

# SỰ HÌNH THÀNH MÔ SẸO, PHÔI VÀ CÂY CON Ở CÂY MỎ QUẠ *IN VITRO* (*DISCHIDIA RAFFLESIANA* WALL.)

Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Dischidia rafflesiana* Wall. is a medicinal plant of Asclepiadaceae subfamily (Apocynaceae family). In vitro propagation of *Dischidia rafflesiana* Wall. was conducted through calli, somatic embryos and plantlets. Two experiments were carried out on plant growth regulators auxin and cytokinin. The results showed that induction of calli from young stem segments achieved 100% on MS medium (Murashige và Skoog, 1962) supplemented with 2,4-D 0.5, 1, and 1.5 mg/l in combination with 1 mg/l BA after 30 days cultured. Transfer of these calli to MS medium added with NAA and BA resulted in successful somatic embryogenesis. Plantlet formation observed on MS medium supplemented with 2 mg/l BA and NAA 0.05 mg/l and 0.1 mg/l, at rate of 12.5% and 25% respectively.

**Keywords:** *Dischidia rafflesiana* Wall., in vitro propagation, calli, somatic embryo, plantlet

**Title:** Formation of calli, embryos and plantlets in *Dischidia rafflesiana* Wall. In vitro

## TÓM TẮT

Cây Mỏ Quạ (*Dischidia rafflesiana* Wall.) là loài cây thảo dược thuộc họ phụ Bông tai (Asclepiadoidaceae), họ Apocynaceae Nhân giống in vitro cây Mỏ Quạ được tiến hành thông qua sự hình thành mô sẹo, phôi vô tính và cây con. Hai thí nghiệm được thực hiện trên auxin và cytokinin. Kết quả nghiên cứu đã đạt được sự hình thành mô sẹo từ đoạn thân non của cây Mỏ Quạ với tỷ lệ 100% sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) bổ sung 2,4-D nồng độ 0,5, 1 và 1,5 mg/l kết hợp BA 1 mg/l. Sau khi chuyển sang môi trường có bổ sung NAA kết hợp với BA, mô sẹo có khả năng phát sinh phôi vô tính. Sự hình thành cây con đạt được trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA kết hợp với NAA nồng độ 0,05 mg/l và 0,1 mg/l, với tỷ lệ tương ứng là 12,5% và 25% ở 30 ngày sau khi cấy.

**Từ khóa:** *Dischidia rafflesiana* Wall., nhân giống in vitro, mô sẹo, phôi vô tính, cây con

## 1 GIỚI THIỆU

Cây Mỏ Quạ (*Dischidia rafflesiana* Wall.) còn có tên gọi là dây Tô Kiến (Ant plant), là một loài thực vật thuộc họ phụ Bông tai (Asclepiadoidaceae), họ Apocynaceae. Trong dân gian, cây Mỏ Quạ được dùng để chữa trị các bệnh tê, đau nhức tay chân, dạ dày, ho, rắn độc cắn (Đỗ Huy Bích *et al.*, 2003). Hiện nay, cây Mỏ Quạ được dùng để làm rượu thuốc với quy mô sản xuất lớn. Nguồn vật liệu để sản xuất rượu Mỏ Quạ chủ yếu do người dân khai thác trong rừng bao gồm rễ, thân, lá, sau đó đem bán cho nơi sản xuất. Sự khai thác quá mức có thể dẫn đến nguy cơ tuyệt chủng loài cây này.

<sup>1</sup> Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Trong các phương pháp nhân giống thì nhân giống *in vitro* hay vi nhân giống dễ đạt hệ số nhân giống cao, tạo số lượng lớn cây con trong thời gian ngắn, vì vậy có thể đáp ứng nhu cầu tiêu dùng và giảm vấn đề khai thác tự nhiên. Trong vi nhân giống, hệ thống biến đổi thành cây thông qua kỹ thuật tạo mô sẹo và tạo phôi vô tính đã rất có hiệu quả, cho hệ số nhân giống rất cao. Kỹ thuật này đã được phát triển ở rất nhiều loài thực vật như cây hoa hồng (Marchant *et al.*, 1996), cây đậu ván đại (Luo *et al.*, 1999), cây thuộc họ huệ tây *Agapanthus praecox* (Suzuki *et al.*, 2002), *Hylomecon vernalis* (Kim *et al.*, 2003),... tuy nhiên trên cây Mỏ Quạ thì vẫn chưa được nghiên cứu. Vì vậy, đề tài “Sự hình thành mô sẹo, phôi và cây con ở cây Mỏ Quạ *in vitro* (*Dischidia rafflesiana* Wall.) được thực hiện nhằm mục đích xác định môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thích hợp cho sự hình thành mô sẹo, phôi và cây con trong nghiên cứu về quy trình vi nhân giống cây này.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Vật liệu

Cây Mỏ Quạ (*Dischidia rafflesiana* Wall.) thu thập từ rừng Phú Quốc, Kiên Giang được trồng và chăm sóc tại nhà lưới Trại Nghiên cứu và Thực nghiệm nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2 Phương pháp

#### 2.2.1 Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường đa vi lượng theo Murashige và Skoog (1962), ký hiệu là MS. Tùy theo các thí nghiệm có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật 2,4-D, NAA và BA. Môi trường được khử trùng bằng nồi hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong 20 phút.

#### 2.2.2 Khử trùng mẫu cấy

Mẫu thân non thu từ nhà lưới được rửa dưới vòi nước, ngâm trong nước rửa chén (hiệu Sunlight vit E) 10 phút và được rửa sạch bằng nước máy. Tiếp theo mẫu được tiến hành khử trùng bề mặt trong tủ cấy vô trùng theo các bước: ngâm mẫu bằng dung dịch Clorox 20% trong 15 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Sau đó, mẫu được ngâm trong dung dịch Clorua thủy ngân (HgCl<sub>2</sub>) 0,05% 10 phút, rửa bằng nước cất vô trùng 5 lần.

#### 2.2.3 Các thí nghiệm

- (a) Thí nghiệm 1: Hiệu quả của 2,4-D và BA lên sự hình thành mô sẹo từ đoạn thân non

Mẫu thân non sau khi đã khử trùng được cắt ra thành những đoạn nhỏ, kích thước 1 cm và cấy vào môi trường MS có bổ sung các nồng độ khác nhau của 2,4-D và BA.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố với 16 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức có 4 lần lặp lại. Một lần lặp lại là 2 keo tương ứng với 1 mẫu cây/keo.

**Bảng 1: Các nồng độ 2,4-D và BA được bố trí trong thí nghiệm 1**

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Nồng độ BA (mg/l)			
	0	0,5	1	1,5
0	NT1	NT5	NT9	NT13
0,5	NT2	NT6	NT10	NT14
1	NT3	NT7	NT11	NT15
1,5	NT4	NT8	NT12	NT16

Chú thích: *Nghiệm thức (NT)*

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ % mẫu tạo mô sẹo.

(b) Thí nghiệm 2: Hiệu quả của NAA và BA lên sự hình thành phôi và cây con

Mô sẹo được tách thành cụm (kích thước 5 x 5 mm) và cấy vào môi trường MS có bổ sung các nồng độ NAA và BA khác nhau.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố với 16 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức có 4 lần lặp lại. Một lần lặp lại là 2 keo tương ứng với 1 mẫu cấy/keo.

**Bảng 2: Các nồng độ NAA và BA được bố trí trong thí nghiệm 2**

Nồng độ NAA (mg/l)	Nồng độ BA (mg/l)			
	0	1	2	3
0	NT1	NT5	NT9	NT13
0,05	NT2	NT6	NT10	NT14
0,1	NT3	NT7	NT11	NT15
0,15	NT4	NT8	NT12	NT16

Chú thích: *Nghiệm thức (NT)*

Chỉ tiêu theo dõi: Sự biến đổi cấu trúc và màu sắc của mô sẹo, tỷ lệ tạo phôi vô tính và biến đổi thành cây con.

#### 2.2.4 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel và phần mềm thống kê MSTATC, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

Các số liệu là tỷ lệ phần trăm biến động từ 0-100% được chuyển đổi sang dạng  $\text{Arcsin}\sqrt{x}$  (Gomez và Gomez, 1984).

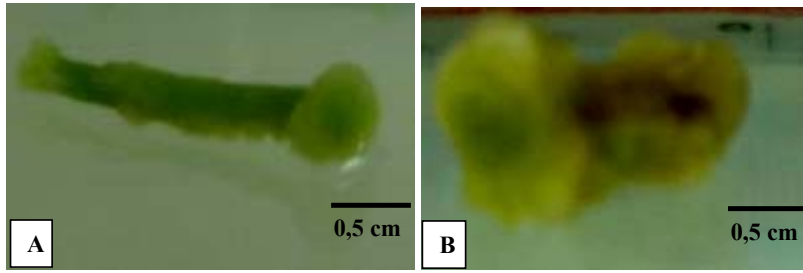
### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Hiệu quả của 2,4-D và BA và lên sự hình thành mô sẹo từ đoạn thân non

Sau 10 ngày nuôi cấy, đoạn thân bắt đầu cảm ứng hình thành mô sẹo ở mép cắt hai đầu và phân tiếp xúc với môi trường, sau đó mô sẹo phát triển rộng ra tạo thành một khối có màu vàng nhạt, mềm, có dạng rời (Hình 1).

Kết quả bảng 3 cho thấy ở 30 ngày sau khi cấy (NSKC), sự bổ sung 2,4-D và BA, cũng như tương tác giữa các nồng độ của 2,4-D và BA có hiệu quả khác biệt ở mức ý nghĩa 1% lên sự tạo mô sẹo từ đoạn thân non cây Mỏ Quạ. Tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 100%, không khác biệt giữa các nghiệm thức bổ sung 2,4-D nồng độ 0,5, 1 và 1,5 mg/l kết hợp với 0,5 mg/l BA, nhưng có khác biệt có ý nghĩa ở mức 1% so với

các nghiệm thức khác. Môi trường không có bổ sung 2,4-D hoặc chỉ bổ sung 2,4-D đơn hay BA đơn không có sự tạo mô sẹo.



Hình 1: Đoạn thân cảm ứng tạo mô sẹo ở 10 NSKC (A) và cấu trúc mô sẹo ở 30 NSKC (B)

Bảng 3: Hiệu quả của 2,4-D và BA lên tỷ lệ tạo mô sẹo (%) ở thời điểm 30 ngày sau khi cấy

2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)				Trung bình
	0	0,5	1	1,5	
0	0,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>b</sup>
0,5	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>	37,5 <sup>bc</sup>	62,5 <sup>b</sup>	50,0 <sup>a</sup>
1	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>	62,5 <sup>b</sup>	25,0 <sup>cd</sup>	46,9 <sup>a</sup>
1,5	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>	37,5 <sup>bc</sup>	25,0 <sup>cd</sup>	40,6 <sup>a</sup>
<b>Trung bình</b>	0,0 <sup>c</sup>	75,0 <sup>a</sup>	34,4 <sup>b</sup>	28,1 <sup>b</sup>	
<b>F<sub>BA</sub></b>				**	
<b>F<sub>2,4D</sub></b>				**	
<b>F<sub>BAx2,4D</sub></b>				**	
<b>CV (%)</b>				46,8	

Ghi chú: Những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5%. (\*\*): Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

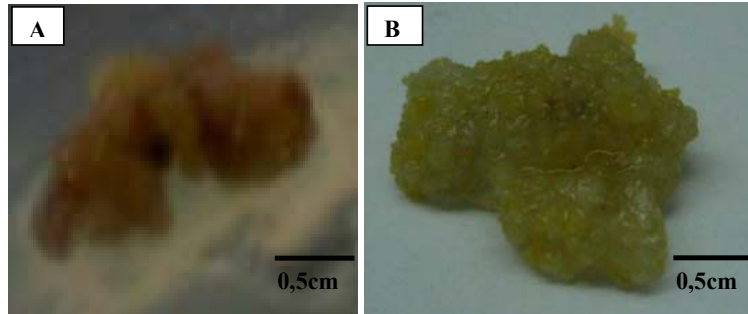
Việc kích thích tạo mô sẹo cần sự hiện diện của auxin trong môi trường nuôi cấy với loại và nồng độ khác nhau tùy thuộc vào vật liệu nuôi cấy. Đa số mẫu vật thuộc nhóm song tử diệp không có khả năng tạo mô sẹo trong môi trường chỉ có auxin mà cần phải có một sự phối hợp giữa auxin và cytokinin. Kết quả thí nghiệm này cho thấy sự cảm ứng tạo mô sẹo từ đoạn thân non cây Mỏ Quạ cần thiết sử dụng kết hợp giữa 2,4-D và BA. Hiệu quả phối hợp giữa 2,4-D và BA trong sự cảm ứng tạo mô sẹo đã được nghiên cứu trên nhiều loài như mô lá non của cây *Dianthus caryophyllus* L. cảm ứng tạo mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l 2,4-D và 0,2 mg/l BA (Karami, 2008). Chồi cây *Monordica charantia* L. phát sinh mô sẹo tối ưu trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA kết hợp với 0,5 mg/l 2,4-D và 3% sucrose (Yi *et al.*, 2009). Mầm chồi của gừng (*Zingiber officinale* Rosc.) được cảm ứng tạo mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D và 1 mg/l BA (Josue *et al.*, 1991).

Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường MS bổ sung 2,4-D nồng độ 0,5, 1 và 1,5 mg/l kết hợp với BA 0,5 mg/l có hiệu quả lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu cây đoạn thân non của cây Mỏ Quạ, đạt tỷ lệ 100% sau 30 ngày nuôi cấy. Mô sẹo màu vàng nhạt, mềm, có dạng rời.

### 3.2 Hiệu quả của NAA và BA lên sự hình thành phôi và cây con

#### 3.2.1 Sự biến đổi cấu trúc, màu sắc của mô sẹo và sự hình thành phôi vô tính

Kết quả ghi nhận được sau 10 ngày nuôi cấy, mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 0,05 mg/l NAA + 2 mg/l BA có sự biến đổi màu sắc từ vàng nhạt sang vàng sậm (Hình 2A), trong khi mô sẹo trên môi trường bổ sung 0,1 mg/l NAA + 2 mg/l BA chuyển sang màu vàng xanh (Hình 2B).

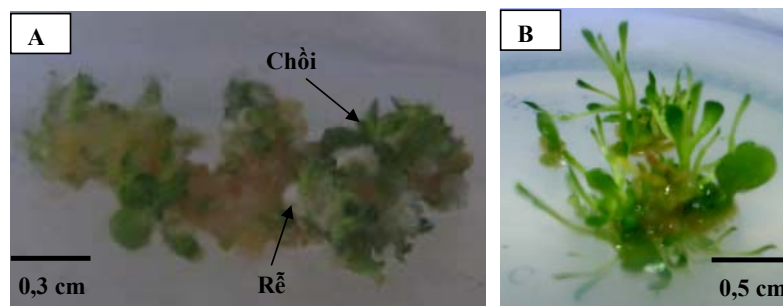


**Hình 2:** Cấu trúc mô sẹo trên môi trường MS + 0,05 mg/l NAA + 2 mg/l BA (A) và môi trường MS + 0,1 mg/l NAA + 2 mg/l BA ở 10 NSKC

Cấu trúc mô sẹo trên hai môi trường MS bổ sung 0,05 mg/l NAA + 2 mg/l BA và môi trường 0,1 mg/l NAA + 2 mg/l BA có sự hình thành phôi vô tính được quan sát dưới kính nhìn nổi (Hình 3). Chồi xuất hiện ở thời điểm 30 NSKC. Đến 120 NSKC, số lượng cây tái sinh từ mô sẹo phát sinh phôi trên hai môi trường này tăng lên rất nhiều (Hình 4).



**Hình 3:** Sự tái sinh cây từ phôi vô tính quan sát dưới kính nhìn nổi: Phôi cầu (A), phôi trái tim (B), phôi ngư lôi (C) ở độ phóng đại 40X (mỗi vạch 0,25 mm) và chồi (D) ở độ phóng đại 20X (mỗi vạch 0,048 mm)



**Hình 4:** Cây con Mỏ Quạ tái sinh trên môi trường MS + 0,1 mg/l NAA + 2 mg/l BA ở 50 NSKC (A) và 120 NSKC (B)

3.2.2 Tỷ lệ (%) tạo phôi vô tính và tái sinh thành cây con

Kết quả trên cho thấy mô sẹo hình thành phôi vô tính sau đó phát triển thành cây khi nuôi cấy lâu trên cùng môi trường. Bảng 4 cho thấy môi trường MS bổ sung BA 2 mg/l (đạt 9,4%) có hiệu quả khác biệt lên sự phát sinh phôi vô tính và tái sinh cây từ mô sẹo ở mức ý nghĩa 5%. Mô sẹo chỉ phát sinh phôi vô tính và sau đó hình thành cây con trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA và môi trường kết hợp 2 mg/l BA và 0,1 mg/l NAA. Nghiệm thức bổ sung 0,1 mg/l NAA và 2 mg/l BA cho hiệu quả biến đổi thành cây con cao nhất với tỷ lệ 25%, khác biệt không có ý nghĩa so với nghiệm thức 0,05 mg/l NAA kết hợp với 2 mg/l BA (12,5%).

**Bảng 4. Hiệu quả của NAA và BA lên tỷ lệ tạo phôi vô tính và biến đổi thành cây con (%) ở thời điểm 30 ngày sau khi cấy**

NAA (mg/l)	BA (mg/l)				Trung bình
	0	1	2	3	
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,05	0,0	0,0	12,5	0,0	3,1
0,1	0,0	0,0	25,0	0,0	6,3
0,15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Trung bình</b>	0,0 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>	9,4 <sup>a</sup>	0,0 <sup>b</sup>	
<b>F<sub>BA</sub></b>			*		
<b>F<sub>NAA</sub></b>			ns		
<b>F<sub>BAxNAA</sub></b>			ns		
<b>CV (%)</b>			40,51		

Ghi chú: Những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5%. (ns): Khác biệt không có ý nghĩa thống kê. (\*): Khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Như vậy, sự hiện diện của nồng độ NAA và BA trong môi trường thích hợp đã kích thích tế bào có khả năng sinh phôi biệt hóa thành tế bào phôi và các tế bào phôi này phát triển qua các giai đoạn hình cầu, hình trái tim, dạng hình ngư lôi với sự phân cực để phát triển thành chồi và rễ. Mô sẹo trên các môi trường khác không có khả năng sinh phôi nên khó tái sinh thành chồi. Kết quả nghiên cứu của Rahman *et al.* (2004) cũng cho thấy mô sẹo được cảm ứng từ mẫu cây cuống lá của cây *Kaempferia galanga* L. trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l 2,4-D kết hợp 1 mg/l BA sau khi được chuyển sang môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA có sự hình thành phôi dạng hình cầu, sau đó phát triển thành cây con sau khi được cấy chuyển trên cùng môi trường. Karim và Ahmed (2010) nuôi cấy mô sẹo của cây *Momordica dioica* Roxb cũng tạo được phôi vô tính và phôi nảy mầm trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BAP và 0,1 mg/l NAA.

Kết quả thí nghiệm cho thấy mô sẹo nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA kết hợp với 0,05 mg/l NAA và môi trường 2 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA có khả năng phát sinh phôi và tái sinh thành cây con, đạt tỷ lệ tương ứng là 12,5% và 25% ở 30 ngày sau khi cấy.

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1 Kết luận

- Môi trường MS bổ sung 2,4-D nồng độ 0,5, 1 và 1,5 mg/l kết hợp BA 1 mg/l có hiệu quả lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu cây đoạn thân non của cây Mỏ Quạ, tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 100% sau 30 ngày nuôi cấy.
- Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi và hình thành cây con trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA kết hợp với NAA nồng độ 0,05 mg/l và 0,1 mg/l, đạt tỷ lệ tương ứng là 12,5% và 25% ở 30 ngày sau khi cấy.

### 4.2 Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu giai đoạn nhân chồi, tạo rễ và thuần dưỡng cây Mỏ Quạ để hoàn thiện quy trình nghiên cứu về vi nhân giống.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn. 2003. *Cây Thuốc Và Động Vật Làm Thuốc ở Việt Nam*, tập II, Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ Thuật, Hà Nội.
- Gomez, Kwanchai A. and Arturo A. Gomez. 1984. *Statistical procedures for agricultural research, 2<sup>nd</sup> Edition*, John Wiley & Sons, Inc., 306-308.
- Josue, Jack F. Malamug, Haruhisa Inden and Tadashi Asahira. 1991. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. *Scientia Horticulturae*, 48(1), 89-97.
- Karami, O. 2008. Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Biological Sciences*, 8(4), 68-72.
- Karim MA., Ahmed SU (2010) Somatic embryogenesis and micropropagation in Teasle Gourd. *International Journal of Environmental Science and Development*, 1(1), 10-14.
- Kim, S.W., T.J. Kim and J.R. Liu, 2003. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in petiole and leaf explant cultures and petiole-derived embryogenic cell suspension cultures of *Hylomecon vernalis*. *Plant Cell Tiss. Organ Curt.*, 74, 163-167.
- Luo, J.P., J.F. Jia, Y.H. Gu and J. Liu, 1999. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus culture of *Astragalus adsurgens* Pall. *Plant Sci.*, 143, 93-99.
- Marchant, R., M.R. Davey, J.A. Lucas and B.G. Power, 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Floribunda rose (*Rose hybrida* L.) Trumpeter and Glad Tidings. *Plant Sci.*, 120, 95-105.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-479.
- Rahman MM., Amin MN., Ahamed T., Ali MR., Habib A (2004) Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf base-derived callus of *Kaempferia galanga* L. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3 (6), 675-678.
- Suzuki, S., M. Oota and M. Nakano, 2002. Embryogenic callus induction from leaf of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* spp. orientals leighton histological study and response to selective agents. *Sci. Horticut.*, 95, 123-132.
- Yi Tang, Huanxiu Li, Ji Liu, Bin Liu and Hong Ping Luo. 2009. Callus formation from anther culture in balsam pear (*Momordica charantia* L.). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 6(3), 308-312.