả thể hiện là lượng oxygen hấp thu ( $\mu$ molO $_2$ /g TLT/giờ).

*Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật (CDH TTTV).* Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật IAA, zeatin, GA $_3$  và ABA của các cụm chồi phát sinh từ sự nuôi cấy được ly trích và cô lập trên bản mỏng sắc ký silica gel F $_{254}$  (1.0554, Merck) với hệ dung môi di chuyển isopropanol : ammonium hydroxide: H $_2$ O (10:1:1) ở 30  $\pm$  2 °C. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được xác định bằng sinh trắc nghiệm [9].

*Xử lý số liệu.* Số liệu ghi nhận từ các thí nghiệm được xử lý thống kê nhờ chương trình SPSS 11.5 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 được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau kèm theo sau số trung bình.

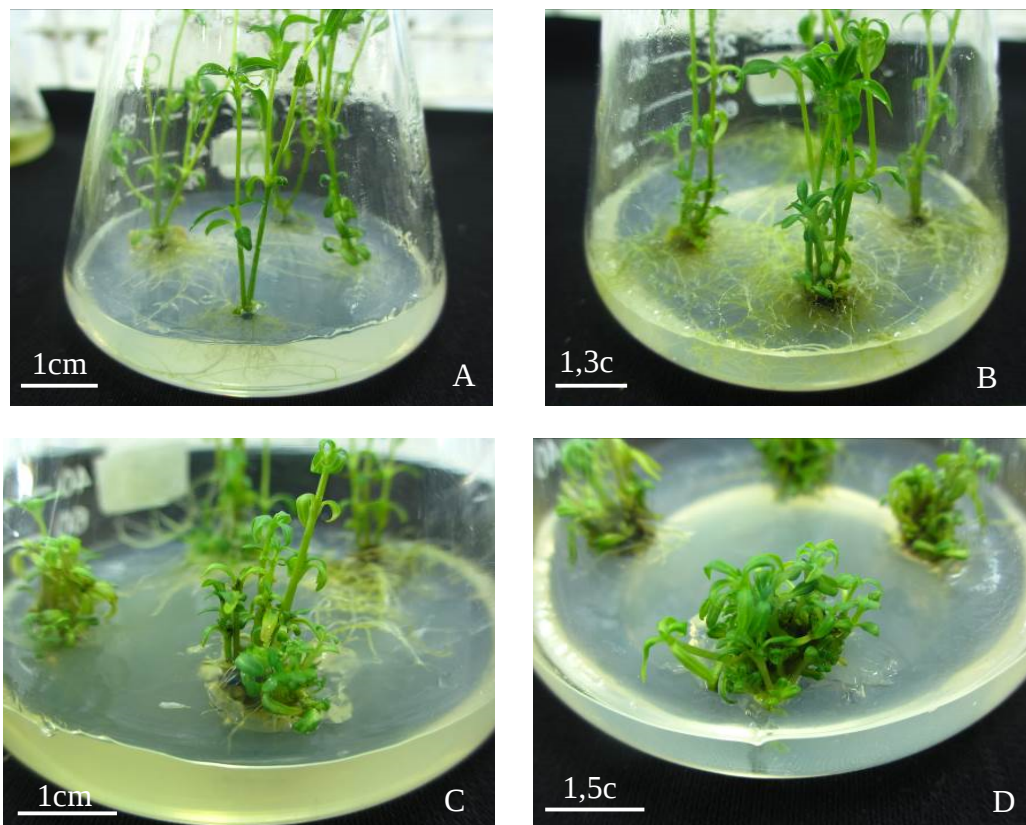
## KẾT QUẢ

### Sự phát triển chồi từ nuôi cấy đoạn thân mang chồi nách

Trên tất cả các môi trường MS $\frac{1}{2}$  có bổ sung IAA 0,2 mg/L kết hợp BA với nồng độ 0,2 mg/L; 0,5 mg/L hay 1 mg/L đều có sự cảm ứng tạo mô sẹo tại vị trí tiếp xúc môi trường của thân và sau đó phát sinh chồi, trong khi các mẫu cấy trên môi trường đối chứng MS $\frac{1}{2}$  tăng trưởng bình thường, không có sự gia tăng số lượng chồi hay hình thành mô sẹo. Những biểu hiện của quá trình phát sinh chồi bao gồm sự phù to ở gốc thân, khối tế

bào mô sẹo hình thành và chồi mới xuất hiện. Sau một tuần nuôi cấy, số lượng chồi phát sinh từ mô sẹo tăng nhanh hình thành những cụm cây, số lượng chồi phát sinh tiếp tục tăng dần theo thời

gian. Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung BA 1 mg/L kết hợp IAA 0,2 mg/L có thể đạt 30 chồi mới từ một mẫu cấy ban đầu (Hình 1, Bảng 1).



**Hình 1.** Cụm chồi cây Lưỡi rắn trên môi trường đối chứng MS $\frac{1}{2}$  (A); MS $\frac{1}{2}$  có BA 0,2mg/L và IAA 0,2 mg/L (B); MS $\frac{1}{2}$  có BA 0,5 mg/L và IAA 0,2 mg/L (C); MS $\frac{1}{2}$  có BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L (D), sau 4 tuần nuôi cấy.

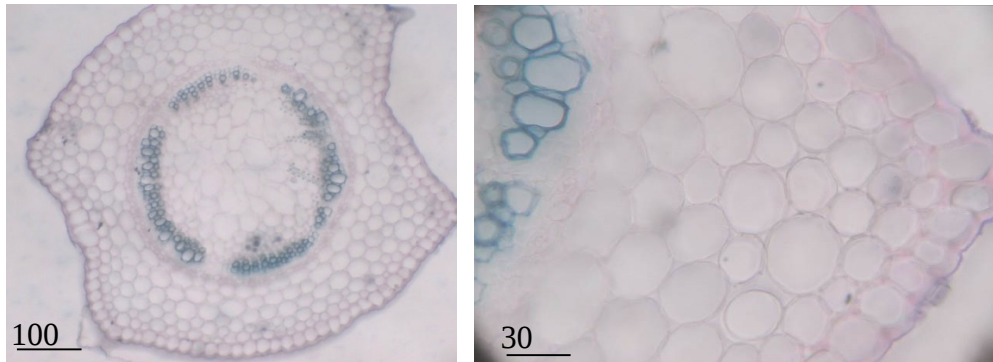
**Bảng 1.** Chồi phát sinh từ khúc cắt thân trên môi trường có bổ sung các CĐH TTTV theo thời gian

| Auxin<br>(mg/L) | Cytokinin<br>(mg/L) | Số chồi/ mẫu cấy         |                           |                           |                           |
|-----------------|---------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                 |                     | Tuần 1                   | Tuần 2                    | Tuần 3                    | Tuần 4                    |
| MS ½            |                     | 1,46 ± 0,19 <sup>b</sup> | 1,73 ± 0,18 <sup>c</sup>  | 2,00 ± 0,17 <sup>c</sup>  | 2,20 ± 0,20 <sup>c</sup>  |
| IAA 0,2         | BA 0,2              | 4,17 ± 0,31 <sup>a</sup> | 4,06 ± 0,31 <sup>bc</sup> | 6,43 ± 0,54 <sup>bc</sup> | 9,31 ± 0,69 <sup>b</sup>  |
|                 | BA 0,5              | 3,42 ± 0,34 <sup>a</sup> | 5,63± 0,75 <sup>ab</sup>  | 11,45 ± 2,29 <sup>b</sup> | 14,65 ± 2,08 <sup>b</sup> |
|                 | BA 1                | 3,33 ± 0,49 <sup>a</sup> | 8,13 ± 1,96 <sup>a</sup>  | 26,50 ± 3,25 <sup>a</sup> | 29,95 ± 3,39 <sup>a</sup> |

Các số trung bình trong cùng một cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa mức  $p = 0,05$ .

Dưới kính hiển vi, các lát cắt ngang qua thân cây Lưỡi rắn *in vitro* trước khi đặt trên môi trường có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật cho thấy nhóm tế bào nhu mô vỏ thân, tượng tầng libe mộc tăng trưởng bình thường (Hình 2). Trong khi đó, dưới tác động của BA kết hợp IAA trong môi trường nuôi cấy, vùng nhu mô dưới biểu bì thân tại vị trí tiếp xúc với môi trường có sự phân chia mạnh ngay sau 3 ngày

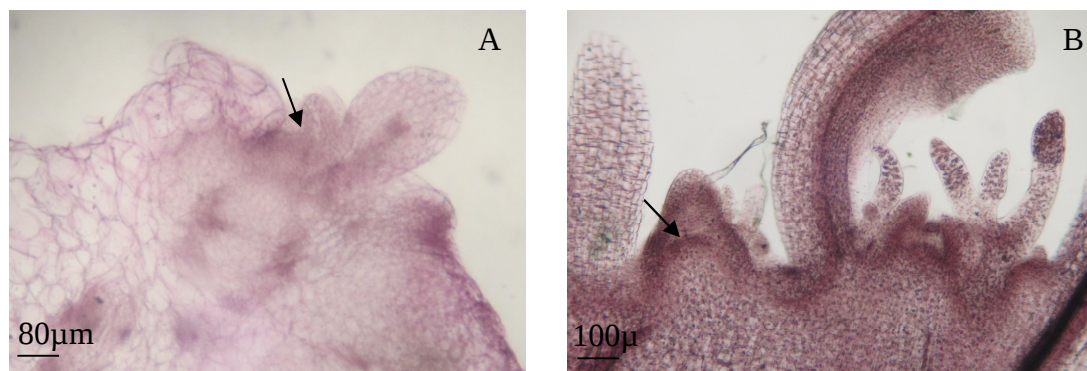
nuôi cấy (Hình 3), các tế bào này tiếp tục phân chia để tạo khối mô sẹo, tiếp sau đó chồi mới biệt hóa từ mô sẹo xuất hiện và tăng trưởng sau 5 ngày (Hình 4A). Với các mẫu cấy có hiện tượng phát sinh chồi, lát cắt qua mẫu được quan sát dưới kính hiển vi ghi nhận được cả 2 hiện tượng: chồi mới phát sinh và sự phát triển đồng thời chồi ngọn và các chồi nách kế cận (Hình 4B).



**Hình 2.** Phẫu thức cắt ngang thân cây Lưỡi rắn *in vitro* 4 tuần tuổi tăng trưởng từ hạt trên môi trường MS½.



**Hình 3.** Phẫu thức cắt ngang thân cây Lưỡi rắn *in vitro* trên môi trường có BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L, sau 3 ngày.



**Hình 4.** Chồi phát sinh từ mô sẹo (A) và các chồi nách phát triển đồng thời (B) trên môi trường có BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L, sau 5 ngày nuôi cấy (mũi tên: chồi phát sinh).

Nhìn chung, số chồi phát sinh trên môi trường có bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L luôn đạt giá trị cao theo thời gian nuôi cấy và đạt giá trị cao nhất vào tuần thứ 4 với khoảng 29,95/mẫu cấy, trong khi trên môi trường đối chứng chỉ có sự phát triển chồi từ chồi nách có sẵn. Do vậy, chúng tôi đã chọn môi trường MS½ bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L để tiếp tục các thí nghiệm về sau.

#### Ảnh hưởng một số yếu tố lên sự tăng trưởng chồi cây Lưỡi rắn *in vitro*

Sau 3 tuần nuôi cấy, số lượng chồi, trọng lượng tươi, trọng lượng khô của các mẫu cấy trên môi trường MS½ bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L trong các điều kiện khác nhau có biểu hiện khác biệt. Số chồi phát sinh dưới điều kiện ánh sáng 7.500 lx đạt giá trị cao nhất. Trọng lượng khô của mẫu cấy trên các nghiệm thức đều cao hơn so với môi trường đối chứng, ngoại trừ môi trường có bổ sung PEG 3 % (Bảng 2).

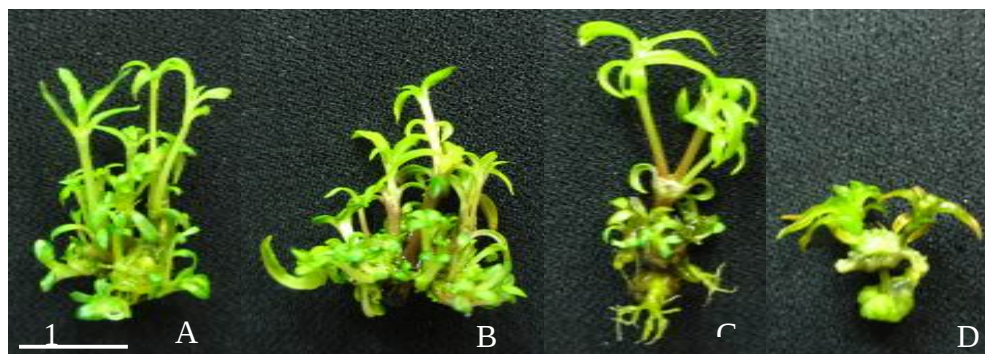
**Bảng 2.** Ảnh hưởng của các điều kiện môi trường khác nhau lên sự tăng trưởng chồi *in vitro*, sau 3 tuần

| Nghiệm thức                           | Số chồi/ mẫu cấy           | Trọng lượng tươi (mg)      | Trọng lượng khô (mg)     |
|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| MS½                                   | 2,00 ± 0,17 <sup>d</sup>   | 0,10 ± 0,01 <sup>bc</sup>  | 0,01 ± 0,00 <sup>b</sup> |
| MS½ + BA 1 + IAA 0,2                  | 26,50 ± 3,25 <sup>ab</sup> | 0,21 ± 0,04 <sup>a</sup>   | 0,02 ± 0,00 <sup>a</sup> |
| MS½ + BA 1 + IAA 0,2 (7.500 lx)       | 35,25 ± 4,71 <sup>a</sup>  | 0,16 ± 0,03 <sup>ab</sup>  | 0,02 ± 0,00 <sup>a</sup> |
| MS½ + BA 1 + IAA 0,2 + sacarose 40g/l | 21,10 ± 2,93 <sup>b</sup>  | 0,14 ± 0,03 <sup>abc</sup> | 0,02 ± 0,00 <sup>a</sup> |
| MS½ + BA 1 + IAA 0,2 + PEG 3%         | 10,95 ± 1,49 <sup>c</sup>  | 0,07 ± 0,02 <sup>c</sup>   | 0,01 ± 0,00 <sup>b</sup> |

Các số trung bình trong cùng một cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa mức  $p = 0,05$ .

Trên môi trường MS½ bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau đều có sự đáp ứng hình thành cụm chồi, gia tăng số lượng và kích thước chồi so với đối chứng. Trong đó, mẫu cấy dưới ánh sáng 7.500 lx có nhiều chồi tăng trưởng, kích thước lá nhỏ, màu xanh nhạt, thân có thêm sắc tố đỏ; mẫu cấy

ở điều kiện bình thường (2.500 lx) hay trên môi trường có sacarose 40 g/l, chồi phát triển mạnh, lá có màu xanh nhạt; môi trường có bổ sung PEG 3 %, chồi phát triển yếu hơn, các lá rất nhỏ và xoắn lại ở đầu, ngọn lá thường bị vàng úa và rụng sớm (Hình 6).



**Hình 6.** Cụm chồi trên môi trường MS $\frac{1}{2}$  bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L ở các điều kiện: (A) 2.500 lx; (B) 7.500 lx; (C) sacarose 40 g/l; (D) PEG 3 %, sau 3 tuần nuôi cấy.

#### Cường độ hô hấp của mẫu cây

Hầu hết cụm chồi trên môi trường MS $\frac{1}{2}$  bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L nuôi ở các điều kiện khác nhau đều có cường độ hô hấp cao

hơn so với đối chứng, trong khi hô hấp của các mẫu cây trên môi trường có bổ sung PEG 3 % rất thấp (Bảng 3).

**Bảng 3.** Cường độ hô hấp cụm chồi trên môi trường MS $\frac{1}{2}$  có bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L ở các điều kiện môi trường khác nhau, sau 3 tuần

| Nghiệm thức                                         | Cường độ hô hấp ( $\mu\text{mol O}_2/\text{g TLT/ giờ}$ ) |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| MS $\frac{1}{2}$                                    | $16,22 \pm 1,05^b$                                        |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2                   | $27,54 \pm 2,07^a$                                        |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2 (7.500 lx)        | $26,26 \pm 1,58^a$                                        |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2 + sacarose 40 g/l | $25,48 \pm 1,68^a$                                        |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2 + PEG 3 %         | $11,45 \pm 1,11^c$                                        |

Các số trung bình trong cùng một cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa mức  $p = 0,05$ .

#### Biến đổi hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của mẫu cây

Sau ba tuần nuôi cấy, hoạt tính các chất kích thích tăng trưởng IAA và zeatin trong mẫu cây trên các môi trường khác nhau đều tăng cao so

với đối chứng, trong khi mẫu cây trên môi trường đối chứng hay có bổ sung PEG thì hoạt tính chất ức chế tăng trưởng của ABA rất cao so với các mẫu còn lại (Bảng 4).

**Bảng 4.** Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong cụm chồi trên môi trường có BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L ở các điều kiện môi trường nuôi cấy khác nhau, sau 3 tuần

| Nghiệm thức                                        | Hoạt tính (mg/L)     |                   |                      |                      | Tỷ lệ Zea/IAA |
|----------------------------------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|----------------------|---------------|
|                                                    | IAA                  | ABA               | GA $_3$              | Zeatin               |               |
| MS $\frac{1}{2}$                                   | $0,41 \pm 0,12^e$    | $0,69 \pm 0,08^b$ | $0,84 \pm 0,05^a$    | $0,28 \pm 0,02^d$    | 0,68          |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2                  | $0,44 \pm 0,07^d$    | $0,46 \pm 0,03^c$ | $0,76 \pm 0,06^b$    | $0,52 \pm 0,06^b$    | 1,20          |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2 (7.500 lx)       | $0,55 \pm 0,03^c$    | $0,28 \pm 0,02^e$ | $0,68 \pm 0,11^c$    | $0,58 \pm 0,09^a$    | 1,05          |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2 + sacarose 40g/l | $0,67 \pm 0,01^a$    | $0,38 \pm 0,06^d$ | $0,74 \pm 0,07^{bc}$ | $0,50 \pm 0,04^{bc}$ | 0,75          |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2 + PEG 3%         | $0,58 \pm 0,05^{bc}$ | $0,84 \pm 0,03^a$ | $0,46 \pm 0,06^d$    | $0,42 \pm 0,02^c$    | 0,72          |

Các số trung bình trong cùng một cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa mức  $p = 0,05$ .

**Lượng ursolic acid và oleanolic acid từ dịch trích cụm chồi cây Lưỡi rắn *in vitro***

Dịch trích từ cụm chồi của cây Lưỡi rắn *in vitro* trên các môi trường nuôi cấy khác nhau đều có hiện diện ursolic acid và oleanolic acid, đặc

biệt cụm chồi trên môi trường MS $\frac{1}{2}$  có BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L dưới ánh sáng 7.500 lx có ursolic acid và oleanolic acid nhiều nhất (Bảng 5).

**Bảng 5.** Ursolic acid và oleanolic acid (thông qua chỉ số OD<sub>530</sub>) từ dịch trích cụm chồi cây Lưỡi rắn *in vitro* ở các môi trường và điều kiện nuôi cấy khác nhau, sau 3 tuần

| Nghiệm thức                                         | OD <sub>530</sub>            |
|-----------------------------------------------------|------------------------------|
| MS $\frac{1}{2}$                                    | 0,25 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2                   | 0,16 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2 (7.500 lx)        | 0,62 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup> |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2 + sacarose 40 g/l | 0,13 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> |
| MS $\frac{1}{2}$ + BA 1 + IAA 0,2 + PEG 3 %         | 0,14 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> |

Các số trung bình trong cùng một cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa mức  $p = 0,05$ .

**THẢO LUẬN**

Phát triển chồi bao gồm chồi mới phát sinh và sự tăng trưởng chồi sẵn có trong điều kiện nuôi cấy thích hợp. Trong nghiên cứu này, cụm chồi được hình thành trên các môi trường có IAA và BA là kết quả phát sinh chồi mới thông qua sự tạo mô sẹo từ thân cây cùng với sự phát triển đồng thời của các chồi nách để hình thành (Hình 3 và 4). Dưới tác động của hỗn hợp IAA và BA ngoại sinh trong môi trường nuôi cấy, tế bào nhu mô của thân được kích thích phân chia và sau đó phân hóa để hình thành cấu trúc chồi mới, hiệu ứng tác động của IAA và BA ở đây đối với mẫu cấy cũng gia tăng theo nồng độ và thời gian tác động (Bảng 1). Dưới ánh sáng cao 7.500 lx, số chồi, trọng lượng tươi và trọng lượng khô gia tăng đáng kể (Bảng 2), đặc biệt cụm chồi với rất nhiều chồi nhỏ, thân có sắc tố đỏ thẫm (Hình 6) cũng cho thấy tác động của ánh sáng cao đã bắt đầu tác động gây nên sự chậm tăng trưởng nhưng kích thích gia tăng số lượng chồi cũng như sắc tố bảo vệ, đây là những biểu hiện tăng trưởng của thực vật khi gặp điều kiện bất lợi. Theo B.T. Việt (2000) [10], trong quá trình phát sinh hình thái, bản chất và nồng độ của chất điều hòa tăng trưởng thực vật cũng như tỷ lệ giữa các loại chất điều hòa tăng trưởng thực vật khác nhau có vai

trò quan trọng định hướng phát sinh hình thái bao gồm: phát sinh mô (*histogenesis*), phát sinh cơ quan (*organogenesis*) và phát sinh phôi (*embryogenesis*). IAA và zeatin là nhóm hormon nội sinh kích thích đóng vai trò quan trọng trong sự phân chia và phân hóa tế bào để hình thành một cấu trúc mới, trong các nghiệm thức có bổ sung các CDH TTTV ngoại sinh, hoạt tính zeatin và IAA tăng cao cùng với tỉ lệ zeax/IAA khá cao (Bảng 4) đã kích thích nhanh sự tạo cụm chồi trong khi số chồi cũng như tỉ lệ zeax/IAA trên môi trường đối chứng MS $\frac{1}{2}$  rất hạn chế. Ở nghiệm thức gia tăng cường độ ánh sáng 7.500 lx, số lượng chồi phát sinh có thể đạt 35 chồi/mẫu sau 3 tuần (Bảng 2), sự gia tăng số chồi trong cụm chồi cùng với sự gia tăng cường độ hô hấp ở đây (Bảng 3) đã cho thấy vai trò của năng lượng ATP và các hợp chất liên hệ tạo ra từ quá trình hô hấp là cơ sở cung cấp nguồn nguyên liệu xây dựng cấu trúc chồi mới trong quá trình phát sinh cũng như tạo những tiền chất cho quá trình sinh tổng hợp và tích lũy các hợp chất thứ cấp liên quan [11].

Trong đời sống của thực vật, ngoài những sản phẩm biến dưỡng cần thiết cho các hoạt động tăng trưởng và phát triển hàng ngày, thực vật còn có khả năng tạo ra các hợp chất thứ cấp thuộc

nhóm terpen, phenolic hay các hợp chất nitrogen giúp kích kháng bảo vệ thực vật, chống lại những điều kiện bất lợi cũng như các yếu tố gây bệnh. Ursolic acid và oleanolic acid là những nhóm triterpenoid được tổng hợp từ các tiền chất mevalonic acid qua con đường IPP của chuỗi hô hấp tế bào, đặc biệt ursolic acid và oleanolic acid có khả năng kháng rất tốt sự phát triển tế bào ung thư da và tế bào ung thư phổi dòng A-549 [3, 5]. Trong nghiên cứu này, khi xử lý các điều kiện nuôi cấy theo chiều hướng tạo điều kiện bất lợi cho sự tăng trưởng bao gồm tăng lượng đường trong môi trường hay bổ sung PEG vào môi trường nuôi cấy hoặc tăng cường độ chiếu sáng, kết quả ghi nhận các cây Lưỡi rắn gia tăng tổng hợp và tích lũy ursolic acid và oleanolic acid dưới điều kiện ánh sáng cường độ cao 7.500 lx (Bảng 5). Trong đó, lượng đường trong môi trường nuôi cấy tăng lên nhằm gia tăng áp suất thẩm thấu với tế bào; PEG được sử dụng như một tác nhân gây ra sự khô hạn trong các nghiên cứu *in vitro* [12]. Thông thường trong điều kiện bất lợi cho sự tăng trưởng, thực vật sẽ chuyển sang giai đoạn phát triển để có thể ra hoa, tạo trái và kết thúc chu kỳ phát triển [13] hay tăng sự tổng hợp và tích lũy các sản phẩm giúp sự kháng oxy hóa hay kích kháng bảo vệ thực vật. Trong trường hợp này, dưới ánh sáng cường độ cao, các cây Lưỡi rắn gia tăng hô hấp tế bào là cơ sở cho sự gia tăng quá trình sinh tổng hợp ursolic acid và oleanolic acid có nguồn gốc tổng hợp từ các hợp chất liên hệ của quá trình hô hấp. Như vậy,

có lẽ dưới cường độ ánh sáng cao đã gây sốc sinh lý và các cây này đã kháng lại điều kiện bất lợi bằng cách gia tăng hô hấp, gia tăng sinh tổng hợp để tạo các hợp chất gây kích kháng để bảo vệ cơ thể. Trong nghiên cứu này, bước đầu đã ghi nhận có sự thay đổi sinh tổng hợp nhóm triterpenoid này dưới những điều kiện nuôi cấy khác nhau thật sự ý nghĩa cho các nghiên cứu sắp tới về khảo sát mối liên quan giữa tác động môi trường trong quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* mà lâu nay ít được đề cập do khó khăn trong thiết kế thí nghiệm.

## KẾT LUẬN

Sự phát sinh chồi từ nuôi cấy đoạn thân mang chồi nách cây Lưỡi rắn đạt số chồi nhiều nhất với 29,95/ mẫu cấy trên môi trường MS½ bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L sau 4 tuần nuôi cấy. Các chồi phát sinh có nguồn gốc từ sự phân hóa mô sẹo gốc thân tạo chồi và các chồi nách của chồi mới phát sinh tiếp tục phát triển đồng thời. Trên môi trường MS½ bổ sung BA 1 mg/L và IAA 0,2 mg/L dưới ánh sáng 7.500 lx, số chồi phát sinh nhiều nhất, trọng lượng tươi, trọng lượng khô và cường độ hô hấp đều tăng cao đi cùng hàm lượng ursolic acid và oleanolic acid cao nhất sau 3 tuần.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Lương y Nguyễn Đức Nghĩa đã giới thiệu và hỗ trợ vật liệu nghiên cứu cho chúng tôi trong suốt thời gian qua.

# Development of shoots of *Hedyotis corymbosa* (L) Lam *in vitro* culture

- Lê Anh Tuấn
- Hoàng Thị Thu Thắm
- Phan Ngô Hoang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

## ABSTRACT

*Hedyotis corymbosa* is one of weedy herb belonging to Rubiaceae family. It has been studied and used as a traditional medicine for the treatment of snakebite, anti-hepatotoxic and cancer. Notably, ursolic acid and oleanolic acid, compounds presented high biological activity in *H. Corymbosa*, were reported having anti-inflammatory, anti-bacterial, antioxidant and inhibited the growth of cancer cells. In the present study, fragments of stems containing an axillary bud are cultured on MS $\frac{1}{2}$  medium supplemented with 1 mg/L BA and 0.2 mg/L IAA is the best condition which gives the highest number of shoot formation. The

shoots are come from the callus of cortex. In different culture conditions (increase the sucrose concentration in the medium culture, increase the light intensity, supplemented with 3 % PEG), shoots grow up strongly under 7,500 lx light intensity, especially in this culture condition the respiratory rate and the concentration of ursolic acid and oleanolic acid are the highest. The respiratory changes and the role of endogenous hormones in the shoot regeneration and the response of shoots in different culture conditions have been analyzed and discussed.

**Key words:** *Hedyotis corymbosa*, light intensity, polyethylene glycol, shoot regeneration, ursolic acid and oleanolic acid.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đ.T. Lợi, Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nxb Y học, 250-251 (2004).
- [2]. I.T. Babalola, O.S. Francis, Ubiquitous ursolic acid: A potential pentacyclic triterpene natural product, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2, 2, 214-222 (2013).
- [3]. T.V. Sung, T.T. Thủy, N.T.H. Anh, Các hợp chất thiên nhiên từ một số cây cỏ Việt Nam, Nxb Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 6-30 (2011).
- [4]. J. Li, W.J. Guo, Q.Y. Yang, Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15, *J. Gastroenterol*, 8, 3, 493-495 (2002).
- [5]. J.S. Norrizah, M. Yaseer Suhaimi, A. Rohaya, N.A.R. Nik Roslan, Ursolic acid and oleanolic acid productions in elicited cell suspension cultures of *Hedyotis corymbosa*, *Biotechnology*, 11, 4, 238-242 (2012).
- [6]. T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology*, 15, 473-497 (1962).
- [7]. E.Q. Xia, B.W. Wang, R.X. Xiang, Z. Li, S. Yang, H.B. Li, Microwave assisted

- extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5319-5329 (2011).
- [8]. D. Pandey, T. Malik, R.M. Banik, Validated HPTLC-Method for quanti-fication of variability in content of oleanolic acid in different variety of *Lantana camara*, *Pharmacologia*, 126-131 (2013).
- [9]. T. Yokota, N. Murofushi, N. Takahashi, Extraction, purification and indentification, 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).
- [10]. B.T. Việt, Sinh lý thực vật đại cương - Phần II: Phát triển, Nxb Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 333 trang (2000).
- [11]. M.T.N. Tiêng, Thực vật cấp cao, Nxb Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 211 trang (2001)
- [12]. L. Berg, Y.J. Zeng, Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by PEG 6000, *South African Journal of Botany*, 72, 284-286 (2006).
- [13]. H.T.D. Phúc, T.C. Tú, P.N. Hoang, Sự ra hoa *in vitro* cây Dền xanh (*Amaranthus viridis* L.) trong điều kiện khô hạn do PEG, *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ ĐHQG-HCM*, 14, 3, 38-45 (2011).