

NGHIÊN CỨU NHÂN CHỒI CÂY XẠ ĐEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP IN VITRO

**Phạm Thị Mỹ Trâm⁽¹⁾, Lê Thị Bích Duyên⁽¹⁾, Đoàn Thị Thanh Giang⁽¹⁾,
Ngô Kế Sương⁽³⁾, Lê Thị Thủy Tiên⁽²⁾**

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một, (2) Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG TP. HCM

(3) Viện Sinh học Nhiệt đới, Tp. HCM

Ngày nhận bài 21/03/2019; Ngày gửi phản biện 30/03/2019; Chấp nhận đăng 02/05/2019

Email : tramptm@tdmu.edu.vn

Tóm tắt

Cây xạ đen [*Ehretia asperula* Zoll. et Mor] thuộc họ Boraginaceae là cây thảo dược có tác dụng hữu hiệu trong việc điều trị mụn nhọt, tiêu viêm, giải độc và được nghiên cứu nhiều về thành phần hoá học cũng như hoạt chất có khả năng kháng sự phân chia tế bào ung thư. Việc nhân giống cây xạ đen là cần thiết nhằm mục đích bảo tồn giống và làm nguyên liệu cho ngành dược học. Trong nghiên cứu này, sự tạo chồi từ đoạn chồi nách của cây xạ đen trồng ngoài vườn được nuôi cấy trên môi trường MS. Qua một số thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên sự tạo chồi xạ đen, chúng tôi nhận thấy đoạn chồi non của cây xạ đen ngoài tự nhiên có khả năng nhân chồi tốt với môi trường MS có bổ sung BA (0,6 mg/l) cho số lượng chồi phát sinh là 4 chồi/mẫu.

Từ khoá: chồi nách non, *Ehretia asperula* Zoll. et Mor., in vitro, nhân chồi, xạ đen

Abstract

HIGH FREQUENCY SHOOT MULTIPLICATION OF XA DEN CULTURED IN VITRO

Xa den (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor) belongs to the family Boraginaceae which is effective in treating pimples, inflammation, detoxification. Many researches on the chemical compositions as well as secondary compounds were studied. Propagation of *Xa den* tree is necessary for the purpose of preserving seeds and materials for the pharmaceutical industry. In this study, shoot formation from young shoots of *Xa den* cultivated in the garden was cultured on MS medium. In some experiments, the effects of growth regulators on young shoots, we found that the young shoots of *Xa den* in garden were capable of propagating well with MS medium supplemented BAP (0.6 mg/l) for 4 shoots/sample.

1. Mở đầu

Nuôi cấy mô thực vật là quá trình nhân giống vô tính thực vật trong ống nghiệm. Nuôi cấy mô thực vật là phạm trù khái niệm chung cho tất cả các kỹ thuật nuôi cấy các bộ phận khác nhau (tế bào, mô, cơ quan...) trong môi trường nhân tạo dưới điều kiện vô trùng. Kỹ thuật *in vitro* dựa trên nguyên lý là tế bào thực vật có tính toàn năng, nghĩa là từ một mô, một cơ quan, tế bào bất kỳ một bộ phận nào của cây đều có thể phát triển thành một cây hoàn chỉnh nếu được nuôi trong môi trường thích hợp (Hoàng Thu, 2009; Nguyễn Văn Uyển, 1993). Kỹ thuật nhân giống *in vitro* không

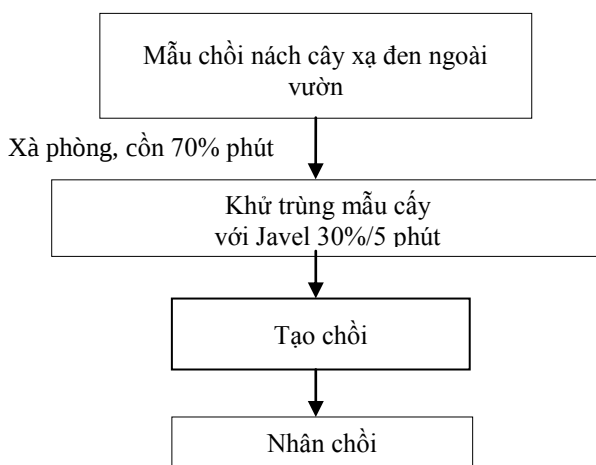
chỉ ứng dụng để nhân giống và phục tráng cây trồng mà nó còn đem lại hiệu quả kinh tế cao trong việc nhân nhanh và tạo ra một số lượng lớn cây con đồng đều, sạch bệnh, đặc biệt là còn giữ được tính trạng quý của bố mẹ và cho phép chủ động cung cấp nguồn giống cũng như vật liệu vô trùng cho các thí nghiệm (Nguyễn Đức Lượng & Nguyễn Thị Thủy Tiên, 2002). Ngày nay, y dược học phát triển, cùng với nó là những bài thuốc dân gian cũng dần dần được tìm ra và một trong số những bài thuốc dân gian đó là tìm cây thuốc trong tự nhiên có những tác dụng ưu việt trong điều trị các bệnh ung thư, mụn nhọt, ... của con người. Một trong những cây thuốc dân gian đó là cây xạ đen, nó có rất nhiều tác dụng và đóng vai trò không thể thiếu trong các bài thuốc cổ truyền.

Xạ đen có tên khoa học là ***Ehretia asperula* Zoll. et Mor.**, thuộc họ *Boraginaceae*, là cây bụi trườn, có tác dụng hữu hiệu trong việc điều trị mụn nhọt, tiêu viêm, giải độc, thông kinh, sử dụng trong trị bệnh ung thư gan (Lê Thị Thủy Tiên & Trần Văn Minh, 2015). Dịch chiết từ loài xạ đen có hoạt tính gây độc tế bào, kháng lại các dòng tế bào HEPA-2B (ung thư gan), COLO-25 (ung thư ruột kết), KH (ung thư mũi hầu) và kháng virus HIV (Ly và cs., 2006). Hiện nay cây xạ đen là loài cây nhỏ được trồng phổ biến ở các tỉnh thành như Sơn La, Hòa Bình, Hà Nam, Quảng Bình. Tuy nhiên, loài cây này đang bị cạn kiệt dần trong tự nhiên do bị khai thác nhiều. Do vậy, công tác nhân giống và trồng lại để bảo tồn nguồn gen và cung cấp nguồn dược liệu từ cây xạ đen là vấn đề đang được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Từ cơ sở trên, nhóm chúng tôi đã thực hiện đề tài: “Nghiên cứu nhân chồi xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. et Mor. bằng phương pháp *in vitro*”.

2. Vật liệu và phương pháp

Vật liệu: Cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. et Mor. ngoài tự nhiên.

Phương pháp



Hình 1. Sơ đồ quy trình thí nghiệm

Thí nghiệm 1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp NAA đến khả năng nhân chồi *in vitro* của cây xạ đen

Môi trường MS tạo chồi chứa 0,6 mg/l BAP kết hợp với các nồng độ NAA khảo sát (bảng 1):

Bảng 1. Công thức nồng độ NAA lên vật liệu *in vitro* cây xạ đen

Công thức	ĐC	CT1	CT2	CT3	CT4
Nồng độ NAA (mg/l)	0	0,5	1	1,5	2

Chỉ tiêu theo dõi sau 30 ngày: (1) hình thái của chồi; (2) số lượng chồi hình thành/1 mẫu cấy

Thí nghiệm 2. *Khảo sát ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân chồi in vitro của cây xạ đen.*

Để tăng hệ số nhân chồi, ta kết hợp môi trường tạo chồi tốt nhất ở thí nghiệm 1 với thể tích nước dừa phù hợp tìm được dưới bảng công thức dưới đây:

Bảng 2. Công thức thể tích nước dừa lên vật liệu in vitro cây xạ đen

Công thức	ĐC	CT1	CT2	CT3	CT4
Thể tích nước dừa (ml)	0	5%V	10%V	15%V	20%V

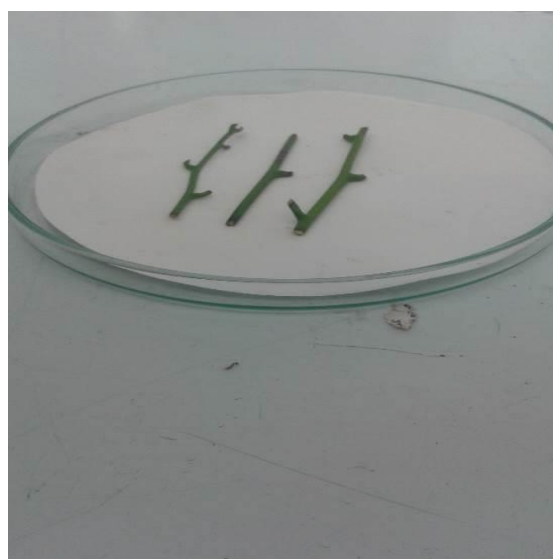
Chỉ tiêu theo dõi sau 30 ngày: (1) hình thái của chồi; (2) số chồi hình thành/1 mẫu cấy

Phương pháp xử lý số liệu: Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tạo vật liệu in vitro cây xạ đen

Đoạn chồi non xạ đen trồng ngoài vườn được sử dụng cho quá trình tạo chồi *in vitro*. Đầu tiên, mẫu chồi non sẽ được cắt khoảng 3 – 4cm, đem rửa với xà phòng trong vòng 10 phút, sau đó rửa lại nhiều lần dưới vòi nước máy. Mẫu sẽ được đưa vào tủ cấy và rửa lại 3 lần bằng nước cất rồi sử dụng cồn 700 để rửa mẫu trong 1 phút. Sau khi lắc trong cồn thì mẫu sẽ được rửa lại bằng nước cất. Mẫu sẽ tiếp tục được chuyển vào bình tam giác chứa Javen 30%, lắc nhẹ trong 5 phút. Sau đó, mẫu sẽ được rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 lần. Thảm mẫu trên giấy lọc rồi cắt các đoạn thân có chồi nách để cấy vào bình môi trường MS có chứa BAP 0,6 mg/l. Đây là bước quan trọng trong nuôi cấy mô cây xạ đen. Sau 2 tuần thì mẫu bắt đầu xuất hiện chồi ở các nách lá. Và sau 1 tháng thì các chồi này sẽ được cấy chuyển qua các bình môi trường mới để nhân số lượng chồi (hình 2, 3)



Hình 2. Mẫu chồi nách của cây xạ đen ngoài tự nhiên

Hình 3. Mẫu vô trùng sống phát sinh chồi



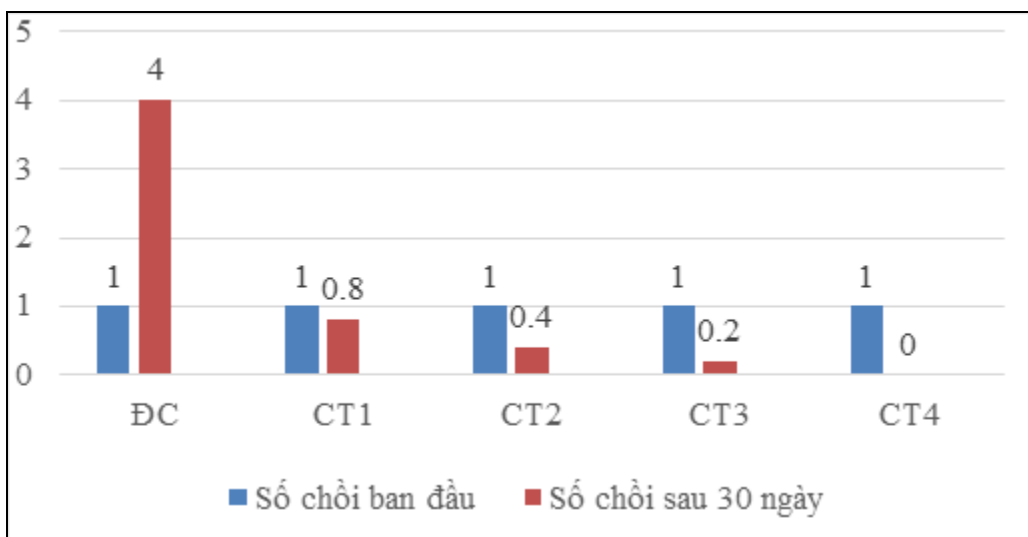
3.2 Ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp NAA đến khả năng nhân chồi in vitro của cây xạ đen

Qua theo dõi sự hình thành của mẫu cấy trong 30 ngày ở môi trường MS bổ sung 0,6 mg/l BAP và các nồng độ NAA khác nhau, kết quả được ghi nhận ở bảng 3. Ở môi trường MS có bổ sung BAP và NAA với nồng độ 0 mg/l thì tạo sẹo nhỏ, chồi phát triển tốt, xanh, ra nhiều lá non, môi trường không bị nâu hóa sau 3 tuần. Còn ở môi trường MS bổ sung BAP và 0,5 mg/l NAA thì số chồi giảm, lá nhỏ, chưa phát triển lá to trên chồi, sẹo to phát triển quanh gốc. Môi trường MS bổ sung BAP và 1mg/l NAA rất ít chồi, sẹo to phát triển quanh gốc môi trường bị nâu hóa sau 3 tuần. Còn lại môi trường MS bổ sung BAP và NAA với nồng độ 1,5 mg/l và 2 mg/l thì tạo sẹo quanh gốc, không tạo chồi, môi trường bị nâu và chuyển sang màu đen.

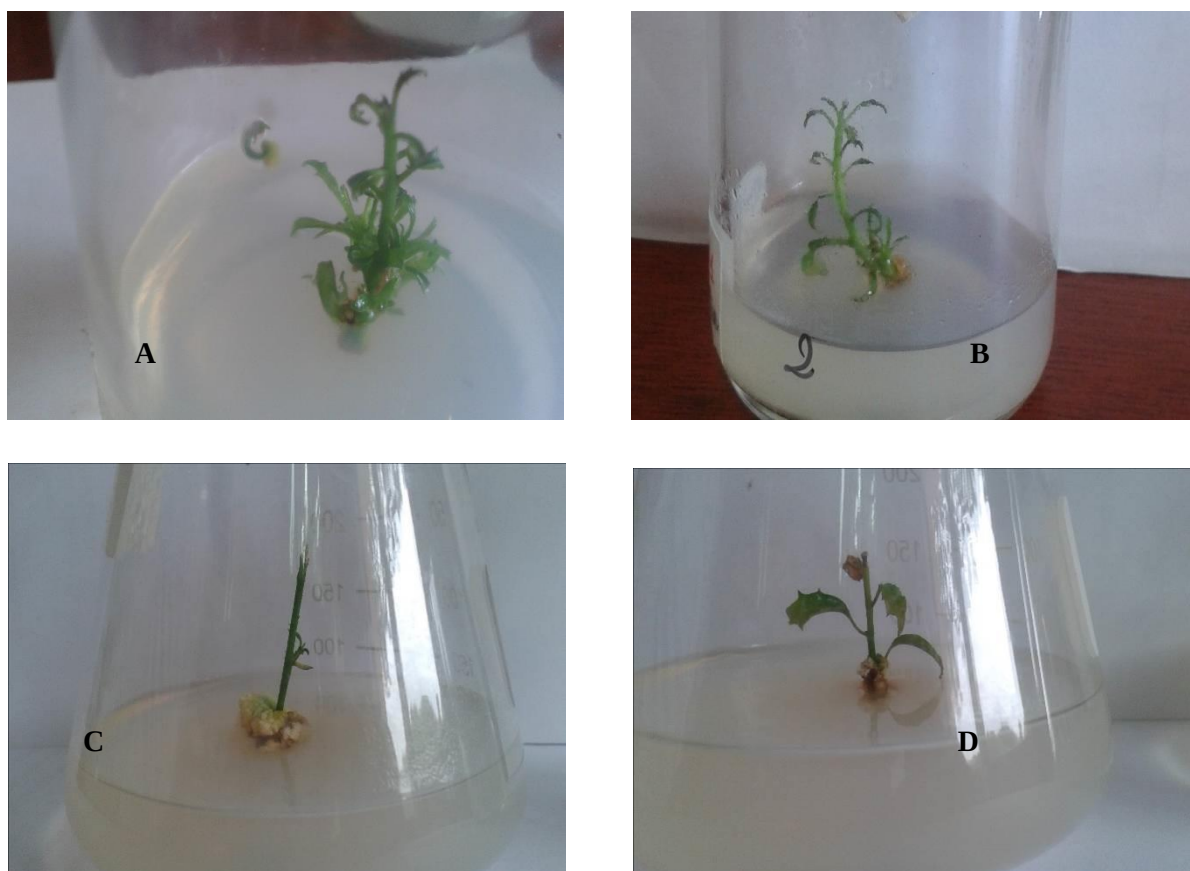
Bảng 3. Số chồi và lá hình thành sau 4 tuần nuôi cấy với 0,6 mg/l BAP kết hợp với các nồng độ NAA khác nhau

Chất điều hoà sinh trưởng	Số chồi ban đầu	Số chồi TB tăng lên sau 4 tuần nuôi cấy	Số lá TB trên 1 chồi sau 4 tuần nuôi cấy
0,6 mg/l BAP + 0 mg/l NAA	1	$4 \pm 1,22$	$8 \pm 1,41$
0,6 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA	1	$0,8 \pm 0,45$	$3,6 \pm 2,19$
0,6 mg/l BAP + 1 mg/l NAA	1	$0,4 \pm 0,55$	$0,8 \pm 1,09$
0,6 mg/l BAP + 1,5 mg/l NAA	1	$0,2 \pm 0,45$	$0,4 \pm 0,89$
0,6 mg/l BAP + 2 mg/l NAA	1	0	0

Nhìn chung môi trường MS bổ sung 0,6 mg/l BAP thích hợp cho quá trình tạo chồi, số chồi trung bình đạt 4 chồi/mẫu. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự với kết quả của một số tác giả khác. Như theo nghiên cứu của Dương Thị Minh (2014), với môi trường MS chứa 0,6 mg/l BAP hệ số nhân chồi là 5. Theo nghiên cứu của Bùi Văn Thắng (2013), với nồng độ 5 mg/l BAP thì số chồi trung bình đạt 2,95 chồi/mẫu (Vũ Quang Nam và cs., 2013). Như vậy, kết quả thí nghiệm cho thấy khi bổ sung NAA vào quá trình tạo chồi là không thích hợp. Nguyên nhân là do nồng độ auxin cao không những không tạo nhiều chồi mà còn ức chế sự sinh trưởng và phát triển của mô cấy.



Hình 4. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp NAA đến khả năng nhân chồi in vitro của cây xạ đen



Hình 5. Chồi xạ đen hình thành sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung

A: 0,6 mg/l BAP; B: 0,6 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA;

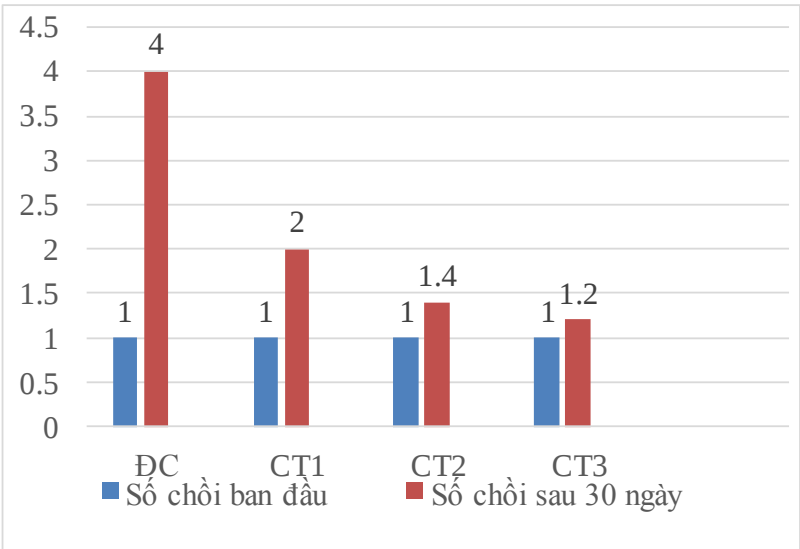
C: 0,6 mg/l BAP và 1 mg/l NAA; D: 0,6 mg/l BAP và 1,5 mg/l NAA

3.3 Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân chồi in vitro của cây xạ đen

Qua theo dõi sự hình thành của mẫu cấy trong 30 ngày trên môi trường MS bổ sung 0,6 mg/l BAP và các nồng độ nước dừa khác nhau, kết quả được ghi nhận ở bảng 4 và hình 6. Ở môi trường MS có bổ sung BAP nhưng không chứa nước dừa thì cây tạo sẹo nhỏ, chồi phát triển tốt, xanh, ra nhiều lá non, môi trường không bị nâu hóa sau 3 tuần. Còn ở môi trường MS bổ sung BAP và 5%V nước dừa thì chồi phát triển nhưng ít, lá xanh, xuất hiện sẹo, môi trường bị nâu hóa sau 2 tuần. Môi trường MS bổ sung BAP và 10%V nước dừa, ít chồi (1 – 2 chồi trên một mẫu), lá nhỏ, sẹo to phát triển quanh gốc, môi trường bị nâu hóa sau 2 tuần. Còn lại môi trường MS bổ sung BAP và nước dừa với thể tích 15%, cây bị chết, hoặc tạo sẹo to quanh gốc, chồi ít (có cây không tạo chồi), lá nhỏ, vài chồi không có lá, môi trường bị nâu hóa sau 2 tuần.

Bảng 4. Số chồi và lá hình thành sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BAP kết hợp với nước dừa

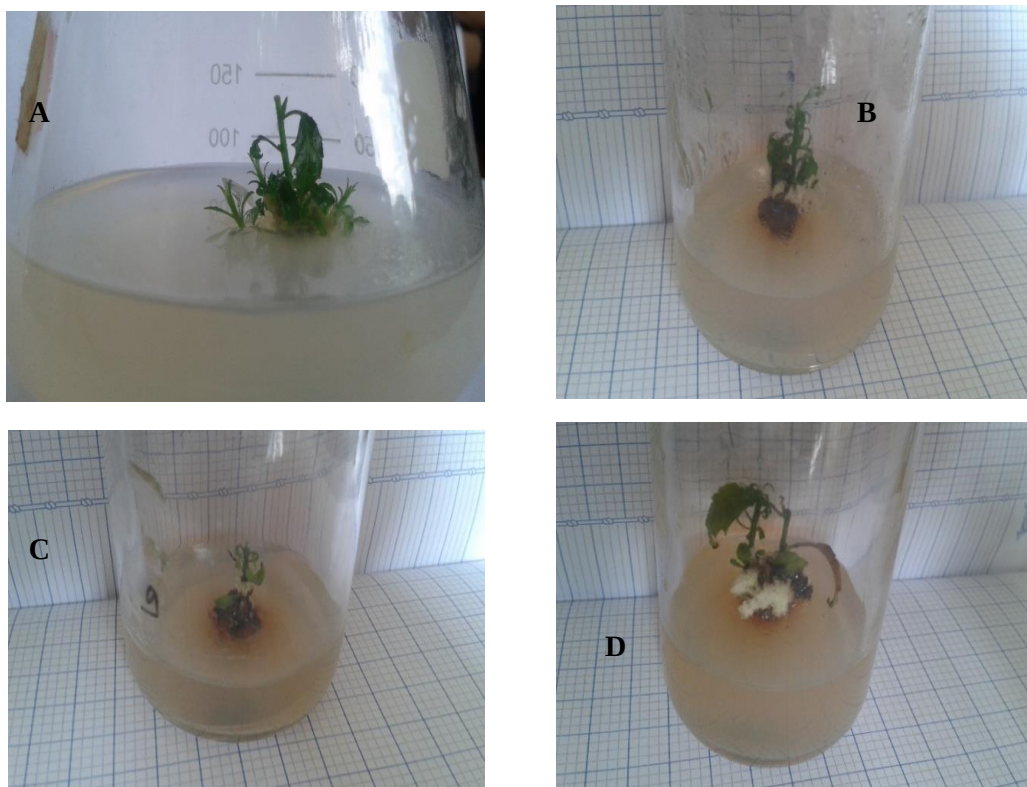
Thể tích nước dừa bổ sung	Số chồi ban đầu	Số chồi TB tăng lên sau 4 tuần nuôi cấy	Số lá TB trên cụm chồi sau 4 tuần nuôi cấy
0%V nước dừa	1	4 ± 1,22	6,8 ± 1,09
5%V nước dừa	1	2 ± 0,82	3,5 ± 1,91
10%V nước dừa	1	1,4 ± 0,55	1,6 ± 1,67
15%V nước dừa	1	1,2 ± 0,84	0,8 ± 1,09



Hình 6. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của nước dừa lên hệ số nhân chồi ở các môi trường của cây xạ đen

Qua thí nghiệm cho thấy, có lẽ nước dừa chứa nhiều chất khoáng không thích hợp cho việc nhân chồi cây xạ đen. Theo tác giả Nguyễn Văn Kết và cs. (2014), đối với cây trà my hoa đỏ, trên môi trường WPM hàm lượng khoáng đa lượng thấp nhưng hàm lượng vitamin thiamin (B1) cao hơn gấp 10 lần so với môi trường MS nên có tác dụng tốt cho quá trình trao đổi chất, giúp cho mô nuôi cấy có thể hấp thụ trực tiếp các loại vitamin trong môi trường nuôi cấy, đặc biệt là ở giai đoạn nhân chồi hoặc tạo chồi. Vì ở giai đoạn này, các chồi non chưa hình thành lá nên khả năng quang hợp tự

tạo ra các chất hữu cơ là rất nhỏ. Vì thế sự phát triển của chồi phụ thuộc vào các chất hữu cơ trong môi trường nuôi cấy. Vitamin có vai trò xúc tác các quá trình trao đổi chất diễn ra trong tế bào, cho nên muốn đạt được sinh trưởng mạnh cho các mô nuôi cấy các nhà nghiên cứu đã thêm vào môi trường một số vitamin thông thường như: nicotinic acid, pyridoxine, thiamin, glycine. Trong số đó, vitamin B1 được coi là vitamin thiết yếu cho sự sinh trưởng và biến dưỡng của tế bào thực vật Nguyễn Văn Kết và cs. (2014).



Hình 7. Chồi xạ đen sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung:
A (0,6 mg/l BAP), B (0,6 mg/l BAP + 5%V nước dừa), C (0,6 mg/l BAP + 10%V nước dừa),
D (0,6 mg/l BAP + 15%V nước dừa)

Như vậy, trong thí nghiệm sử dụng nước dừa để nhân chồi là không phù hợp. Vì hàm lượng khoáng trong nước dừa khá cao, trong khi quá trình nhân chồi của cây thân gỗ lại không cần quá nhiều chất khoáng. Sau quá trình thử nghiệm các loại môi trường, chúng tôi chọn môi trường MS chứa 0,6 mg/l BAP để tạo nhân chồi xạ đen. Sau 3 tháng, chồi có thể đạt 4 – 5cm và có thể ra rễ (hình 7).



Hình 7. Chồi xạ đen sau 3 tháng nuôi cấy

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Dương Thị Minh (2014). *Nghiên cứu tạo vật liệu in vitro và bước đầu nhân nhanh cây xạ đen bằng phương pháp tạo đa chồi*. Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2.
- [2] Hoàng Thu (2009). *Nghiên cứu xây dựng qui trình nhân nhanh in vitro giống lan hồ điệp nhập nội (phalaenopsis)*. Luận văn tốt nghiệp đại học. Viện Đại học Mở Hà Nội.
- [3] Le Thi Thuy Tien, Tran Van Minh (2015). Tissue cultures of xa den *Ehretia asperula* Zollinger et Moritz. *Journal of Science of An Giang University*, 3(3),113-123.
- [4] Ly T. N. et al (2006). Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. *Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3786-3793.
- [5] Nguyễn Đức Lượng và Nguyễn Thị Thủy Tiên (2002). *Công nghệ tế bào*. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [6] Nguyễn Văn Kết và cs. (2014). Khảo sát khả năng nhân giống cây Trà my hoa đỏ (*Camellia piquetiana* (Pierre) Sealy) in vitro. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN*, 30, 17-25.
- [7] Nguyễn Văn Uyển (1993). *Nuôi cấy mô tế bào thực vật phục vụ công tác giống cây trồng*. NXB Nông nghiệp.
- [8] Vũ Quang Nam và cs. (2013). Nhân giống cây xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth) bằng phương pháp nuôi cấy mô. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*. Số 2, 11 – 16.
- [9] Quỹ Châu Á - Trung tâm Môi trường và Phát triển cộng đồng (2012). *Xạ đen – Cây thuốc người Dao Ba Vì*.
<http://huse.edu.vn/threads/nhung-cong-dung-cua-cay-xa-den-trong-y-hoc.50004>. Truy xuất ngày 08/07/2016.