

Khảo sát ảnh hưởng của một vài chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong nuôi cấy *in vitro* cây viễn chí lá nhỏ (*polygala paniculata* L.)

Lê Thu Thủy¹, Bùi Trang Việt², Trần Thanh Hương²

¹Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành. thuylt.hcmus@gmail.com

²Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên Tp.HCM.

Tóm tắt

Viễn chí lá nhỏ thường được sử dụng trong y học cổ truyền để trị sổ mũi, đầy hơi, hoặc dùng rễ ngâm cồn để xoa bóp chữa tê thấp nhức mỏi. Ngoài ra, trong cây còn có rất nhiều hợp chất như saponin, xanthone, coumarin, flavonoid, methyl salicylate có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh, kháng viêm, chống oxy hóa, an thần. Chất điều hòa tăng trưởng thực vật auxin (NAA hoặc IBA) và cytokinin BA ở các nồng độ được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* cây Viễn chí lá nhỏ nhằm khảo sát sự hình thành chồi và rễ bất định của cây. BA 0,5mg/l được bổ sung vào môi trường nuôi cấy cho số lượng chồi trên mẫu cấy cao nhất. NAA 0,25mg/l được bổ sung vào môi trường nuôi cấy cho số lượng rễ trên mẫu cấy cao nhất.

Nhận 08.02.2018
Được duyệt 21.05.2018
Công bố 19.06.2018

Từ khóa
Polygala paniculata L.,
auxin, cytokinin, nuôi
cấy mô thực vật.

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1. Đặt vấn đề

Viễn chí lá nhỏ hay còn được gọi là Cây dầu nóng, cây Kịch nữ chùm tụ tán thuộc họ Polygalaceae, chi *Polygala*, có tên khoa học là *Polygala paniculata* L. Viễn chí lá nhỏ là cây hàng năm, mọc thẳng đứng, phân nhánh, cao đến 40cm, có khi hóa gỗ ở gốc. Rễ có mùi methyl salicylate [1]. Cây Viễn chí thường mọc ở ven đường đi và đất hoang ở các vùng như Đà Lạt, Lạc Dương, Di Linh, Bảo Lộc tỉnh Lâm Đồng. [1], [2].

Trong y học cổ truyền, Viễn chí được sử dụng để trị sổ mũi, chữa đầy hơi, hoặc dùng rễ ngâm cồn hoặc tinh dầu pha cồn để xoa bóp chữa tê thấp, nhức mỏi [2]. Ngoài ra, trong cây Viễn chí còn có rất nhiều hợp chất như saponin, xanthone, coumarin, flavonoid, methyl salicylate có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh, kháng viêm, chống oxy hóa, an thần [3].

Việc thu nhận các hợp chất này cần phải thu hái toàn cây hoặc thu hái rễ, điều này sẽ làm giảm sự phân bố của loài này. Mặt khác, cây chủ yếu phân bố ở Lâm Đồng, do đó sẽ khó khăn trong điều kiện thu hái và vận chuyển.

Do đó, việc nuôi cấy *in vitro* để tạo ra một lượng lớn cây Viễn chí là việc làm cần thiết, định hướng cho những ứng dụng sâu hơn, nâng cao giá trị khoa học và sử dụng phổ biến hơn trong ngành dược đối với loại dược liệu này. Từ đó có thể ứng dụng trồng cây này ở điều kiện khí hậu và địa lý khác nhau, thuận tiện cho việc thu hái và vận chuyển. Thêm vào đó, từ những nghiên cứu bước đầu trong việc tạo mô sẹo sẽ là tiền đề cho việc nuôi cấy dịch treo tế bào trong việc thu

nhận hợp chất thứ cấp như methyl salicylate, xanthone, coumarin...

2. Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Các khúc cắt chồi ngọn được thu từ cây *in vitro* 4 tuần tuổi trên môi trường nuôi cấy MS.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng phát triển chồi

Chồi ngọn được đặt nuôi trong ống nghiệm có 5ml môi trường MS hay môi trường MS có bổ sung chất điều hòa BA ở các nồng độ (0,125mg/l; 0,25 mg/l; 0,5mg/l). Mỗi môi trường nuôi cấy gồm 5 khúc cắt. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các mẫu cấy được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 22°C ± 2°C, độ ẩm 56,4 ± 2,3%, cường độ ánh sáng 2000lux ± 200lux (12/24 giờ). Theo dõi số lượng chồi sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.2 Khảo sát loại và nồng độ auxin lên khả năng phát triển rễ bất định của chồi

Chồi ngọn được đặt nuôi trong ống nghiệm có 5ml môi trường MS hay môi trường MS có bổ sung chất điều hòa IBA 0,25mg/l hoặc NAA ở các nồng độ (0,125; 0,25 hay 0,5mg/l). Mỗi môi trường nuôi cấy gồm 5 khúc cắt. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các mẫu cấy được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 22°C ± 2°C, độ ẩm 56,4 ± 2,3%, cường độ ánh sáng 2000lux ± 200lux (12/24 giờ). Theo dõi số lượng rễ, chiều dài rễ sau 2 tuần nuôi cấy.

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng phát triển chồi
Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS và môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ (0,125mg/l; 0,25 mg/l; 0,5mg/l), chỉ có mẫu cấy chồi ngọn ở nghiệm thức BA 0,5mg/l có sự phát sinh chồi. Sự gia tăng chồi ở nghiệm thức BA 0,5mg/l đạt 3,00 chồi/ mẫu cấy (Bảng 1).

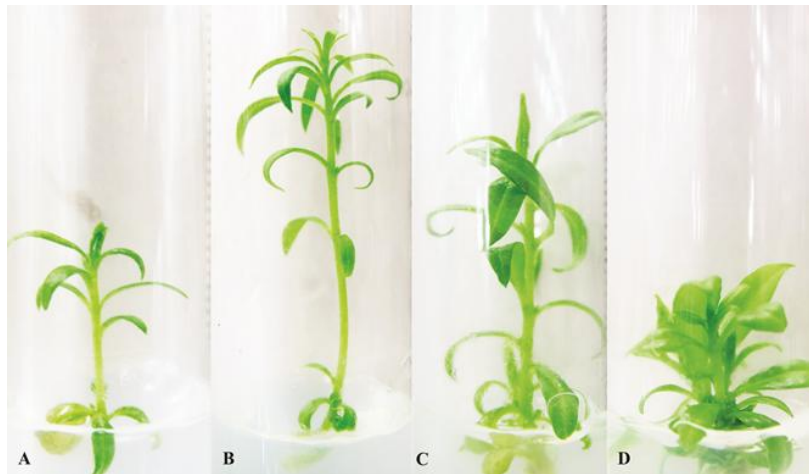
Sự bổ sung cytokinin ở nồng độ 0,5mg/l vào môi trường nuôi cấy làm gia tăng số lượng chồi so với đối chứng và so với BA 0,125mg/l và 0,25 mg/l (Hình 1). Sự bổ sung BA ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy làm tăng kích thước mô phân sinh ngọn chồi, thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp protein và đẩy mạnh quá trình phát triển chồi [4]. Chồi ngọn có mô phân sinh ngọn chồi. Các tế bào vùng mô phân sinh có đặc tính của tế bào có khả năng phát sinh cơ quan: kích thước nhỏ, vách mỏng, tế bào chất đậm đặc, nhân to, hạch nhân đậm màu, ... Các tế bào ở vùng trung tâm mô phân sinh ngọn thực

vật có vai trò như các tế bào gốc ở động vật, không phân hóa, nhưng có khả năng tự làm mới và là nguồn tế bào cho vùng ngoại vi (có khả năng sinh cơ quan) và vùng mô phân sinh lõi (có khả năng sinh mô) [5]. Chính đặc tính này giúp tế bào phân chia mạnh, dẫn đến sự tạo các tế bào dẫn xuất có khả năng tạo cơ quan [6], [7]. Chính vì vậy khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA làm các tế bào mô phân sinh phân chia mạnh để tạo nên các chồi mới.

Bảng 1. Sự phát triển của chồi ngọn *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ.

BA (mg/l)	Số lượng chồi
MS (đối chứng)	1,00 ± 0,00 ^a
0,125	1,10 ± 0,10 ^a
0,25	1,10 ± 0,10 ^a
0,5	3,00 ± 0,60 ^b

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$.



Hình 3.1 Sự phát triển chồi từ khúc cắt chồi ngọn *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ: (A) MS; (B) 0,125mg/l; (C) 0,25 mg/l; (D) 0,5mg/l, thanh ngang 1cm

3.2 Ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin lên khả năng phát triển rễ bất định của chồi

Khả năng hình thành rễ ở cây Viễn chí tùy thuộc vào bản chất và nồng độ của chất điều hòa tăng trưởng thực vật áp dụng [8]. Sau 2 tuần nuôi cấy, số rễ và chiều dài rễ hình thành từ khúc cắt mang chồi cao nhất trong trường hợp áp dụng NAA 0,25mg/l, thấp hơn khi dùng IBA 0,25mg/l, môi trường MS không có sự hình thành rễ (Bảng 2).

Số lượng rễ và chiều dài rễ đối với NAA ở các nồng độ khác nhau cũng khác nhau. Sau 2 tuần nuôi cấy, số rễ hình thành và chiều dài rễ là cao nhất trên môi trường MS với NAA 0,25mg/l, thấp hơn trên môi trường có NAA 0,125mg/l và thấp nhất ở môi trường bổ sung NAA 0,5mg/l (Bảng 3). Sự phát sinh hình thái rễ theo 2 giai đoạn chính: tạo sơ khởi rễ từ các tế bào của tượng tầng hay gần tượng tầng và tăng trưởng sơ khởi rễ. Sự tăng trưởng sơ khởi rễ được kích thích bởi auxin ở nồng độ thấp. Ở nồng độ cao, auxin kích thích tạo sơ

khởi rễ nhưng cản tăng trưởng sơ khởi rễ. Kéo dài rễ cần auxin ở nồng độ thấp hơn [9].

Bảng 2. Sự phát triển rễ từ khúc cắt chồi ngọn *in vitro* sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung các loại auxin

Môi trường	Chiều dài trung bình rễ (mm)	Số lượng rễ/chồi
MS (đối chứng)	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
NAA 0,25 mg/L	6,00 ± 0,00 ^c	3,67 ± 0,88 ^b
IBA 0,25mg/L	1,67 ± 0,33 ^b	1,00 ± 0,50 ^a

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$.

Bảng 3. Sự phát triển rễ từ khúc cắt chồi ngọn *in vitro* sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung NAA ở các nồng độ

Nồng độ NAA (mg/L)	Số lượng rễ/chồi	Chiều dài trung bình rễ (mm)
0,125	2,67 ± 0,67 ^b	3,33 ± 0,66 ^b

0,25	4,33 ± 0,88 ^c	5,70 ± 0,85 ^c
0,5	1,33 ± 0,33 ^a	2,33 ± 1,33 ^a

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$.

4. Kết luận

- Việc bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy thúc đẩy sự phân chia tế bào và làm gia tăng kích thước vùng mô phân sinh ngọn chồi, đặc biệt là vùng bên, thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp protein và đẩy mạnh quá trình phát triển chồi, giúp gia tăng số lượng chồi. Môi trường MS bổ sung BA 0,5mg/l phù hợp cho việc tạo chồi mới từ khúc cắt chồi ngọn.

- Sự hình thành rễ từ khúc cắt chồi ngọn cây *in vitro* trải qua bốn giai đoạn: tạo tế bào hoạt hóa, hình thành vùng tế bào mô phân sinh, hình thành sơ khởi rễ và kéo dài rễ [10]. Việc bổ sung auxin ngoại sinh (IBA 0,25mg/l và NAA 0,25mg/l)

kích thích sự hình thành các tế bào hoạt hóa. Auxin ngoại sinh cùng với auxin nội sinh cảm ứng sự hình thành tế bào hoạt hóa, từ đó hình thành cấu trúc rễ. Đồng thời, việc bổ sung auxin giúp sự chuyển hóa đường, giải phóng năng lượng, cung cấp sườn carbon cho quá trình tổng hợp các chất cần thiết cho sự hình thành và phát triển rễ [11].

- Sự hình thành rễ xảy ra khi bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau (0,125; 0,25 hay 0,5mg/l) vào môi trường nuôi cấy. Chồi được nuôi cấy ở môi trường có NAA 0,25mg/l cho lượng rễ nhiều nhất, trong khi đó ở nồng độ NAA cao hơn (0,5mg/l) lượng rễ giảm. Ở nồng độ cao, auxin kích thích mạnh sự phân chia tế bào, hình thành sơ khởi rễ, tuy nhiên sẽ cản trở trường của sơ khởi rễ. NAA ở nồng độ thấp (0,125 hay 0,25mg/l) cho số lượng rễ nhiều hơn và rễ dài hơn. Sự kéo dài rễ cần auxin ở nồng độ thấp hơn và môi trường MS bổ sung NAA 0,25mg/l phù hợp cho việc phát triển rễ trên khúc cắt chồi ngọn.

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam quyển 2*, NXB Trẻ, Hồ Chí Minh.
2. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y Học, Hà Nội.
3. Freitas C. S. et al. (2007), Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, p. 1413-1419.
4. Bùi Trang Việt (2000), *Sinh lý thực vật đại cương, Phần II: Phát triển*, NXB Đại học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh
5. Laufs P. et al (1998), Cellular parameters of the shoot apical meristem in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 10(8), p. 1375-1389.
6. Davies P. J. (1995), *Plant hormones*, Kluwer Academic Publisher, 833p.
7. Esau K. (1967), *Plant anatomy*, John Wiley & Sons.
8. Waisel Y. et al (2002), *Plant roots – the hidden half*, Marcel Dekker Inc.
9. Bùi Trang Việt (2016), *Sinh lý thực vật đại cương*, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên Tp.HCM.
10. Trần Thanh Hương et al (2009), Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự hình thành rễ bất định từ các khúc cắt mang chồi ở một vài giống chuối (*Musa* sp.), *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 12(9), tr. 23-30.
11. Kranjc A. U. et al (2013), Morphological and physiological changes during adventitious root formation as affected by auxin metabolism: Stimulatory effect of auxin containing seaweed extract treatment, *Agricultura*, 10 (1/2), p. 17-27

Investigating the role of some plant growth regulators on plant tissue culture of *Polygala paniculata* L.

Le Thu Thuy¹, Bui Trang Viet², Tran Thanh Huong²

¹ Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

² Faculty of Biology – Biotechnology, Ho Chi Minh University of Science

Abstract *Polygala paniculata* L. has been used as a folk medicinal in treatment of snivel diseases, flatulency. Moreover, second metabolites saponins, xanthonnes, coumarins, flavonoids, methyl salicylate were extracted from *P. paniculata* L. which can protect from neuronal death, inflammatory, antioxidant. Phytohormones auxins (NAA or IBA) and cytokinin BA were used in propagation *P. paniculata* L. to study adventitious root and shoot organogenesis. The highest percentage of shoot was observed in cuttings treated with 0,5 mg/L BA. Rooting ability of cuttings were significantly by the application of hormone NAA 0,25 mg/L.

Keywords *Polygala paniculata* L., auxins, cytokinin, propagation