

Bước đầu nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến sự phát sinh hình thái của mô lá cây hoắc hương (*Pogostemon cablin* (Blaco) Benth) nuôi cấy *in vitro*

Tạ Như Thục Anh^{1,*}, Trần Dụ Chi², Vũ Văn Vụ²

¹*Viện Dược liệu, 3B Quang Trung, Hà Nội, Việt Nam*

²*Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 21 tháng 6 năm 2007

Tóm tắt. Nghiên cứu này tìm hiểu ảnh hưởng của auxin và cytokinin lên quá trình phát sinh hình thái của mô lá cây hoắc hương (*Pogostemon cablin* (Blaco) Benth) nuôi cấy *in vitro*. Các auxin (NAA, IBA, 2,4-D) và cytokinin (BAP, Kinetin) đã được bổ sung riêng rẽ hoặc kết hợp vào môi trường MS ở các nồng độ khác nhau. Tất cả các công thức thí nghiệm đều kích thích sự hình thành mô sẹo từ các mảnh lá nuôi cấy. Tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất khi bổ sung phối hợp NAA với BAP. Chồi cũng hình thành ở các công thức sử dụng môi trường MS bổ sung NAA, IBA và Kinetin riêng rẽ. Chồi không hình thành ở các công thức bổ sung 2,4-D. Nhiều thể chồi hình thành ở môi trường bổ sung 0,5 và 0,7 mg/l BAP. Ở các nồng độ bổ sung BAP khác, chồi không hình thành. Ngoài ra, ở các công thức phối hợp NAA (0,5 mg/l) và BAP tỷ lệ hình thành chồi rất thấp và giảm đi khi hàm lượng BAP tăng lên và ở nồng độ 1 mg/l BAP chồi không được hình thành.

Từ khóa: chất điều hòa sinh trưởng, sự phát sinh hình thái, hoắc hương (*Pogostemon cablin* (Blaco) Benth, nuôi cấy *in vitro*).

1. Đặt vấn đề

Hoắc hương có tên khoa học là *Pogostemon cablin* (Blaco) Benth. Còn gọi là quảng hoắc hương, thổ hoắc hương, thuộc họ hoa môi *Lamiaceae* (*Labiatae*). Hoắc hương có nguồn gốc ở Philippin. Hiện nay chúng được trồng ở các vùng nhiệt đới như châu Á và châu Phi với qui mô lớn để lấy tinh dầu. Tinh dầu hoắc hương là một trong những nguyên liệu tự nhiên quan trọng nhất được sử dụng làm nước hoa. Những nước sản xuất hoắc hương nhiều nhất

hiện nay là Ấn Độ, Malaixia, Philippin, Mangat, Indônêxia [1, 2].

Trong y học, hoắc hương còn là một vị thuốc làm mạnh dạ dày, giúp sự tiêu hoá, dùng trong những trường hợp ăn không ngon, sôi bụng, đau bụng đi ngoài, hôi miệng và dùng làm thuốc chữa cảm mạo, nhức đầu, mình mảy đau đốn, triệu chứng cảm cúm. Hoắc hương được dùng ở Ấn Độ làm thuốc chữa một số bệnh nhiễm khuẩn coli, tụ cầu, liên cầu khuẩn. Nó là thành phần của một loại thuốc diệt sâu bọ, đặc biệt trừ nhậy. Ở Philippin dùng nước hãm lá tươi để điều trị rối loạn kinh nguyệt. Tinh dầu hoắc hương được dùng trong y học cổ

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-6860997.
E-mail: tnthucanh@gmail.com

truyền Indonesia để chữa các vết thương do bị chém, vết đứt, bệnh ngứa. Nó là thành phần trong các chế phẩm chữa ho, tiêu chảy và các chứng hoa mắt chóng mặt của người già [1].

Ở Việt Nam, cây hoắc hương được trồng nhiều nơi thuộc miền Bắc, chủ yếu để lấy lá và cành làm thuốc. Do đặc tính ra hoa không đồng thời và thời gian ra hoa ngắn, tỷ lệ đậu quả ít dẫn đến hệ số nhân giống bằng hạt thấp, nên hoắc hương thường được nhân giống bằng phương pháp vô tính là giâm cành [2]. Biện pháp nhân giống này có nhiều nhược điểm nhất định, đặc biệt là sự lây nhiễm bệnh qua nguyên liệu giống thường phổ biến và phức tạp. Sự lây nhiễm và tích tụ các ký sinh trùng đặc hiệu, nhất là virus, làm thoái hoá giống, giảm năng suất và chất lượng cây trồng. Đặc biệt cây hoắc hương là cây mẫn cảm với virus khảm và nematode *Meloidogyne incognita* Chiwood. Việc phục tráng và thiết lập hệ thống sản xuất giống hoắc hương có chất lượng cao chưa được quan tâm và đang trở thành một nhu cầu cần thiết. Ở nước ta, cho đến nay, vẫn chưa có công trình nào nghiên cứu giải quyết vấn đề này một cách triệt để đáp ứng nhu cầu sản xuất. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây hoắc hương. Trên cơ sở đó, chúng tôi bước đầu nghiên cứu ảnh hưởng của NAA, IBA, 2,4D (auxin) và BAP, kinetin (cytokinin) tới quá trình phát sinh hình thái từ mô lá của cây hoắc hương *in vitro*.

2. Nguyên liệu và phương pháp

Mẫu lấy từ cây hoắc hương ngoài tự nhiên được rửa sạch và ngâm bằng nước xà phòng

loãng, khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 10 phút, ngâm và tráng lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Các mảnh lá được cấy vào môi trường dinh dưỡng. Môi trường cơ bản là môi trường Murashige – Skoog (1962) [3] có cải tiến. Các chất điều hoà sinh trưởng (ĐHST) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với các tổ hợp và nồng độ khác nhau. Độ pH của tất cả các môi trường được điều chỉnh đến 5,8, thêm thạch và hấp vô trùng ở $0,8\text{kg/cm}^2$ trong 40 phút. Mỗi công thức bao gồm 20-25 mảnh cấy, được nuôi trong điều kiện nhiệt độ phòng nuôi: $25^\circ\text{C} \pm 2$; cường độ ánh sáng 2000 lux; độ ẩm 70%; thời gian chiếu sáng: 14 giờ sáng/10 giờ tối. Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của các chất ĐHST thuộc nhóm auxin

Quá trình phát sinh hình thái trong nuôi cấy *in vitro* thực chất là kết quả của các quá trình biệt hoá và phản biệt hoá. Quá trình này phụ thuộc vào tỷ lệ cân bằng của hai nhóm chất ĐHST [4], có thể phát triển theo hướng phát sinh hình thái thông qua tái sinh trực tiếp thành cơ quan hoặc cá thể mới hay sinh sản liên tục thành mô sẹo [5]. Vì vậy, các mảnh lá đã khử trùng, được cắt nhỏ và đưa vào môi trường dinh dưỡng có bổ sung các chất NAA, IBA, 2,4-D theo các tỷ lệ 0,2; 0,5; 0,7; 1,0 mg/l. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các chất NAA; IBA và 2,4 - D tới sự phát sinh hình thái của mô lá hoặc hương *in vitro*

TT	Thành phần môi trường	Tỷ lệ mô sẹo (%)	Tỷ lệ tạo chồi(%)	Số chồi/mẫu
1	MS + 0,2 mg/l NAA	28,3	53,3	1,86
2	MS + 0,5 mg/l NAA	48,3	56,6	2,16
3	MS + 0,7 mg/l NAA	61,5	71,6	6,25
4	MS + 1,0 mg/l NAA	76,7	85,0	3,46
5	MS + 0,2 mg/l IBA	11,4	41,6	1,3
6	MS + 0,5 mg/l IBA	51,6	56,6	3,23
7	MS + 0,7 mg/l IBA	85,5	26,7	1,66
8	MS + 1,0 mg/l IBA	41,6	23,5	1,05
9	MS + 0,2 mg/l 2,4D	83,3	-	-
10	MS + 0,5 mg/l 2,4D	95,0	-	-
11	MS + 0,7 mg/l 2,4D	96,6	-	-
12	MS + 1,0 mg/l 2,4D	38,3	-	-

Như đã thấy ở bảng 1, cả ba loại auxin này đều có tác dụng kích thích hình thành mô sẹo, trong đó, 2,4-D có tác dụng mạnh nhất (tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất là 96,6% đạt được ở công thức bổ sung 0,7 mg/l 2,4-D), sau đó đến IBA (tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất là 85,5% đạt được ở công thức bổ sung 0,7 mg/l IBA) và cuối cùng là NAA (tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất là 76,7% đạt được ở công thức bổ sung 1 mg/l NAA). Tỷ lệ hình thành mô sẹo tăng dần theo chiều tăng của nồng độ chất sinh trưởng bổ sung vào môi trường dinh dưỡng, sau đó lại giảm đi. Như vậy, ở nồng độ 0,2; 0,5; 0,7; 1,0 mg/l (đối với NAA) và 0,2; 0,5; 0,7 mg/l (đối với IBA và 2,4 - D) các chất này có tác dụng kích thích, còn khi nồng độ lên tới 1,0mg/l IBA (và 2,4 - D) đã vượt quá ngưỡng kích thích, ức chế hình thành mô sẹo (41,6% và 38,3%). Điều này thể hiện rõ nét ở môi trường có 2,4 - D, mô sẹo bị đen lại và chết làm giảm tỷ lệ từ 96,6% xuống còn 38,3%.

Bên cạnh đó, tỷ lệ hình thành chồi cũng tăng theo chiều tăng của nồng độ NAA trong môi trường nuôi cấy, cao nhất ở nồng độ 1mg/l NAA. IBA cũng có tác dụng kích thích sự tạo chồi *in vitro* đối với cây hoặc hương nhưng yếu hơn so với NAA. 2,4 - D ở các nồng độ đã sử

dụng hoàn toàn không có tác dụng kích thích này. Điều này cho thấy rất có thể ở cây hoặc hương đã sẵn có một lượng cytokinin nội sinh khá cao nên khi bổ sung các chất nhóm auxin vào môi trường nuôi cấy, cân bằng hormon được thiết lập trở lại dẫn đến việc phát sinh chồi. Để kiểm tra giả thiết này chúng tôi đã bổ sung vào môi trường nuôi cấy các chất thuộc nhóm cytokinin.

3.2. Ảnh hưởng của các chất ĐHST thuộc nhóm cytokinin

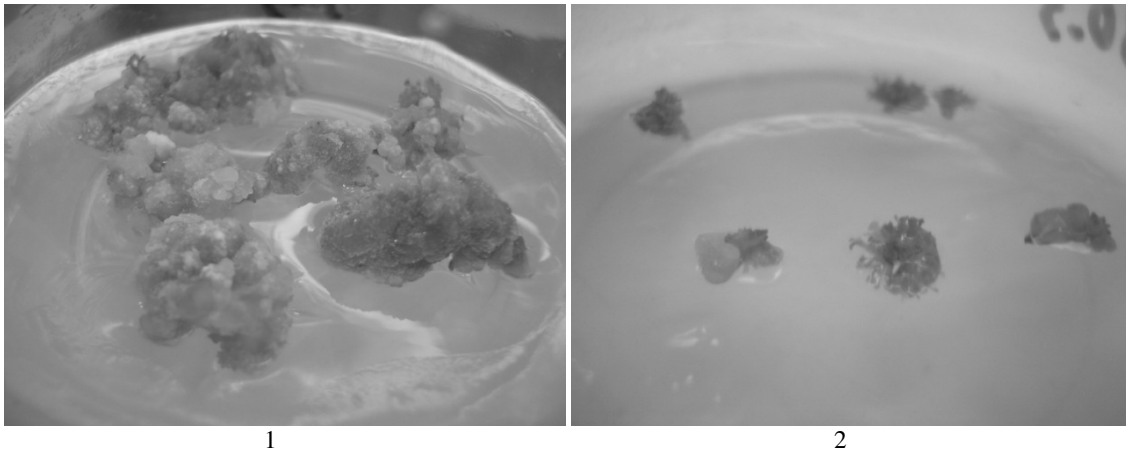
Ở thí nghiệm này chúng tôi đã bổ sung vào môi trường nuôi cấy các chất BAP và Kinetin (Kin) với các nồng độ 0,2; 0,5; 0,7; 1,0 mg/l và thu được kết quả ở bảng 2. Tác dụng kích thích hình thành mô sẹo của BAP tăng dần không đáng kể theo chiều tăng của nồng độ. Ngược lại, Kin lại có tác dụng giảm dần sự tạo mô sẹo theo hướng tăng của nồng độ. Nhưng ở môi trường có Kin tỷ lệ hình thành chồi tăng từ 11,6% đến 91,6%, số lượng chồi/mẫu cây cũng tăng lên 2,08 đến 15,0 còn đối với BAP tỷ lệ tạo chồi thấp, nhưng BAP có tác dụng kích thích hình thành nhiều thể chồi ở nồng độ 0,5 và 0,7 mg/l.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP và Kin tới sự phát sinh hình thái của mô lá

TT	Thành phần môi trường	Tỷ lệ mô sẹo (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu cây (cái)
1	MS + 0,2 mg/l BAP	78,3		
2	MS + 0,5 mg/l BAP	81,6	29,6	***
3	MS + 0,7 mg/l BAP	83,3	13,3	**
4	MS + 1,0 mg/l BAP	85,0	----	
5	MS + 0,2 mg/l Kin	80,0	11,6	2,08
6	MS + 0,5 mg/l Kin	41,6	48,3	3,4
7	MS + 0,7 mg/l Kin	35,0	91,6	14,5
8	MS + 1,0 mg/l Kin	21,6	31,6	15,0

Chú thích: ** : nhiều chồi nhỏ

*** : rất nhiều chồi nhỏ



Hình 1. Mô sẹo hình thành trên môi trường có bổ sung BAP (1) và Kin (2).

Tác dụng kích thích hình thành mô sẹo của BAP tăng dần không đáng kể theo chiều tăng của nồng độ. Ngược lại, Kin lại có tác dụng giảm dần sự tạo mô sẹo theo hướng tăng của nồng độ. Nhưng ở môi trường có Kin tỷ lệ hình thành chồi tăng từ 11,6% đến 91,6%, số lượng chồi/mẫu cây cũng tăng lên 2,08 đến 15,0 còn đối với BAP tỷ lệ tạo chồi thấp, nhưng BAP có tác dụng kích thích hình thành nhiều thể chồi ở nồng độ 0,5 và 0,7 mg/l.

Để thăm dò khả năng kích thích mô sẹo của BAP chúng tôi tiếp tục tăng nồng độ của BAP

đến 5mg/l. Các kết quả thu được cho thấy tác dụng kích thích này tiếp tục tăng cho tới nồng độ 4mg/l, tỷ lệ tạo mô sẹo là cao nhất 93,3%. Tuy nhiên, chồi hoàn toàn không xuất hiện ở các công thức này.

Khi nuôi các mảnh cắt của lá trên môi trường có bổ sung cả auxin và cytokinin ở các nồng độ 0,5mg/l NAA kết hợp với BAP nồng độ 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 mg/l. Mô sẹo ở các công thức thí nghiệm có tỷ lệ gần tương đương nhau. ở nồng độ 0,5mg/l NAA và 0,2 mg/l BAP số lượng chồi/mẫu cây là cao nhất. Điều này càng

chứng minh giả thiết ở hoặc hương hàm lượng cytokinin nội sinh là khá cao nên khi bổ sung chất ĐHST theo tỷ lệ cytokinin/auxin < 1 mà vẫn kích thích sự hình thành chồi. Hơn nữa tỷ lệ

chồi/mẫu cấy giảm dần khi lượng BAP ngoại sinh tăng lên.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và NAA tới sự phát sinh hình thái của mô lá cây hoặc hương in vitro

TT	Thành phần môi trường	Tỷ lệ mô sẹo (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu cấy
1	MS + 0,5 mg/l NAA+ 0,2mg/l BAP	98,6	61,6	4,61
2	MS + 0,5 mg/l NAA+ 0,3mg/l BAP	98,5	56,7	0,88
3	MS + 0,5 mg/l NAA+ 0,5mg/l BAP	97,3	11,6	0,11
4	MS + 0,5 mg/l NAA+ 1,0mg/l BAP	98,3	-----	



1



2

Hình 2. Chồi hình thành trên môi trường có bổ sung auxin (1) và chồi tái sinh từ mô sẹo lá (2).

4. Kết luận

Các chất ĐHST thuộc hai nhóm chất auxin và cytokinin ở các nồng độ đã sử dụng đều có khả năng kích thích sự hình thành mô sẹo ở mô lá cây hoặc hương *in vitro*.

Tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất khi kết hợp bổ sung cả auxin và cytokinin.

Rất có thể hàm lượng cytokinin nội sinh ở cây hoặc hương là khá cao nên khi bổ sung cytokinin ngoại sinh đã gây ức chế sự hình thành chồi.

Tuy vậy cần tiếp tục nghiên cứu bản chất của mô sẹo hình thành trong môi trường có bổ sung các chất ĐHST khác nhau.

Cần tiếp tục nghiên cứu những ảnh hưởng trên đối với các mô khác của cây hoặc hương.

Tài liệu tham khảo

- [1] Viện Dược liệu, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và kỹ thuật, 2004, tr 965-968.
- [2] Viện Dược liệu, *Kỹ thuật trồng, sử dụng và chế biến cây thuốc*, NXB. Nông nghiệp, 2005.

- [3] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physio. Plant* 15 (1962) 473.
- [4] S. Narayanaswamy, *Plant Cell and Tissue culture*, Mc Graw-Hill Publishing Company limited, New Delhi 1994
- [5] J. Reinert, et al, "Aspects of Organization - Organogenesis, Embryogenesis, Cytodifferentiation", In: *Plant Tissue and Cell Culture*, Ed. Street H.E., Blackwell, Oxford, London, 1977.

Effect of growth regulators on the morphogenesis from leaf explant of *Pogostemon cablin* (Blaco) Benth *in vitro*

Ta Nhu Thục Anh¹, Tran Du Chi², Vu Van Vu²

¹*Vietnam Institute of Medicinal Materials, Ministry of Health, 3B Quang Trung, Hanoi, Vietnam*

²*Department of Biology, College of Science, VNU, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

The effects of auxins and cytokinins on the morphogenesis from leaf explants of *Pogostemon cablin* (Blaco) Benth were investigated. Leaf explants were inoculated in MS medium supplemented with one auxin (NAA/IBA/2,4-D) or one cytokin (BAP/ Kinetin) or both (NAA and BAP) at different concentrations (0.2; 0.5; 0.7; 1.0 mg/l as for single hormone treatments and 0.5 mg/l NAA and 0.2/0.3/0.5/1.0 mg/l BAP as for hormone combination treatments). Callus was formed in all experimental media. The highest number of callus was obtained in the medium supplemented with both NAA and BAP. At the same time, shoots were also regenerated in the media supplemented with NAA, IBA and kinetin separately. No shoot was obtained in 2,4-D containing media. Supplementing BAP (0,5 mg/l and 0,7 mg/l) to the medium stimulated protocorm formation. No shoot formation was observed in other BAP containing media. Among combination treatments (NAA and BAP), no shoot was formed in the medium containing 1 mg/l BAP. In the others, shoots were formed but the percentage of regenerated shoots was very low and this number reduced with the increase of the concentration of BAP added.