

BUỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU SỰ TẠO DỊCH TREO TẾ BÀO CÂY RÊU MÈO *ORTHOSIPHON STAMINEUS* BENTH.

NGUYỄN LÊ TÚ TRÂM*, BÙI TRANG VIỆT**

TÓM TẮT

Mô sẹo *Orthosiphon stamineus* Benth. được tạo ra từ lá cây *in vitro* trên môi trường MS có 2,4-D và sự kết hợp 2,4-D với NAA. Mô sẹo bở và có trọng lượng tươi cao nhất sau 4 tuần nuôi mẫu lá trên môi trường MS có 2,4-D 1mg/L và NAA 1 mg/L. Các mô sẹo này được chuyển sang môi trường MS lỏng có 2,4-D 1 mg/L để duy trì điều kiện tăng trưởng tốt cho sự nuôi cấy dịch treo tế bào *Orthosiphon stamineus* Benth.

ABSTRACT

The study of cell suspension formation in Orthosiphon stamineus Benth.

Callus was obtained from the *in vitro* leaf cultured on MS medium of 2.4-D and combination 2.4-D with NAA. The callus with friability and the highest fresh weight was obtained after 4 weeks on the culture medium of 2.4-D 1 mg/L and NAA 1 mg/L. and found on the leaf samples on MS medium supplemented with 2.4-D 1 mg/L and NAA 1 mg/L. The callus was moved to the weaker MS medium of 2.4-D 1 mg/L to maintenance the optimum growth condition for the formation of cell suspension of *Orthosiphon stamineus* Benth.

1. Mở đầu

Cây râu mèo (*Orthosiphon stamineus* Benth.) là cây thuốc phổ biến ở Nam Châu Á và mọc tốt trên vùng đất ẩm. Lá râu mèo được sử dụng làm trà uống có công dụng trong điều trị bệnh viêm thận, sỏi thận và sỏi mật (Mat-Salleh và Latiff, 2002). Flavonoid hiện diện nhiều ở lá râu mèo, là một trong những hợp chất quan trọng trong hoạt động lợi tiểu và kháng khuẩn (Schut và Zwaving, 1993).

Cùng với sự thu nhận các hợp chất thứ cấp từ nguồn thực vật trong tự nhiên, kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*, đặc biệt nuôi cấy tế bào là một trong những phương pháp hữu hiệu trong vi nhân giống cũng như cô lập các hợp chất thứ cấp như flavonoid. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả bước đầu nghiên cứu sự tạo dịch treo tế bào và thu nhận dòng tế bào để dùng làm vật liệu li trích và thu nhận flavonoid.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Lá của cây râu mèo *in vitro* 4 tuần tuổi được nuôi từ khúc cắt mang chồi ngủ trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962).

* CN, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TPHCM

** PGS TS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TPHCM

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tạo mô sẹo từ lá cây *in vitro*

Lá non của cây râu mèo được tạo những vết thương thẳng góc với gân lá và đặt vào các môi trường MS có bổ sung 2,4-D riêng lẻ (0,5; 1; 1,5 mg/L) và sự kết hợp 2,4-D (0,5; 1; 1,5 mg/L) với NAA (1 mg/L), với 30 g/l đường, 7,5 g/l agar, pH 5,8.

Các mẫu lá được nuôi cấy ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng $2\,500 \pm 500$ lux, ẩm độ 70%.

Theo thời gian nuôi cấy mô sẹo, đánh giá khả năng tạo mô sẹo của lá râu mèo, sự gia tăng trọng lượng tươi sau 4 tuần nuôi cấy và chọn môi trường thích hợp cho sự tạo mô sẹo. Giải phẫu mẫu cây tạo sẹo từ lá sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường tạo sẹo, nhuộm 2 màu và quan sát dưới kính hiển vi. Ghi nhận nguồn gốc phát sinh mô sẹo.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.2. Tạo dịch treo tế bào

Chuyển 1 g mô sẹo xộp (mô sẹo mềm và dễ tách rời) 4 tuần tuổi từ môi trường tạo sẹo tốt nhất vào erlen 50 ml có chứa 10 ml môi trường lỏng MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L và NAA 1 mg/L hay MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L với 30 g/l đường pH 5,8.

Các erlen được đặt trên máy lắc với vận tốc 80 vòng/phút, ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, điều kiện ánh sáng $1\,000 \pm 200$ lux với ẩm độ 70%.

Quan sát sự thay đổi hình thái của tế bào dịch treo ở các giai đoạn tăng trưởng. Dịch treo tế bào được cấy chuyển sau mỗi 2 tuần. Đường cong tăng trưởng của dịch treo tế bào được xác định theo thể tích tế bào lắng.

2.2.3. Đo cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của dịch treo tế bào được đo bằng phương pháp áp kế Warburg, ở 25°C .

2.2.4. Xử lý thống kê

Kết quả thí nghiệm được phân tích bằng chương trình SPSS (Statistical Program Scientific System) dùng cho Window phiên bản 11.5. Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 95% của giá trị được thể hiện bởi các chữ cái kèm theo, so sánh được thực hiện trong cùng một cột.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tạo mô sẹo từ lá cây *in vitro*

Các mẫu cấy lá từ cây râu mèo *in vitro* trên các môi trường MS có bổ sung chất điều hòa tăng trưởng thực vật khác nhau đều đáp ứng sau 5 ngày nuôi cấy. Các lá đều phình to ra, tế bào mô sẹo xuất hiện xung quanh vị trí vết thương và gân lá trên các môi trường.

Sau 3 - 4 tuần nuôi cấy, tất cả mẫu cây trên các loại môi trường đều tạo được sẹo. Mẫu cấy lá trên môi trường có bổ sung 2,4-D (0,5; 1 hoặc 1,5 mg/L) cho mô

seo mềm, mọng nước, rời ở phần bên ngoài, tăng sinh rất nhanh (ảnh 2) nhưng dễ hóa nâu và chết sau khoảng 4 tuần. Trên môi trường có bổ sung 2,4-D 0,5 mg/L có xuất hiện rễ trên mô seo.

Đối với mẫu cây lá trên môi trường có bổ sung 2,4-D (0,5; 1 hoặc 1,5 mg/L) kết hợp với NAA 1 mg/L cho mô seo xốp, bở có màu vàng, trắng nhạt (ảnh 2). Sau 5–6 tuần nuôi cấy, mô seo không được chuyển sang môi trường mới sẽ bị hóa nâu và chết.

Bảng 1 cho thấy sự hình thành mô seo khác nhau trên các môi trường sau 4 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ tạo mô seo xốp, dễ tách rời nhất là ở môi trường MS có bổ sung kết hợp 2,4-D 1 mg/l và NAA 1 mg/l. Đây là môi trường thích hợp để tạo mô seo dùng làm nguyên liệu để tạo dịch treo tế bào, do mô seo ở dạng xốp, dễ phóng thích tế bào vào môi trường lỏng.

Thông thường, 2,4-D hoặc NAA được sử dụng làm nguồn auxin ngoại sinh cho sự hình thành mô seo ở các loài thực vật (Dixon và Gonzales, 1994; Hsia và Korbam, 1996; Morita và cs., 1999). Nhưng đối với loài cây râu mèo, điều kiện cảm ứng tạo seo tốt nhất ở các mẫu lá và thân là sử dụng kết hợp 2,4-D với NAA (Lee Wai-Leng & Chan Lai-Keng, 2004). Nói chung, việc cảm ứng tạo seo thường đòi hỏi sự điều chỉnh tỷ lệ giữa auxin và cytokinin. Điều này là cần thiết cho sự cảm ứng và phát triển mô seo (George & Sherrington, 1984). Ví dụ như trường hợp của *Eurycoma longifolia*, trong môi trường nuôi cấy tạo mô seo có sự kết hợp giữa NAA và BA (Singaram & Teo, 1994). Một trong những nghiên cứu sơ bộ ban đầu, chúng tôi nhận thấy cytokinin không thích hợp trong sự cảm ứng tạo seo của cây râu mèo.

Đồng thời, sự gia tăng trọng lượng tươi của các mẫu cây cũng khác nhau trên các môi trường được thể hiện ở bảng 2. Trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1,5 mg/L hay MS bổ sung 2,4-D 1 mg/L và NAA 1 mg/L, mô seo tăng sinh khối nhanh và có trọng lượng tươi cao nhất sau 4 tuần nuôi cấy. Mô seo trên các môi trường còn lại có sự gia tăng trọng lượng tươi thấp hơn.

Bảng 1. Sự phát sinh của mô seo trên các môi trường sau 4 tuần nuôi cấy

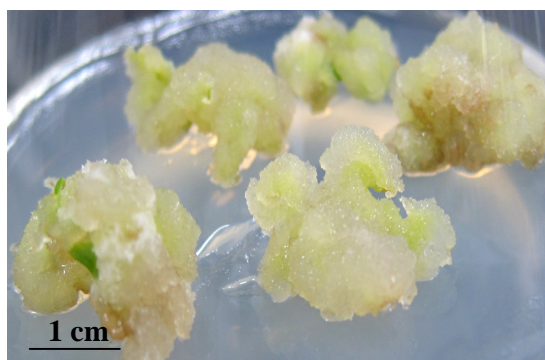
Môi trường	Mô seo xốp (%)	Mô seo cứng (%)
MS + 2,4-D 0,5 mg/L	22,00 ± 1,73 ^a	78,00 ± 1,73 ^f
MS + 2,4-D 1 mg/L	50,00 ± 3,33 ^c	50,00 ± 3,33 ^d
MS + 2,4-D 1,5 mg/L	76,66 ± 3,33 ^c	23,34 ± 3,33 ^b
MS + 2,4-D 0,5 mg/L + 1 mg/L NAA	28,88 ± 3,85 ^b	71,12 ± 3,85 ^e
MS + 2,4-D 1 mg/L + 1 mg/L NAA	84,44 ± 1,92^f	15,56 ± 1,92^a
MS + 2,4-D 1,5 mg/L + 1 mg/L NAA	58,88 ± 1,92 ^d	41,12 ± 1,92 ^c

(Các giá trị trung bình theo sau không cùng mẫu tự trong cùng một cột có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05)

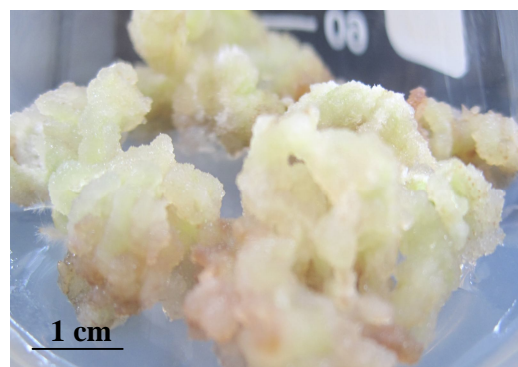
Bảng 2. Trọng lượng tươi của mô sẹo trên các môi trường sau 4 tuần nuôi cấy

Môi trường	Trọng lượng tươi (g)
MS + 2,4-D 0,5 mg/L	2,16 ± 0,04 ^a
MS + 2,4-D 1 mg/L	2,31 ± 0,15 ^a
MS + 2,4-D 1,5 mg/L	2,71 ± 0,13^c
MS + 2,4-D 0,5 mg/L + 1 mg/L NAA	2,25 ± 0,05 ^a
MS + 2,4-D 1 mg/L + NAA 1 mg/L	2,76 ± 0,06^c
MS + 2,4-D 1,5 mg/L + NAA 1 mg/L	2,53 ± 0,03 ^b

(Các giá trị trung bình theo sau không cùng mẫu tự trong cùng một cột có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05)



Ảnh 1. Mô sẹo từ lá cây rau mề in vitro trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 0,5 mg/L và NAA 1 mg/L



Ảnh 2. Mô sẹo từ lá cây rau mề in vitro trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L

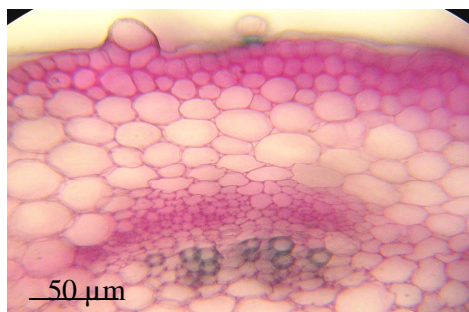
❖ **Nguồn gốc phát sinh mô sẹo từ lá**

Quan sát lát cắt ngang vùng gân lá tạo sẹo trên môi trường MS có bổ sung chất điều hòa tăng trưởng thực vật khác nhau ở các nghiệm thức, nhận thấy sự tạo mô sẹo bắt đầu từ sự phân chia của các tế bào nhu mô gân vùng libe. Trước tiên là sự phân chia theo hướng ngang của một số tế bào nhu mô ở giữa các bó libe mạch (ảnh 4).

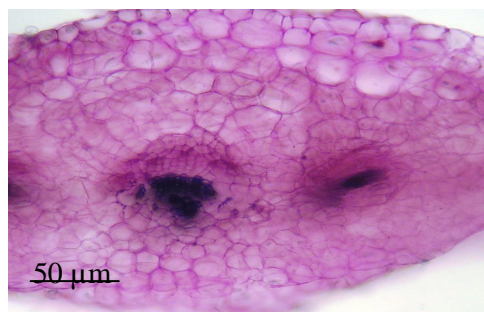
Hiện tượng phân chia tế bào xảy ra đều khắp mô cấy lá được nuôi trên môi trường có bổ sung 2,4-D (0,5; 1 hoặc 1,5 mg/L) kết hợp với NAA 1 mg/L. Sự phân chia tế bào bắt đầu xảy ra ở các tế bào nhu mô ở giữa các bó libe mạch. Sau đó, các tế bào nhu mô vỏ ở gần và xa vùng tế bào nhu mô đang phân chia cũng phân chia mạnh cùng với các tế bào nhu mô libe. Chính vì vậy, các mẫu cấy lá tăng trưởng đều và dày lên sau 2 tuần nuôi cấy.

Ngược lại, trên môi trường chỉ có 2,4-D riêng lẻ, sự tạo mô sẹo thường bắt đầu nơi các vết cắt thẳng góc với gân lá và tiếp tục phân chia mạnh ở vùng này. Trong trường hợp này, sự phân chia tế bào bắt đầu xảy ra ở các tế bào nhu mô gân vùng

libe như trường hợp trên. Tuy nhiên, sau đó chỉ có các tế bào nhu mô vỏ gần vùng tế bào nhu mô libe phân chia mạnh cùng với các tế bào nhu mô libe. Quan sát bằng mắt thường có thể thấy sự lớn dần của khối mô sẹo nơi gần các vết thương.



Ảnh 3. Lát cắt ngang vùng gân lá ở ngày 0 trên môi trường tạo sẹo MS với 2,4-D 1 mg/L và NAA 1 mg/L



Ảnh 4. Lát cắt ngang vùng gân lá sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường tạo sẹo MS với 2,4-D 1 mg/L và NAA 1 mg/L

3.2. Tạo dịch treo tế bào

Việc chuyển mô sẹo 4 tuần tuổi từ môi trường đặc (MS có 2,4-D 1 mg/L và NAA 1 mg/L) sang môi trường lỏng và đem nuôi cấy trên máy lắc đã tạo nên một sự thay đổi về mặt sinh lý. Các tế bào có khuynh hướng tách rời nhau sau 3 ngày nuôi cấy, khả năng này có thể liên quan đến đặc tính ban đầu của mô sẹo là mô sẹo xốp, dễ tách rời. Sự phóng thích các nhóm tế bào và tế bào đơn từ mô sẹo vào môi trường lỏng được thấy rõ sau 1 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, các cụm tế bào này chỉ thật sự thích nghi với môi trường sau khoảng 4 tuần nuôi cấy. Lúc này, sự phân chia tế bào bắt đầu xảy ra mạnh. Trong thời gian đầu, các nhóm tế bào trên cả 2 loại môi trường đều có kích thước nhỏ, vách mỏng và rỗng, có chứa các hạt tinh bột, khó xác định rõ nhân và tế bào chất khi được quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi (ảnh 5).

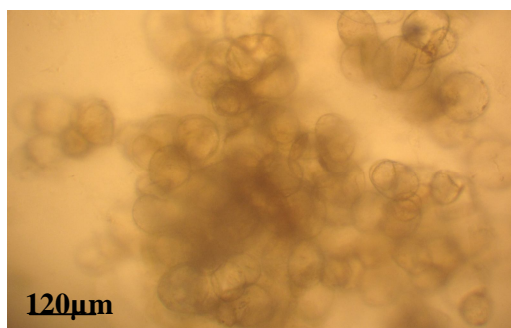
Sau 4 tuần nuôi cấy, các nhóm tế bào phân chia mạnh và có sự gia tăng sinh khối. Tiến hành cấy chuyển 1 ml tế bào lỏng trên cả 2 loại môi trường sang môi trường mới có thành phần tương tự. Quan sát hình thái cho thấy tế bào trong giai đoạn này vẫn có những đặc tính như lúc mới chuyển từ mô sẹo sang (tế bào nhỏ, vách mỏng, không thấy rõ nhân và tế bào chất).

Trên cả 2 môi trường, sự phân chia tế bào xảy ra ở ngày thứ 3 và bắt đầu có sự tăng nhẹ ở ngày thứ 6. Tiếp tục như vậy, các tế bào trên cả 2 môi trường tăng trưởng rất nhanh cho đến ngày thứ 15. Đến ngày thứ 18, sự tăng trưởng tế bào chậm dần hoặc ngừng tăng trưởng, thường do các yếu tố cần thiết trong môi trường dinh dưỡng đã cạn kiệt hoặc môi trường trở nên độc đối với tế bào (Mai Trần Ngọc Tiếng, 2001).

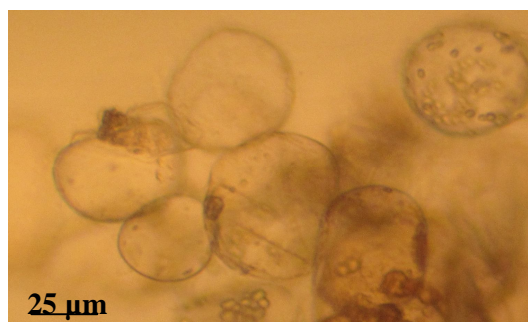
Với cùng mật độ ban đầu, tế bào dịch treo trong môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L tăng trưởng với tốc độ nhanh hơn tế bào dịch treo trong môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L kết hợp với NAA 1 mg/L.

Tiến hành đo thể tích tế bào lắng sau mỗi 3 ngày, nhận thấy đường cong tăng trưởng có dạng chữ S gồm 3 giai đoạn sau:

- Giai đoạn tăng trưởng chậm từ ngày 0 đến ngày 9;
- Giai đoạn tăng trưởng nhanh từ ngày 9 đến ngày 15;
- Giai đoạn giảm tăng trưởng hay ngừng tăng trưởng từ ngày 15 đến ngày 21.



Ảnh 5. Giai đoạn phân chia và tạo nhóm tế bào sau 4 tuần nuôi cấy

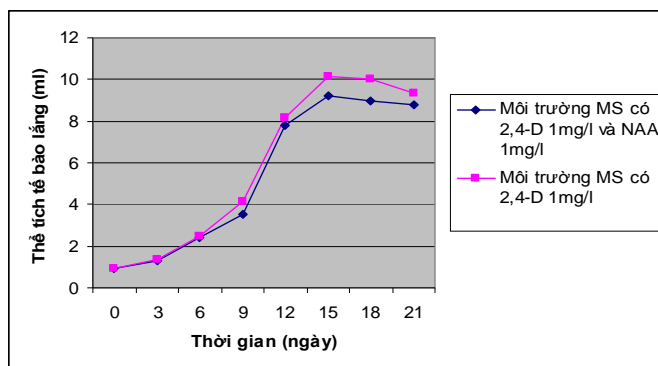


Ảnh 6. Các tế bào cô lập của dịch treo tế bào trong môi trường MS có 2,4-D 1 mg/L

Bảng 3. Sự tăng trưởng dịch treo tế bào trong môi trường MS có 2,4-D 1 mg/L với NAA 1 mg/L và môi trường MS có 2,4-D 1 mg/L theo thời gian

Thời gian (ngày)	Thể tích tế bào lắng (ml)	
	Môi trường MS với 2,4-D 1 mg/l và NAA 1 mg/L	Môi trường MS với 2,4-D 1 mg/L
0	0,90 ± 0,05 ^a	0,93 ± 0,03 ^a
3	1,30 ± 0,10 ^b	1,33 ± 0,11 ^b
6	2,41 ± 0,76 ^c	2,50 ± 0,10 ^c
9	3,53 ± 0,15 ^d	4,13 ± 0,15 ^d
12	7,80 ± 0,10 ^e	8,16 ± 0,15 ^e
15	9,23 ± 0,15^h	10,15 ± 0,05^g
18	9,00 ± 0,10 ^g	10,00 ± 0,10 ^g
21	8,80 ± 0,10 ^f	9,36 ± 0,15 ^f

(Các giá trị trung bình theo sau không cùng mẫu tự trong cùng một cột có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05)



Hình 1. Đường cong tăng trưởng của dịch treo tế bào trong môi trường MS bổ sung 2,4-D 1 mg/L với NAA 1 mg/L và môi trường MS bổ sung 2,4-D 1 mg/L theo thời gian.

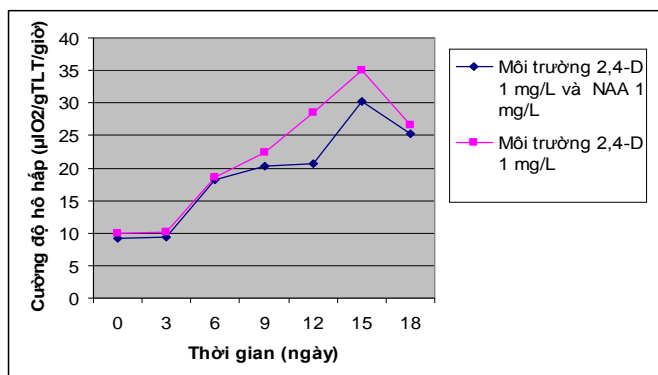
3.3. Sự thay đổi cường độ hô hấp của dịch treo tế bào qua các giai đoạn tăng trưởng

Cường độ hô hấp của dịch treo tế bào trên 2 loại môi trường có sự thay đổi gần giống nhau. Cường độ hô hấp của dịch treo tế bào ổn định trong giai đoạn tế bào tăng trưởng chậm, tăng đột ngột khi bước vào giai đoạn tế bào tăng trưởng mạnh và sau đó giảm nhẹ ở giai đoạn tế bào giảm hay ngừng tăng trưởng (bảng 4). Đường biểu diễn cường độ hô hấp cho thấy có sự tương ứng với đường cong tăng trưởng của dịch treo tế bào (hình 2).

Bảng 4. Sự thay đổi cường độ hô hấp của dịch treo tế bào trong môi trường MS bổ sung 2,4-D 1 mg/L với NAA 1 mg/L và MS bổ sung 2,4-D 1 mg/L theo thời gian

Thời gian (ngày)	Cường độ hô hấp ($\mu\text{LO}_2/\text{gTLT}/\text{giờ}$)	
	Môi trường MS với 2,4-D 1 mg/L và NAA 1 mg/L	Môi trường MS với 2,4-D 1 mg/L
0	$9,19 \pm 0,15^a$	$10,00 \pm 0,03^a$
3	$9,46 \pm 0,15^a$	$10,15 \pm 0,05^a$
6	$18,10 \pm 0,10^b$	$18,55 \pm 0,05^b$
9	$20,26 \pm 0,15^c$	$22,43 \pm 0,05^c$
12	$20,70 \pm 0,26^d$	$28,56 \pm 0,11^e$
15	$30,26 \pm 0,05^f$	$35,10 \pm 0,10^f$
18	$25,20 \pm 0,26^e$	$26,63 \pm 0,05^d$

(Các giá trị trung bình theo sau không cùng mẫu tự trong cùng một cột có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05)



Hình 2. Sự thay đổi cường độ hô hấp của dịch treo tế bào trong môi trường MS với 2,4-D 1 mg/L kết hợp NAA 1 mg/L và MS với 2,4-D 1 mg/L theo thời gian

4. Kết luận

Môi sẹ 4 tuần tuổi của cây râu mèo (*Orthosiphon stamineus Benth.*) nuôi trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L và NAA 1 mg/L là vật liệu tốt nhất để tạo dịch treo tế bào.

Môi trường lỏng MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L là môi trường tốt để duy trì sự tăng trưởng tế bào, từ đó có thể làm nguồn vật liệu thu nhận flavonoid bằng các phương pháp ly trích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mai Trần Ngọc Tiếng (2001), *Thực vật cấp cao*, Nxb Đại học Quốc gia TP HCM, tr. 45-61, tr. 183-193.
2. Dixon R. A. & Gonzales R. A. (1994), *Plant Cell Culture: A Practical Approach 2nd edn.*, 10, Oxford University Press, New York.
3. George E. F. & Sherrington P. D. (1984), *Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories*, (289), Exegetics Ltd., UK.
4. Hsia C. & Korban S. S. (1996), *Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of Rosa hybrida and Rosa chinesis minima*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, (44), pp. 1-6.
5. Lee Wai-Leng & Chan Lai Keng (2004), *Establishment of Orthosiphon stamineus cell suspension culture for cell growth*, *Plant Cell, Tissue and Organ culture* (78), pp. 101-106.
6. Mat-Salleh K. & Latiff A. (2002), *Tumbuban Ubatan Malaysia*, (524), University Kebangsaan Malaysia, Bangi, Malaysia.

7. Morita M., Xing X. H. and Unno H. (1999), *Synchronized shoot regeneration of rice (Oriza sativa L.) calli on solid medium by adjustment of intracellular 2,4-dichloro phenoxyacetic acid concentration*, Plant Cell Rep. (18), pp. 633-639.
8. Murashige & Skoog (1962), *A revised medium for a rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*, Physiol. Plant (15), pp. 473-479.
9. Schut G. A., & Zwaving J. H. (1993), *Pharmacological investigation of some lipophilic flavonoids from Orthsiphon aristatus*, Fitoterapia, (64), pp. 99-102.
10. Singaram N. & Teo C. K. H. (1994), *Factors affecting the biomass production of Tongkat Ali (Eurycoma longifolia)*, Malays. Appl. Biol. 22(2), pp. 197-203.