

ẢNH HƯỞNG CỦA ÁNH SÁNG LÊN SỰ TĂNG TRƯỞNG VÀ SINH TỔNG HỢP ANTHOCYANIN TRONG NUÔI CẤY TẾ BÀO DÂU TÂY

Phạm Thị Mỹ Trâm⁽¹⁾, Lê Thị Thuỷ Tiên⁽²⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

(2) Trường Đại học Bách Khoa - Đại học Quốc gia TP.HCM

TÓM TẮT

Mô sẹo có nguồn gốc từ lá và cuống lá dâu tây (*Fragaria ananassa* L.) *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) bổ sung đường 30 g/l, 2,4-D 1,0 mg/l và kinetin 0,3 mg/l. Trong đó, mô sẹo phát sinh từ lá và đặt trong điều kiện tối hình thành sớm cũng như cho sẹo có dạng bờ. Huyền phù tế bào tăng sinh ở trong tối tốt hơn ngoài sáng. Hàm lượng anthocyanin trong tế bào huyền phù đạt giá trị cao nhất (7,52.10⁻³% FW) ở điều kiện chiếu sáng 4000 lux.

Từ khoá: anthocyanin, dâu tây, *Fragaria ananassa* L., huyền phù tế bào, mô sẹo

*

1. Giới thiệu

Anthocyanin là hợp chất màu hữu cơ thiên nhiên, thuộc nhóm flavonoid, có màu đỏ, đỏ tím, xanh, hiện diện trong một số rau quả như ngô, táo, dâu, nho, bắp cải... [8], được sử dụng làm chất màu trong thực phẩm thay cho các chất màu tổng hợp hóa học nhờ vào sự giảm độc tố của chúng. Ngoài ra, anthocyanin còn có những hoạt tính sinh học tốt đối với con người như có khả năng giúp cơ thể chống và chữa một số bệnh như: tăng huyết áp, oxy hoá, tổn thương gan, ngăn chặn sự phát triển của các tế bào ung thư...[9].

Mặc dù vậy, lượng anthocyanin do thực vật tổng hợp không đáp ứng đủ nhu cầu cho con người, hơn nữa quá trình tách chiết cũng khá phức tạp. Theo nghiên cứu của Kandil F. và cộng sự (2000), hàm lượng của flavonoid của một trái cây có thể chỉ chiếm

khoảng 1% tổng hàm lượng các chất có trong nó; trong khi việc nuôi cấy tế bào có thể gia tăng hàm lượng các chất flavonoid lên tới 20 – 30 % tổng thể tích [7]. Vì vậy, hiện nay việc nghiên cứu và tìm ra điều kiện môi trường thích hợp để gia tăng sinh khối tế bào, qua đó sẽ tạo ra lượng lớn hợp chất anthocyanin đang được các nhà khoa học quan tâm.

Phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật có nhiều tiềm năng để thu nhận anthocyanin với sản lượng cao. Nhiều công trình đã công bố về sự sản xuất anthocyanin bằng nuôi cấy mô hay nuôi cấy tế bào huyền phù ở các loài thực vật khác nhau (như *Catharanthus roseus* [2], *Vitis* sp [3], *Fragaria ananassa* [12]).

Ở bài báo này, chúng tôi bổ sung thêm kết quả khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng

lên sự tạo sẹo, huyền phù tế bào và sinh tổng hợp anthocyanin của tế bào huyền phù dâu tây *Fragaria ananassa* L.

2. Vật liệu, phương pháp

2.1. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự hình thành và tăng trưởng mô sẹo từ lá và cuống lá của cây dâu tây in vitro

Vật liệu dùng để tạo mô sẹo là các mảnh lá non (5 x 5 mm) và cuống lá (0,8 – 1,0 cm) của cây dâu tây *Fragaria ananassa* L. in vitro 6 tuần tuổi. Môi trường tạo sẹo là môi trường MS bổ sung inositol 100 mg/l, đường (saccharose) 30 g/l, agar 7,5 g/l, 2,4-D 1,0 mg/l và kinetin 0,3 mg/l. Quá trình tạo sẹo được tiến hành ở hai điều kiện:

- *Điều kiện sáng*: Cường độ chiếu sáng: 2800 + 200 lux; Nhiệt độ: 25 + 20C; Ẩm độ: 70 + 2%; Thời gian chiếu sáng: 16 giờ/ngày
- *Điều kiện tối*: Nhiệt độ: 25 + 20C; Ẩm độ: 70 + 2%.

Ghi nhận kết quả trong 4 tuần nuôi cấy với các chỉ tiêu theo dõi: hình thái mô sẹo (chắc hay bở), ngày hình thành mô sẹo, màu sắc mô sẹo và tỉ lệ tạo sẹo.

2.2. Sự tạo huyền phù tế bào dâu tây

2 g mô sẹo dâu tây qua 2 lần cấy chuyển (8 tuần tuổi) được cấy vào 20 ml môi trường MS lỏng có thành phần tương tự như thành phần trong môi trường tạo sẹo. Hệ thống tế bào được nuôi trên máy lắc vòng với tốc độ 100 vòng/phút trong điều kiện tối với nhiệt độ 25 + 20C, độ ẩm 70 + 2%.

Huyền phù tế bào được nuôi trong 4 tuần sau đó sẽ chuyển sang môi trường mới. Huyền phù tế bào được cấy chuyển sau mỗi 2 tuần.

Hình thái tế bào dâu tây được quan sát dưới kính hiển vi quang học.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

Huyền phù tế bào dâu tây cấy chuyển vào môi trường MS lỏng được đặt ở ngoài sáng với cường độ chiếu sáng 2800 + 200 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày và ở trong tối.

Sự thay đổi thể tích tế bào lắng (SCV) của huyền phù tế bào được xác định sau 3 tuần nuôi cấy.

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự sinh tổng hợp anthocyanin của huyền phù tế bào dâu tây

Huyền phù tế bào dâu tây cấy chuyển vào môi trường MS lỏng được cảm ứng với ánh sáng có cường độ:

- ✓ 0 lux (tối hoàn toàn)
- ✓ 2800 + 200 lux
- ✓ 4000 + 200 lux

Hàm lượng anthocyanin thô (% trọng lượng tế bào tươi: %FW) trong huyền phù tế bào được đo bằng phương pháp pH vi sai sau 3 tuần nuôi cấy.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự hình thành và tăng trưởng mô sẹo từ lá và cuống lá của cây dâu tây in vitro

Kết quả thí nghiệm khảo sát vai trò của ánh sáng tác động lên sự hình thành mô sẹo được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1: Ảnh hưởng của ánh sáng đến thời gian tạo sẹo và hình thái mô sẹo

Điều kiện chiếu sáng	Mẫu cấy	Ngày bắt đầu hình thành sẹo	Hình thái mô sẹo	Tỉ lệ tạo sẹo sau 4 tuần nuôi cấy
Sáng	Lá	13 - 14	Chắc	64%
	Cuống lá	15 - 16	Chắc	59%
Tối	Lá	10 - 11	Bờ	93%
	Cuống lá	10 - 11	Chắc	94%

Mô sẹo bắt đầu hình thành ở các vị trí vết thương sau ngày thứ 10 – 11 ở các mẫu lá và cuống lá đặt trong tối, ngày thứ 13 – 14 ở các mẫu lá và ngày thứ 15 – 16 ở các mẫu cuống lá đặt ngoài sáng.

Ảnh 3.1. Mô sẹo từ lá và cuống lá sau 4 tuần nuôi cấy



a) Mô sẹo từ cuống lá ở điều kiện sáng



b) Mô sẹo từ cuống lá ở điều kiện tối



c) Mô sẹo từ lá ở điều kiện sáng



d) Mô sẹo từ lá ở điều kiện tối

Đầu tiên, mô sẹo xuất hiện ở vị trí vết thương, sau đó lan ra khắp bề mặt mẫu cấy. Mô sẹo từ lá được đặt ở điều kiện sáng hình thành chậm, có màu vàng nhạt và chắc. Sau 4 tuần nuôi cấy, lá vẫn còn màu xanh và mô sẹo chưa phủ hết mẫu cấy (ảnh 3.1.c). Tương tự, cuống lá đặt ngoài sáng cũng hình thành sẹo chậm.

Sẹo phát sinh từ cuống lá nhỏ, chắc và có màu vàng nhạt. Một số cuống lá không hình thành sẹo và bị đen (ảnh 3.1.a). Đối với các mẫu lá hoặc cuống lá đặt ở điều kiện tối thì thời gian hình thành sẹo ngắn và tỉ lệ tạo sẹo cao (93 – 94%). Sẹo hình thành từ cuống lá có màu trắng hoặc vàng nhạt, có dạng chắc (ảnh 3.1.b). Sẹo hình

thành từ lá đặt trong tối có màu vàng cánh gián. Sau 4 tuần, sẹo phát triển khắp bề mặt lá, kích thước lớn và có dạng bờ (ảnh 3.1.d). Sau lần cấy chuyển đầu tiên, các tế bào của mô sẹo hình thành từ lá và đặt trong tối tách rời nhau, mô sẹo trở nên xốp, rất thích hợp cho việc tạo huyền phù tế bào (ảnh 3.2).



Ảnh 3.2: Mô sẹo từ lá đặt trong tối sau lần cấy chuyển đầu tiên

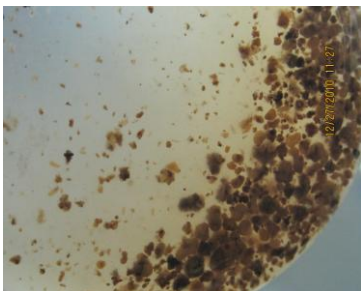
Theo kết quả báo cáo của Giang và cộng sự (2009) về ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự sản xuất anthocyanin của mô sẹo và huyền phù tế bào dâu tây Lâm Đồng, mô sẹo dâu tây phát sinh từ lá hình thành trong khoảng ngày thứ 8 – 9 của quá trình nuôi cấy [5].

Mori và cộng sự (1993) cũng ghi nhận là mô sẹo có nguồn gốc từ lá dâu tây phát triển tốt hơn và hàm lượng anthocyanin cao hơn các bộ phận khác của cây [13].

3.2. Sự tạo huyền phù tế bào dâu tây

Mô sẹo được đặt vào môi trường MS lỏng trên máy lắc vòng. Sau 14 ngày nuôi cấy, huyền phù tế bào hình thành bao gồm các tế bào đơn, cụm tế bào nhỏ, màu vàng đậm đến nâu nhạt (ảnh 3.3).

Ảnh 3.3: Tế bào huyền phù dâu tây *Fragaria ananassa* L. sau 14 ngày



a) Huyền phù tế bào (quan sát bằng mắt thường)



b) Huyền phù tế bào dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 40

3.3 Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

Kết quả khảo sát sự tăng trưởng của huyền phù tế bào trong hai điều kiện sáng và tối được trình bày trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Sự gia tăng SCV của huyền phù tế bào ở ngoài sáng và trong tối

Điều kiện chiếu sáng	Sự gia tăng SCV (ml)
Ngoài sáng	0,18 ± 0,03
Trong tối	0,33 ± 0,03

Huyền phù tế bào tăng sinh ở trong tối mạnh hơn ngoài sáng. Huyền phù tế bào trong điều kiện tối phóng thích nhiều tế bào nhỏ, môi trường nuôi cấy có màu vàng. Trong khi đó, huyền phù tế bào ở điều kiện chiếu sáng ít có sự phóng thích tế bào. Sự gia tăng SCV của huyền phù trong tối ở tuần thứ 3 đạt 0,33 ml trong khi ở ngoài sáng chỉ đạt 0,18 ml (bảng 3.2).

Đối với nhiều loài thực vật, ngoài tác động lên sự hình thành và tăng sinh của mô sẹo trong quá trình nuôi cấy, ánh sáng còn ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp trong tế bào do liên quan đến sự hoạt động của một số enzyme nội bào [4].

Theo nghiên cứu của Tiên và đồng tác giả (2010), sự tăng trưởng của mô sẹo và huyền phù tế bào từ thân non cây thông đỏ Lâm Đồng bị cản mạnh khi đặt ở ngoài sáng nhưng hoạt tính của taxol lại cao hơn so với trong tối [1].

Tương tự, Sato và cộng sự (1996) đã khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây bao gồm cường độ chiếu sáng. Theo các tác giả, sự tăng trưởng của huyền phù tế bào không phụ thuộc vào cường độ chiếu sáng [14].

3.4 Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự sinh tổng hợp anthocyanin trong huyền phù tế bào dâu tây

Theo kết quả ghi nhận ở bảng 3.3, hàm lượng anthocyanin được tổng hợp trong tế bào tăng lên khi tăng cường độ ánh sáng. Hàm lượng anthocyanin cao nhất trong nghiệm thức có cường độ ánh sáng 4000 lux là 7,52.10-3% FW, hàm

lượng anthocyanin đạt 6,01.10-3% FW ở cường độ ánh sáng 2800 lux và thấp nhất khi mẫu được đặt trong điều kiện tối hoàn toàn với hàm lượng anthocyanin đạt 5,06.10-3% FW (bảng 3.3).

Bảng 3.3: *Hàm lượng anthocyanin tích lũy trong tế bào huyền phù ở các điều kiện chiếu sáng khác nhau*

Cường độ ánh sáng (lux)	Hàm lượng anthocyanin (% FW x 10 ⁻³)
0 (tối hoàn toàn)	5,06 ± 0,63
2800	6,01 ± 0,63
4000	7,52 ± 1,44

Thành phần môi trường và các yếu tố vật lí có ảnh hưởng rất lớn đến sự tăng trưởng, phát triển của tế bào và con đường sản xuất các hợp chất thứ cấp. Trong đó, ánh sáng là một yếu tố rất quan trọng có thể kích thích sản xuất các sản phẩm bậc 2 kể cả anthocyanin trong nhiều loài thực vật [10]. Dưới điều kiện chiếu sáng, anthocyanin được tổng hợp trong tế bào thực vật để giảm mức độ ảnh hưởng nghiêm trọng của bức xạ ánh sáng, cũng như thúc đẩy nhanh chóng sự phục hồi hoạt động quang hợp [6]. Như vậy, việc tăng cường độ ánh sáng sẽ kích thích sự sản sinh anthocyanin trong tế bào mạnh hơn.

Kết quả ở thí nghiệm này tương tự với kết quả nghiên cứu của Sato và cộng sự (1996) trên tế bào dâu tây *Fragaria ananassa*. Sự sinh tổng hợp anthocyanin ở huyền phù tế bào dâu tây chỉ xảy ra khi cường độ chiếu sáng trên 0,8 klux. Hàm

lượng anthocyanin của huyền phù tế bào nuôi cấy ở cường độ chiếu sáng 2,5 và 8,0 klux tương ứng là 0,04 và 0,19 mg/g FW. Vì thế, theo các tác giả thì hàm lượng anthocyanin tăng theo cường độ ánh sáng. Khi quan sát dưới kính hiển vi, các tác giả nhận thấy không phải tất cả các tế bào đều sản xuất anthocyanin, các tế bào chứa sắc tố và không chứa sắc tố cùng tồn tại trong cùng một hệ thống nuôi cấy. Sản lượng anthocyanin phụ thuộc vào khả năng sinh tổng hợp của tế bào và thành phần anthocyanin. Khi cường độ ánh sáng tăng thì sản lượng anthocyanin trong tế bào huyền phù dâu tây cũng tăng lên. Tuy nhiên chỉ tăng hàm lượng anthocyanin mà không ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào và tỉ lệ phần trăm của các tế bào chứa sắc tố [12].

Ánh sáng có chọn lọc có thể ảnh hưởng đến các tế bào trong giai đoạn sản

xuất anthocyanin. Ánh sáng có thể ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme sản xuất anthocyanin. Matsumoto và cộng sự (1973) cho rằng hoạt động của phenylalanine ammonia lyase (PAL) – một enzyme quan trọng trong con đường sinh tổng hợp anthocyanin, được tăng cường khi các tế bào tiếp xúc với bức xạ cao [11].

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được một số yếu tố thích hợp cho sự tăng sinh của tế bào dâu tây *Fragaria ananassa* L. Điều kiện tối thích hợp cho sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo cũng như huyền phù tế bào. Hàm lượng anthocyanin đạt giá trị tối đa (7,52.10-3% FW) ở cường độ ánh sáng 4000 lux sau 3 tuần nuôi cấy huyền phù tế bào dâu tây.

*

EFFECT OF LIGHT ON CELL GROWTH AND ANTHOCYANIN BIOSYNTHESIS IN STRAWBERRY CELL CULTURES

Pham Thi My Tram⁽¹⁾, Le Thi Thuy Tien⁽²⁾

(1) Thu Dau Mot University, (2) University of Technology, VNU-HCM

ABSTRACT

Callus tissues derived from the leaf and petiole of the strawberry (Fragaria ananassa L.) in vitro were cultured on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) added sugars 30 g/l, 2,4-D 1.0 mg/l and kinetin 0.3 mg/l. The calli derived from the leaves in dark condition were early induced and friable. Suspension cells grew better in dark than in light. Anthocyanin content in the suspension cells reached the highest value (7.52.10-3% FW) at 4000 lux. Key words: anthocyanin, callus, cell suspension, Fragaria ananassa L., strawberry

Keywords: anthocyanin, callus, cell suspension,
Fragaria ananassa L., strawberry

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lê Thị Thuỷ Tiên, Bùi Trang Việt, Nguyễn Đức Lượng, *Khảo sát vài yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp taxol của các hệ thống tế bào Taxus wallichiana Zucc. In vitro*, Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, tập 13, 2010.

- [2]. Carew DP and Krueger RJ., *Anthocyanidins of Catharanthus roseus callus cultures*, Phytochemistry 15, 1976, p. 442.
- [3]. Do CB, Cormier F., *Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (Vitis vinifera L.) cell suspensions*, Plant Cell Rep 9, 1990, p. 143-146.
- [4]. Fett-Neto, A.G., Pennington, J.J. and DiCosmo, F., *Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of Taxus cuspidata Sieb and Zucc*, J. Plant Physiol, 146, 1995, p. 584 – 590.
- [5]. Giang, P.T.H., Quynh, P.T. and Tien, L.T.T, *Effects of some factors on anthocyanin production in calli and cell suspension cultures of Lam Dong strawberry*, Proceeding of the 11th conference on Science and Technology. Biotechnology, VNU – HCM, 2009.
- [6]. Gould, K.S., *Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004, p. 314 – 320.
- [7]. Kandil, F., Song, L., Pezzuto, J., Seigler, D. and Smith, M.A., *Isolation of oligomeric proanthocyanidins from flavonoid - producing cell cultures*, In Vitro Cell Dev Biol Plant Biol Plant, 36, 2000, p. 492 – 500.
- [8]. Konczak – Islam, I. and Zhang, W., *Anthocyanins – More than nature's colours*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 5, 2004, p. 239 – 241.
- [9]. Kong, J., Chia, L., Goh, N. and Brouillard, R., *Analysis and biological activities of anthocyanins*, Photochemistry, 64, 2003, p. 923 – 933.
- [10]. Matsumoto, H., Tanida, Y. and Ishizuka, K., *Porphyrin intermediate involved in herbicidal action of a aminolevulinic acid on duckweed (Lemna paucicostata Hegelm)*, Journal of Pesticide Biochemistry and Physiology, 48, 1994, p. 214 – 221.
- [11]. Matsumoto, T., Nishida, K., Noguchi, M. and Tamaki, E., *Some factors affecting the anthocyanin formation by Popuius cells in suspension culture*, Agric. Biol. Chem, 37, 1973, p. 561 – 567.
- [12]. Mori, T. and Sakurai, M., *Effects of riboflavin and increased sucrose on anthocyanin production in suspended strawberry cell cultures*, Plant Science, 113, 1996, 91 – 98.
- [13]. Mori, T., Sakurai, M., Shigeta, J., Yoshida, K. and Kondo, T., *Formation of anthocyanins from cells cultured from different parts of strawberry phants*, J. Sci. Food Agric., 58, 1993, p 788 – 792.
- [14]. Sato, K., Nakayama, M. and Shigeta, J., *Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry*, Plant Sci, 113, 1996, p. 91 – 98.