

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA TĂNG TRƯỞNG THỰC VẬT VÀ ĐƯỜNG SACCHAROSE LÊN DỊCH NUÔI CẤY HUYỀN PHỤ TẾ BÀO DỪA CẠN *CATHARANTHUS ROSEUS*

Bùi Văn Lê⁽¹⁾, Nguyễn Ngọc Hồng⁽²⁾

(1) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(2) Trường Đại học Bán công Tôn Đức Thắng

(Bài nhận ngày 06 tháng 03 năm 2006, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 17 tháng 05 năm 2006)

TÓM TẮT: Mô sẹo xanh được cảm ứng từ lá cây dừa cạn *in vitro* được nuôi trong môi trường MS (Murashige and Skoog) lỏng có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật khác nhau gồm có auxin và cytokinin. Ở nồng độ 1 mg l^{-1} α -naphthaleneacetic acid (NAA) và $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ kinetin (Kin) thu nhận được sinh khối và alkaloid toàn phần cao nhất trong khi cũng ở môi trường này nhưng thay thế NAA bằng 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ở cùng nồng độ thu được sinh khối và alkaloid toàn phần thấp. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường saccharose đến việc nuôi cấy dịch huyền phù tế bào dừa cạn cho kết quả ở nồng độ 60 g l^{-1} cho lượng sản phẩm là cao nhất. Khi kết hợp nồng độ chất điều hòa tăng trưởng thực vật cho hiệu quả nuôi cấy cao (1 mg l^{-1} NAA; $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ Kin) và nồng độ đường tối ưu (60 g l^{-1}) thu nhận được lượng vincristin cao trong khi ở lá cây dừa cạn ngoài tự nhiên không thu được lượng alkaloid này.

1. GIỚI THIỆU

Dừa cạn *Catharanthus roseus*. G. Don họ Trúc đào Apocynaceae là một trong những dược liệu chứa nhiều alkaloid. Từ dừa cạn người ta chiết được chất chữa ung thư như vinblastin, vinblastin và chữa cao huyết áp như ajmalicin, serpentin. Tuy nhiên hàm lượng của những chất này có trong cây là rất thấp. Việc nuôi cấy tế bào cây dừa cạn để nâng cao hàm lượng alkaloid mong muốn đã được nhiều nước trên thế giới nghiên cứu và ứng dụng vào sản xuất. Việc nuôi cấy tế bào để thu nhận sinh khối và các hợp chất thứ cấp ở nước ta mới ở trong giai đoạn nghiên cứu bước đầu.

Góp phần nghiên cứu về việc nuôi cấy tế bào chúng tôi tiến hành khảo sát sơ bộ ảnh hưởng của một số hormon tăng trưởng lên quá trình tạo sinh khối tế bào và alkaloid toàn phần có trong dịch nuôi cấy.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

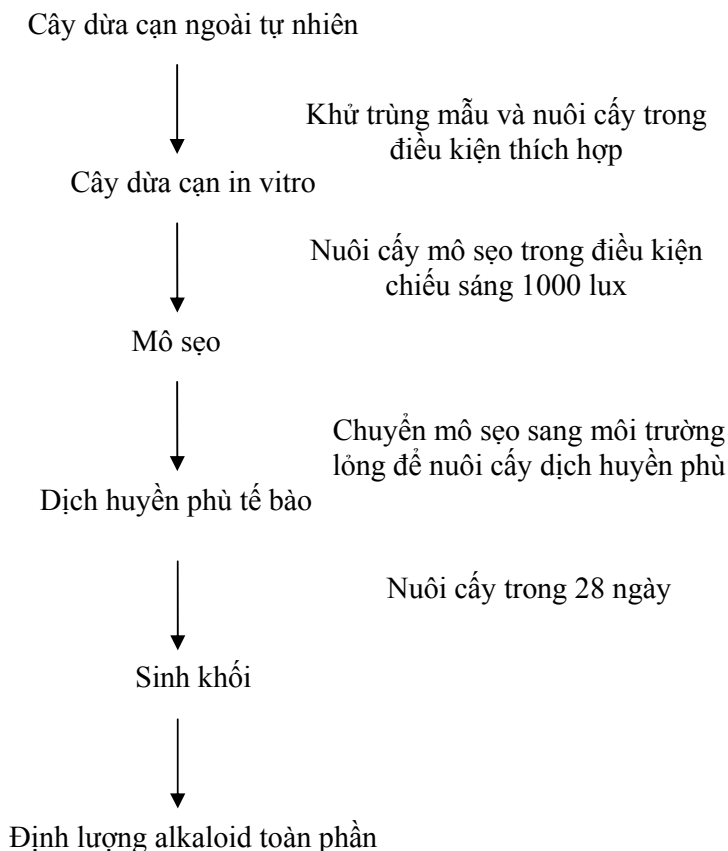
Mô sẹo màu xanh được nuôi trong điều kiện chiếu sáng từ lá dừa cạn *in vitro* 4 tháng tuổi được chuyển vào 100 ml môi trường cảm ứng trong erlen 250 ml. Môi trường cảm ứng gồm môi trường MS + Vitamin Morel + Hormon tăng trưởng thực vật (NAA hoặc 2,4-D và Kin hoặc BAP) + 30g/l đường sucrose. Sau đó đặt vào máy lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ trong điều kiện chiếu sáng liên tục 16 giờ/ngày.

Cũng làm theo cách tương tự như trên nhưng thay thế nồng độ đường 30g/l bằng các nồng độ đường 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l và nồng độ hormon tăng trưởng là tối ưu nhất trong thí nghiệm trên.

Xác định sinh khối bằng phương pháp cân

Chiết tách alkaloid toàn phần từ sinh khối tế bào Dừa cạn theo phương pháp của Kutney và cộng sự (1983)

Xác định alkaloid toàn phần bằng phương pháp acid-baz - khan theo dược điển Việt Nam và dược điển Anh



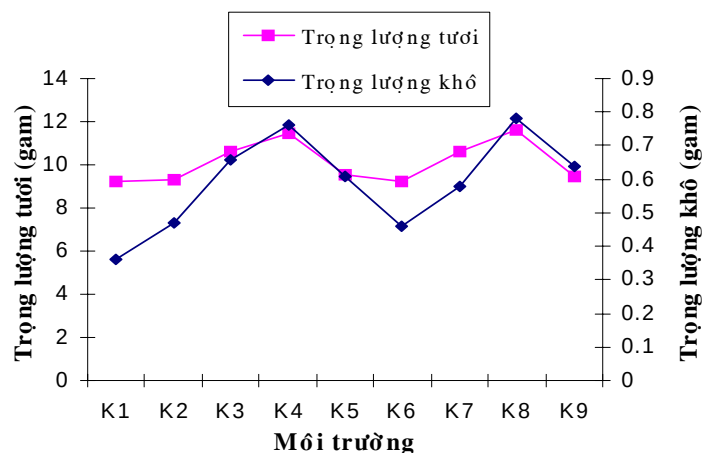
Hình 1. Qui trình thực hiện thí nghiệm

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của sự thay đổi nồng độ cytokinin đến sự tạo sinh khối

Bảng 1. Môi trường kết hợp NAA và cytokynine dùng để nuôi dịch huyền phù tế bào.

Môi trường	NAA (mg/lít)	BAP (mg/lít)	KIN (mg/lít)	Trọng lượng tươi (FW)	Trọng lượng tươi (DW)
K1	1,0	0	0	9.24±0.10	0.36±0.03
K2	1,0	0	0,10	9.34±0.08	0.47± 0.07
K3	1,0	0	0,25	10.59±0.2	0.66±0.13
K4	1,0	0	0,50	11.47±0.48	0.76±0.06
K5	1,0	0	1,00	9.55±0.16	0.61±0.04
K6	1,0	0,10	0	9.26±0.13	0.46±0.09
K7	1,0	0,25	0	10.58±0.29	0.58±0.09
K8	1,0	0,50	0	11.59± 0.27	0.78±0.09
K9	1,0	1,00	0	9.50±0.16	0.64±0.05



Hình 2. Đường cong tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào dừa cạn trong môi trường bổ sung NAA và cytokinin

Ở bảng trên cho thấy môi trường chỉ bổ sung NAA có sự tạo sinh khối thấp hơn so với môi trường bổ sung NAA kết hợp với Kin. Môi trường K4 (MS + NAA (1mg/l) + Kin (0.5 mg/l) và K8 (MS + NAA (1mg/l) + BAP (0.5 mg/l) cho sinh khối tươi và khô đều cao hơn các môi trường khác.

Như vậy, theo cách bố trí của thí nghiệm này thì sự kết hợp với nồng độ cytokinin tăng dần từ 0,1 – 0,5 mg/l làm lượng sinh khối tăng tỉ lệ thuận theo. Nuôi dịch huyền phù tế bào trong môi trường MS có các chất điều hòa tăng trưởng khác nhau.

Mục đích: Khảo sát ảnh hưởng của sự thay đổi nồng độ các chất điều hòa tăng trưởng khác nhau đến sự tạo sinh khối và alkaloid

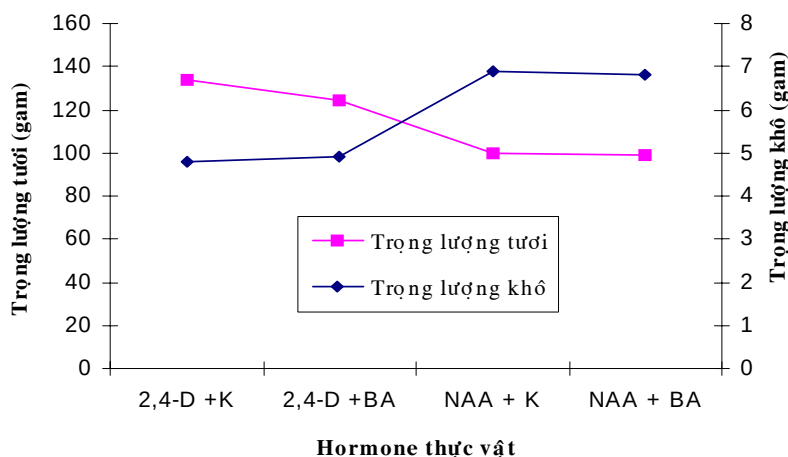
Nồng độ auxin (NAA và 2,4-D) được dùng là 1 mg/l. Nồng độ cytokinin (Kin, BAP) được dùng là 0,5 mg/l.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật khác nhau đến việc tạo sinh khối trong nuôi dịch huyền phù tế bào dừa cạn.

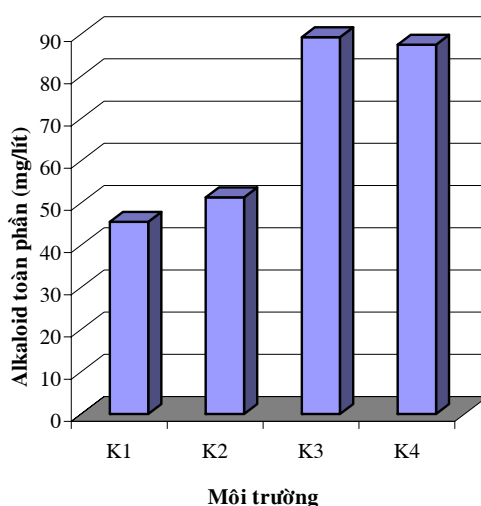
Môi trường	Chất ĐHTT	FW (gam/lít)	DW (gam/lít)	Alkaloid toàn phần (mg/l)
K1	2,4-D +K	134.19± 0.25	4.81±0.21	45.50 ± 0.54
K2	2,4-D +BA	124.19± 0.91	4.91± 0.15	51.33 ± 0.46
K3	NAA + K	100.05±0.21	6.88±0.13	89.26 ± 0.13
K4	NAA + BA	98.97±0.48	6.80±0.25	87.47 ± 0.17

Môi trường K3 cho lượng sinh khối khô và alkaloid có trong dịch huyền phù là cao nhất. Do đó môi trường K3 là môi trường tối ưu nhất cho việc khảo sát ảnh hưởng của hormone thực vật lên quá trình hình thành alkaloid có trong tế bào và trong môi trường lỏng.

Môi trường bổ sung 2,4-D tạo sinh khối tươi nhiều hơn so với môi trường bổ sung NAA nhưng trọng lượng khô rất thấp do môi trường bổ sung 2,4 D kích thích tế bào phân chia mạnh làm cho tế bào xốp, cấu trúc rời rạc nên trọng lượng khô thu được thấp



Hình 3. Đường cong tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào dừa cạn sau 28 ngày nuôi trong môi trường có bổ sung các hormone thực vật khác nhau.



Hình 4. Hàm lượng alkaloid toàn phần thu được trong môi trường có bổ sung các hormone thực vật khác nhau

Bảng 2 và biểu đồ 4 cho thấy môi trường có bổ sung 2,4-D tạo sinh khối tươi nhiều hơn so với môi trường bổ sung NAA nhưng trọng lượng khô lại rất thấp. Môi trường K3 và K4 có trọng lượng tươi thấp hơn môi trường K1 và K2 nhưng cho sinh khối khô nhiều hơn. Môi trường K3 cho sinh khối tươi và khô đều cao hơn môi trường K3 nhưng xét về mặt thống kê, hai môi trường này không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.01$.

Hormone thực vật đóng vai trò quan trọng trong điều khiển và điều hoà sự tăng trưởng, phát triển, biệt hoá. Hormone thực vật không chỉ cảm ứng sự tạo sẹo mà còn là chất cảm ứng, chất gây stress cho tế bào thực vật. 2,4-D kích thích sự phân chia tế bào nhanh nhưng lại phá hủy cấu trúc chặt chẽ của tế bào làm cho tế bào xốp và giảm đi việc tạo các sản phẩm thứ cấp. Cytokinin cần thiết cho sự hình thành các hợp chất thứ cấp, khi kết hợp cytokinin với NAA giúp duy trì sự tăng trưởng cũng như tạo ra alkaloid cao.

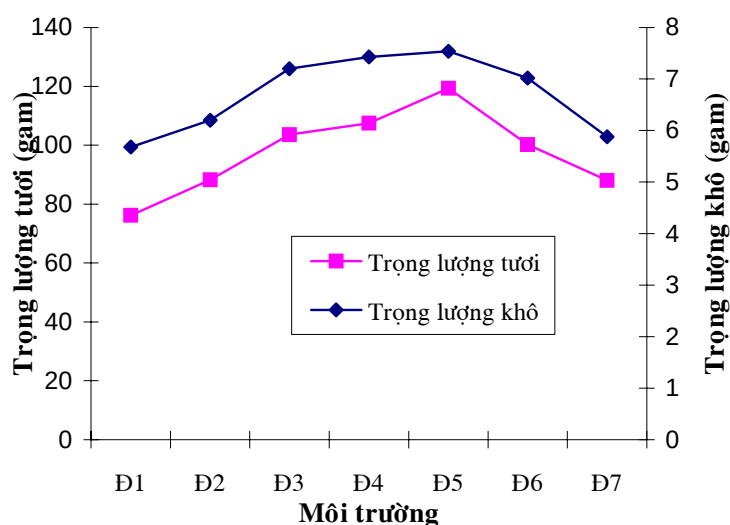
Nuôi dịch huyền phù tế bào trong môi trường tối ưu ở trên và bổ sung các nồng độ đường khác nhau.

Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ đường khác nhau trong quá trình thu nhận sản phẩm.

Mô sẹo đặc được đưa vào môi trường MS có chất điều hòa tăng trưởng thích hợp và bổ sung các nồng độ đường khác nhau. Thí nghiệm được bố trí như bảng dưới.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose đến sự nuôi cấy dịch treo

Môi trường	NĐ đường	Trọng lượng tươi (g/l)	Trọng lượng khô (g/l)	Alkaloid toàn phần (mg/l)
Đ1	20	76.22± 0.51	5.68 6±0.27	43.32 ± 0.62
Đ2	30	88.23±1.11	6.20±0.11	58.53 ± 2.36
Đ3	40	103.58± 0.58	7.20± 0.14	85.92 ± 1.69
Đ4	50	107.47± 1.16	7.43±0.05	96.60 ± 1.31
Đ5	60	119.33±3.96	7.54 ± 0.23	110.55 ± 4.01
Đ6	70	100.25± 0.18	7.02±0.09	74.70 ± 2.15
Đ7	80	88.08 ± 0.57	5.88±0.09	65.73 ± 1.44

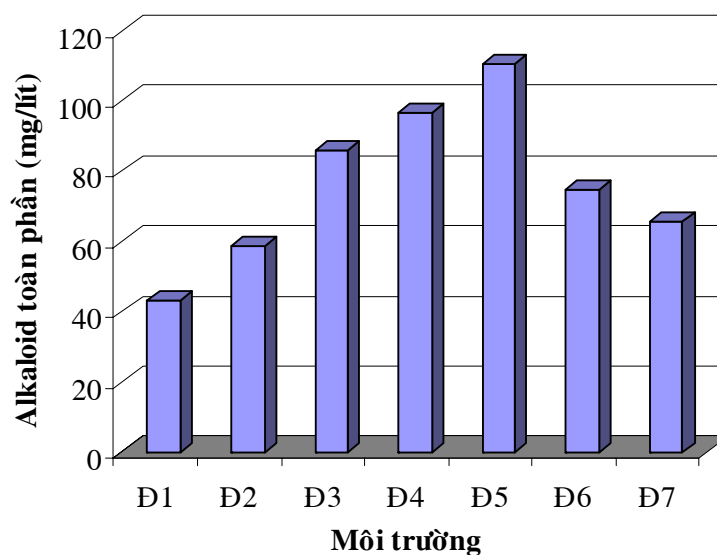


Hình 5. Đường cong tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào trong môi trường có bổ sung các nồng độ đường khác nhau

Ở bảng 3 và hình 5 cho thấy môi trường có nồng độ đường tăng dần từ 20 - 60 gam/l sinh khối tươi và khô thu được trong môi trường tăng dần theo. Môi trường tối ưu cho thí nghiệm về ảnh hưởng của nồng độ đường lên sự tạo sinh khối là môi trường Đ5.

Tuy nhiên khi tăng nồng độ đường lên cao hơn là 70 - 80 gam/lít thì trọng lượng tươi và khô giảm dần. Điều này có thể giải thích là khi nồng độ đường cao quá sẽ dẫn đến áp suất thẩm thấu cao quá mức giới hạn mà tế bào Dừa cạn có nên ảnh hưởng đến việc tăng trưởng tế bào.

Nồng độ đường có ảnh hưởng đến sự tạo thành các sản phẩm thứ cấp trong nuôi cấy tế bào. Ôu nồng độ đường sucrose cao vừa phải khoảng 50 –60 gam/lít sẽ kích thích tạo sinh khối và alkaloid. Nồng độ đường cao không chỉ là nguồn cung cấp hydrat cacbon dồi dào mà còn là yếu tố gây stress osmotic.

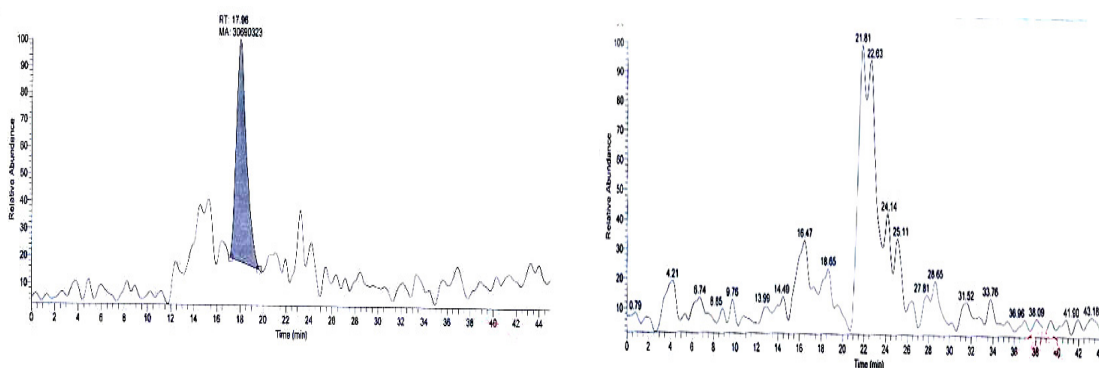


Hình 6: Hàm lượng alkaloid thu được trong môi trường có bổ sung các nồng độ đường khác nhau

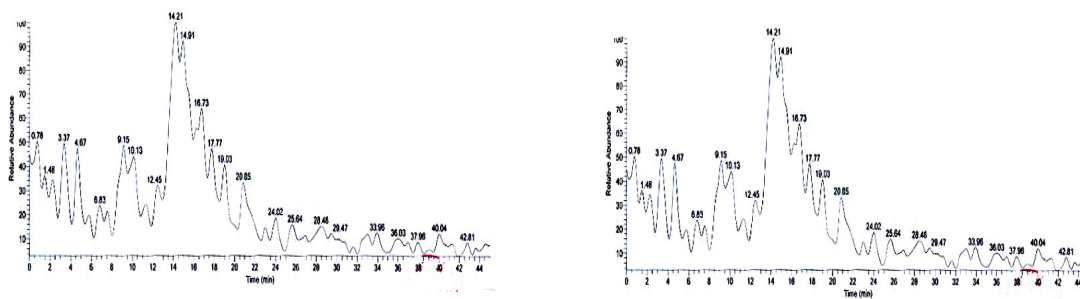
3.2. Định lượng alkaloid vinblastin và vincristin có trong lá cây không qua nuôi cấy in vitro và trong dịch huyền phù tế bào

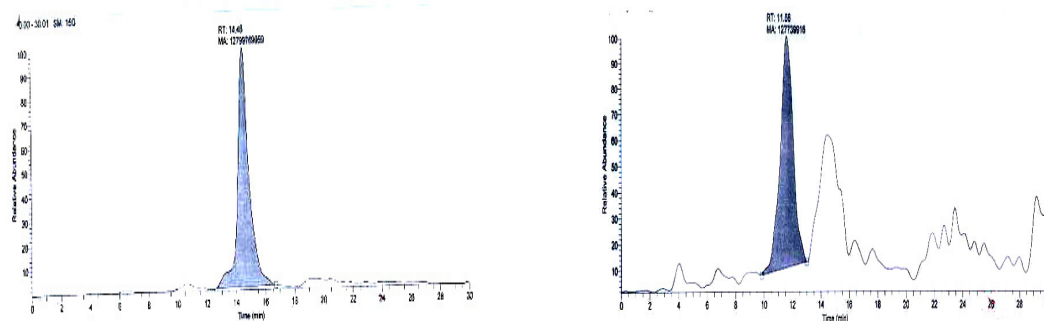
Thu nhận alkaloid toàn phần từ dịch huyền phù tế bào có bổ sung NAA (1 mg/l) + Kin (0,5 mg/l) và dịch huyền phù bổ sung 2,4-D (1 mg/l) + Kin (0,5 mg/l). Cả hai dịch huyền phù này đều được sử dụng nồng độ đường là 60 g/l.

Sử dụng lá cây dừa cạn 3 tháng tuổi để định lượng vincristin và vinblastin.



Hình 7. Kết quả định lượng vinblastin của mẫu lá cây ngoài tự nhiên bằng phương pháp HPLC





Hình 8. Kết quả định lượng vincristin của dịch huyền phù tế bào dừa cạn có bổ sung NAA + Kin bằng phương pháp HPLC

Bảng 4. Kết quả định lượng vinblastin của dịch huyền phù tế bào dừa cạn có bổ sung NAA + Kin bằng phương pháp HPLC.

Mẫu alkaloid	Vincristin (%)	Vinblastin (%)
Lá Dừa cạn	0	$3,948.10^{-4}$
NAA + Kin	$3,45.10^{-3}$	$2,7.10^{-4}$
2,4-D + KIn	0	0

Ghi chú:

- NAA + Kin: alkaloid toàn phần thu được từ môi trường MS có bổ sung NAA (1mg/l) + Kin (0,5 mg/l) và đường sucrose (60 g/l).

- 2,4-D + Kin: alkaloid toàn phần thu được từ môi trường MS có bổ sung 2,4-D (1mg/l) + Kin (0,5 mg/l) và đường sucrose (60 g/l).

Bảng trên cho thấy bằng phương pháp nuôi cấy dịch huyền phù có bổ sung 2,4-D thì lượng vincristin và vinblastin không có trong mẫu alkaloid toàn phần còn dịch huyền phù NAA + Kin cho lượng vinblastin thấp hơn so với cây trồng ngoài tự nhiên nhưng cho lượng vincristin khá cao trong khi cây trồng ngoài tự nhiên trong thí nghiệm này lại không có. Tuy nhiên, để kết luận chính xác hơn về sự nuôi cấy dịch huyền phù NAA + Kin có tác dụng cải thiện lượng indol alkaloid quý này hay không cần phải thực hiện nhiều lần định lượng vincristin và vinblastin bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp trên nhiều mẻ cây có bổ sung NAA và Kin để cho số liệu chính xác nhất về sự tăng hay giảm lượng indol alkaloid quý này.

4. KẾT LUẬN

Bước đầu đã tìm được nồng độ hormon phù hợp và nồng độ đường tối ưu cho việc nuôi dịch huyền phù tế bào dừa cạn. Bước tiếp theo là chọn dòng tế bào cho hàm lượng alkaloid cao nhất để nuôi cấy dòng tế bào đơn.

EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS AND SACCHAROSE ON THE *CATHARANTHUS ROSEUS* SUSPENSION CULTURE

Bui Van Le⁽¹⁾, Nguyen Ngoc Hong⁽²⁾

(1) University of Natural Sciences, VNU- HCM

(2) Ton Duc Thang University

ABSTRACT: Green callus clusters induced from in vitro *Catharanthus roseus* leaf explant have been cultured in a modified Murashige and Skoog (MS) liquid induction medium supplemented with different plant growth regulators containing auxin and cytokinin. The induction medium with 1 mg l⁻¹ α -naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.5 mg l⁻¹ kinetin (Kin) gave the greatest biomass and total alkaloid, meanwhile in the same medium containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) instead of NAA reduced biomass and total alkaloid production. The optimum saccharose concentration for alkaloid and biomass was 60 g l⁻¹. A combination between optimum plant growth and saccharose concentration in *C. roseus* suspension culture gave more vincristine alkaloid than natural *C. roseus* leaf

Key words: *Catharanthus roseus*, suspension culture, total alkaloid, plant growth regulators, saccharose.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Aniruddha Datta, P.S Srivastava, *Variation in vinblastin production by Catharanthus roseus during in vivo and in vitro differentiation*, Phytochemistry, Vol 46, No.1, pp.135-137, 2000.
- [2]. Felipe A. Vazquez-Lota and Victor M. Loyola-Vargas, *A Catharanthus salt tolerant line II. Alkaloid Production*, J. Plant Physiol. Vol.144, pp. 613-616, 1994.
- [3]. Fulzele DP & Heble MR., *Large scale cultivation of Catharanthus roseus cells: Production of ajmalicine in a 20-l airlift bioreactor*, Journal of Biotechnology 35, pp. 1-7, 1994.
- [4]. Jan Zhao W.-H., Zhu W.-H., Qui Hu X., He X.-W., *Improved alkaloid production in Catharanthus roseus suspension cell cultures by various chemicals*, Biotechnol.lett., vol.22, no.15, pp.1221-1226, 2000.
- [5]. Kumar PP, Lakshmanan P. and Thorpe, *Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene*, In Vitro Cell Dev Biol (P) 34, pp. 94-103, 1998.
- [6]. Monforte-Gonzalez M., Ayora-Talavera T., Maldonado-Mendoza I.E. and Loyola-Vargas V.M., *Quantitative analysis of serpentine and ajmalicin in plant tissues of Catharanthus roseus and hyoscyamine and scopolamine in root tissues of Datura stramonium by thin layer chromatography-densitometry*, Phytochemical analysis, Vol.3, pp. 117-121, 1992.
- [7]. Savidge R.A, *The role of plant hormones in higher plant cellular differentiation. II. Experiments with the vascular cambium and selereid and tracheid differentiation in pine Pinus contorta*, Histochem J. 15, 447-466, 1983.
- [8]. Tom R., Jardinb.C., Chavarie C., Archambault, *Effec of culture process on alkaloid production by Catharanthus roseus cell*, J.biotechnol, vol 21, no.1-2, pp. 1-19, 1991.
- [9]. Xu J.F, Xie J., Han A. m, Su Z. G., *Kinetic and technical studies on large- scale culture of Rhoiola sachalinesis compact callus aggregates with aie-lift reation*, J. Chem. Technol. Biotechnol. 72, pp. 227-234, 1998.