

KHẢO SÁT MỘT SỐ HỢP CHẤT ALKALOID CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC Ở CÂY DỪA CẠN (*CATHARANTHUS ROCEUS L.*) TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY *IN VITRO*

NGUYỄN VĂN VINH

1. GIỚI THIỆU

Thực vật là nguồn cung cấp các hợp chất dùng làm dược liệu và phụ gia có giá trị. Những sản phẩm này được biết như là những hợp chất trao đổi thứ cấp, thường được tổng hợp với một lượng rất nhỏ trong cây và là sản phẩm của các phản ứng hóa học của thực vật với môi trường hoặc là sự bảo vệ hóa học chống lại vi sinh vật và động vật. Những nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp có nguồn gốc thực vật đã phát triển từ cuối những năm 50 của thế kỉ 20 (Rao và cộng sự, 2002). Các chất trao đổi thứ cấp có thể xếp trong ba nhóm chính là alkaloid, tinh dầu và glycoside.

Cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus L.*) thuộc họ Trúc Đào, có xuất xứ từ đảo Madargascar, Châu Phi. Dừa cạn được trồng ở nhiều nơi trên thế giới nhưng chủ yếu phát triển mạnh ở những vùng nhiệt đới như nước ta. Trong Dừa cạn có trên 70 alkaloid, trong đó alkaloid chứa nhân indol vinblastin là hợp chất quan trọng nhất. Vinblastin có khả năng liên kết đặc hiệu với tubulin, là protein ống vi thể ở thoi phân bào, phong bế sự tạo thành các vi ống và gây ngừng phân chia tế bào ở pha giữa. Do đó hiện nay, vinblastin được sử dụng như là dược chất điều trị một số bệnh ung thư trên người. Hàm lượng alkaloid vinblastin trong cây Dừa cạn tự nhiên rất nhỏ, tỉ lệ chỉ khoảng 0,1 - 1,12% [1].

Với mục đích khảo sát hợp chất alkaloid vinblastin trong cây Dừa cạn tự nhiên và trong nguồn mô thực vật nuôi cấy *in vitro* làm cơ sở cho những nghiên cứu sản xuất hợp chất này trong điều kiện *in vitro*, chúng tôi tiến hành: (1) nhân giống *in vitro* cây dừa cạn, xác định các điều kiện của quá trình tái sinh chồi, rễ và tạo dịch huyền phù tế bào, (2) khảo sát hợp chất vinblastin ở cây Dừa cạn các loại mô nuôi cấy *in vitro*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus L.*) hoa màu hồng được thu nhận tại Biên Hòa, Đồng Nai. Hạt dừa cạn được rửa bằng dung dịch xà phòng 10% (v/v). Mẫu hạt này được tiếp tục lãc trong cồn 70° (1 phút), khử trùng trong 5% Ca-hypoclorit (w/v), 15 phút. Sau đó hạt được rửa 4 lần bằng nước cất khử trùng. Hạt sau khi khử trùng, được gieo trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), bổ sung 0,7% agar (w/v), 3% sucrose (w/v). pH môi trường điều chỉnh đến 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ 27 ± 2°C, ánh sáng 2500 ± 500 lux, ẩm độ 55 ± 5%, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Từ điệp cây mầm 4 tuần tuổi được cắt và sử dụng cho những thí nghiệm tạo mô sẹo.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát sự tạo mô sẹo từ tử diệp

Tử diệp từ cây mằm Dừa cạn 4 tuần tuổi được cắt rời. Mảnh tử diệp được cắt thành 3 mảnh, kích thước $0,5 \pm 0,1$ cm. Mảnh mô được cấy lên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), có 0,7% agar (w/v), 3% sucrose (w/v), pH5,8 được bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng thực vật theo bảng 1 để khảo sát sự tạo mô sẹo từ mảnh tử diệp. Tiến hành vi cắt lát và nhuộm màu carmine-veriode các mảnh tử diệp ở các thời điểm 0, 5, 7 ngày nuôi cấy để xác định nguồn gốc mô sẹo.

2.2.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của auxin, cytokinin lên quá trình tái sinh chồi và rễ từ mô sẹo

Các khối mô sẹo 3 tuần tuổi trên môi trường MS bổ sung NAA 1 mg/l, BA 0,5 mg/l (thí nghiệm S6) được cấy chuyển sang các môi trường bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật theo bảng 2 để khảo sát sự tái sinh chồi và rễ từ mô sẹo.

Bảng 1. Các thí nghiệm môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo từ tử diệp

Nghiệm thức	Thành phần môi trường
DC	MS
S1	MS+ 2,4-D 1,0 mg/l
S2	MS+ 2,4-D 2,0 mg/l
S3	MS+ 2,4-D 1,0 mg/l, BA 0,5 mg/l
S4	MS+ 2,4-D 2,0 mg/l, BA 0,5 mg/l
S5	MS+ 2,4-D 1,0 mg/l, kinetin 0,5 mg/l
S6	MS+ 2,4-D 2,0 mg/l, kinetin 0,5 mg/l
S7	MS+ NAA 1,0 mg/l, BA 0,5mg/l
S8	MS+ NAA 2,0 mg/l, BA 0,5mg/l

Bảng 2. Thí nghiệm môi trường nuôi cấy khảo sát sự tái sinh chồi và rễ từ mô sẹo

Nghiệm thức	Thành phần môi trường
DC	MS
C1	MS+ NAA 0,5 mg/l, BA 1,0 mg/l
C2	MS+ NAA 0,5 mg/l, BA 2,0 mg/l
C3	MS+ 2,4-D 0,5 mg/l, kinetin 1,0 mg/l
C4	MS+ 2,4-D 0,5 mg/l, kinetin 2,0 mg/l
R1	MS+ NAA 1,0 mg/l
R2	MS+ NAA 1,5 mg/l
R3	MS+ NAA 2,0 mg/l
R4	MS+ 2,4-D 1,0 mg/l
R5	MS+ 2,4-D 1,5 mg/l
R6	MS+ 2,4-D 2,0 mg/l

2.3. Nuôi cấy tạo dịch huyền phù tế bào

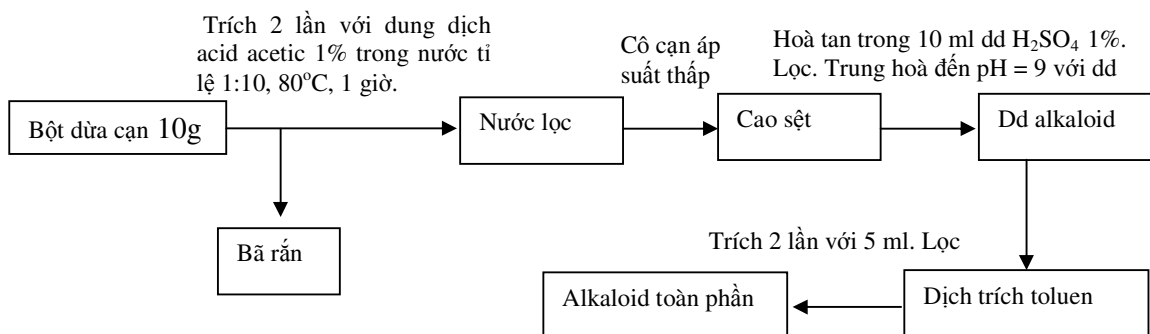
Khối mô sẹo 3 tuần tuổi được cấy chuyển sang môi trường MS lỏng bổ sung bổ sung chất điều hòa sinh trưởng theo bảng 3 để khảo sự tạo dịch huyền phù tế bào từ mô sẹo. Môi trường được đặt trong điều kiện nuôi cấy lắc, tốc độ 120 vòng/phút.

Bảng 3. Nghiệm thức môi trường nuôi cấy tạo dịch huyền phù tế bào từ mô sẹo

Nghiệm thức	Thành phần môi trường
DC	MS
H1	MS+ 2,4-D 0,5 mg/l, BA 0,5 mg/l
H2	MS+ 2,4-D 1,0 mg/l, BA 0,5 mg/l
H3	MS+ NAA 0,5 mg/l, BA 0,5 mg/l
H4	MS+ NAA 1,0 mg/l, BA 0,5 mg/l

2.4. Li trích và định tính alkaloid trong cây dứa cạn

Mẫu thân, lá, rễ của cây ngoài tự nhiên và mô sẹo, chồi, rễ, dịch huyền phù tế bào nuôi cấy *in vitro* được sử dụng để ly trích và định tính alkaloid. Mẫu được sấy ở 40°C đến trọng lượng không đổi, xay nhuyễn thành bột. Alkaloid trong mẫu được ly trích theo quy trình [1].



Dịch alkaloid toàn phần được định tính xác định alkaloid theo hai phương pháp:[3]

- Phương pháp dùng thuốc thử: thuốc thử Mayer, Wagner, Dragendorf.
- Phương pháp sắc kí lớp mỏng: bằng bản Silicagel F254 không hoạt hóa, thuốc phun hiện màu là SCAP (hỗ hợp sulfat cerium amonium 1,0 g; acid orthophosphoric 100 ml), dung môi triển khai CHCl₃-CH₃OH (95 : 5).

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

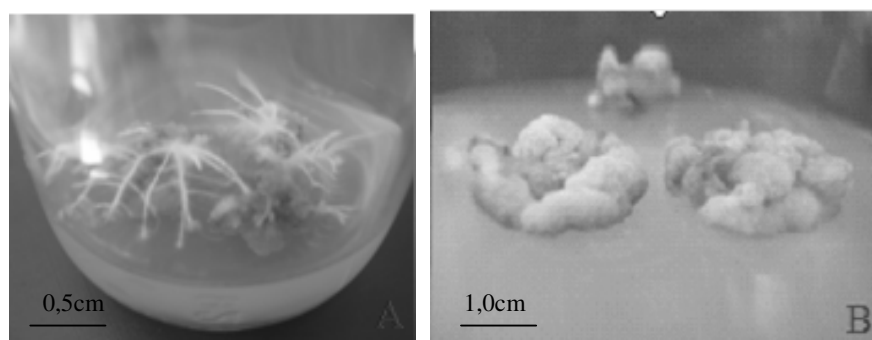
3.1. Sự tạo mô sẹo từ tử diệp Dứa cạn

Sau 4 tuần nuôi cấy, ở hầu hết các nghiệm thức, trên tử diệp đều có sự xuất hiện của mô sẹo tại những vết cắt ngang gân chính (bảng 4). Trên các nghiệm thức có sự hiện diện của NAA, khối mô sẹo sau khi hình thành sẽ tái sinh ngay thành rễ. Ở các nghiệm thức bổ sung 2,4-D riêng lẻ hay phối hợp với BA, khối mô sẹo hình thành và tăng trưởng tốt. Khối mô sẹo ở trạng thái đặc chắc và có trọng lượng tươi cao nhất ở các nghiệm thức nghiệm thức S3, S4. Khi nguồn cytokinin BA được thay thế bằng kinetin, trên các nghiệm thức có 2,4-D, khối mô sẹo cũng tăng trưởng tốt nhưng trọng lượng giảm. Như vậy, môi trường phù hợp cho sự tạo sẹo từ tử diệp Dứa cạn là môi trường MS bổ sung 2,4D 1,0 mg/l và BA 0,5 mg/l.

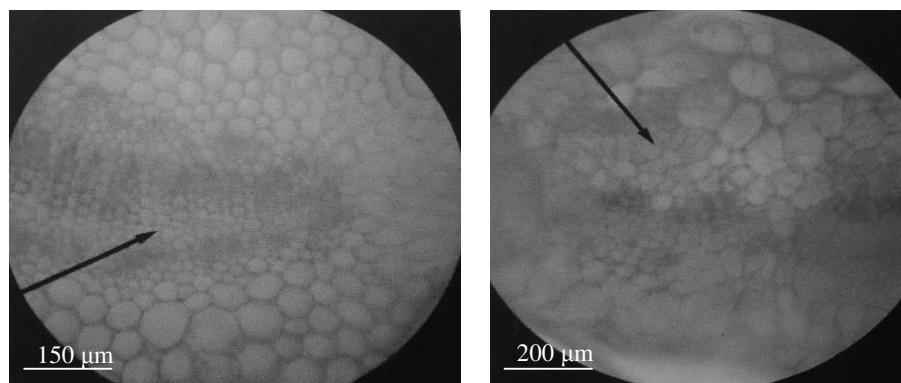
Bảng 4. Biểu hiện của mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy trên các nghiệm thức

STT	Nghiệm thức	Trọng lượng tươi (g)	Màu sắc	% mẫu cho rữa	Độ cứng
1	DC	0,08 ^a ± 0,01	Trắng	0	Xốp
2	S1	0,56 ^d ± 0,01	Trắng	0	Xốp
3	S2	0,23 ^b ± 0,01	Trắng	0	Xốp
4	S3	0,98 ^f ± 0,01	Xanh nhạt	0	Chắc
5	S4	0,78 ^c ± 0,04	Xanh nhạt	0	Chắc
6	S5	0,86 ^e ± 0,01	Trắng	0	Chắc
7	S6	0,35 ^c ± 0,01	Trắng	0	Hơi xốp
8	S7	0,25 ^b ± 0,01	Trắng	90	Hơi xốp
9	S8	0,28 ^b ± 0,02	Trắng	93	Hơi xốp

Các chữ đi kèm theo sau các số khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ở $p \leq 0,05$.



Hình 1. Mô sẹo phát sinh từ khúc cắt từ diệp Dừa cạn. (A) mô sẹo trên nghiệm thức S7, (B) mô sẹo trên nghiệm thức S3



Hình 2. Phẫu thức ngang gân chính từ diệp dừa cạn. (A) thời điểm 0 ngày, (B) thời điểm 7 ngày

Các lát cắt ngang qua tử diệp nuôi cấy trên tất cả các nghiệm thức ở thời điểm 7 ngày cho thấy các tế bào nhu mô libe có sự phân chia mạnh (mũi tên). Số lượng tế bào nhu mô tăng lên và kích thước lớn hơn so với tế bào lá ban đầu (mũi tên). Một vài tế bào nhu mô giữa các bó mạch

có sự phân chia theo hướng ngang. Sự phân chia tăng nhanh, đẩy các bó libe và mạch ra xa nhau. Kết quả cho thấy mô sẹo có nguồn gốc phát sinh từ tế bào nhu mô libe lá dừa cạn.

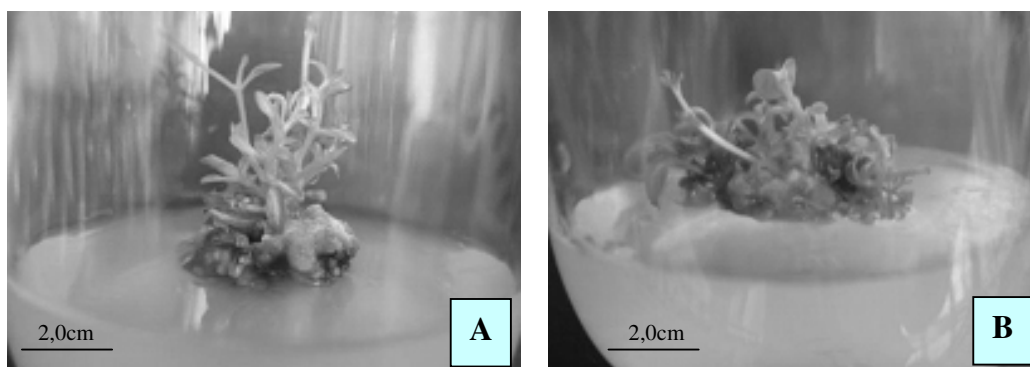
3.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của auxin, cytokinin lên quá trình tái sinh chồi và rễ từ mô sẹo

Trên nghiệm thức C2, sau 3 tuần cho kết quả tái sinh chồi từ mô sẹo tốt nhất, với số lượng chồi là $17,66 \pm 1,15$ chồi/khối mô sẹo. Ở nghiệm thức C3, C4, với nguồn cytokinin sử dụng là kientin, số lượng chồi thu được rất thấp (1,33 chồi/khối mô sẹo và 7,00 chồi/khối mô sẹo). Điều này cho thấy cytokinin BA phối hợp với 2,4D phù hợp cho sự tái sinh chồi từ mô sẹo.

Bảng 5. Ảnh hưởng của auxin và cytokinin lên quá trình tái sinh chồi từ mô sẹo

Tên nghiệm thức	Số lượng chồi	Đặc điểm
DC	$0,00^a \pm 0,00$	Không tái sinh chồi
C1	$7,00^c \pm 1,00$	Chồi xanh, mọc đều khối mô sẹo, chồi mọc dài
C2	$17,66^d \pm 1,15$	Chồi xanh, mọc đều, chồi mọc thấp
C3	$1,33^b \pm 0,57$	Chồi màu vàng xanh, ngắn
C4	$2,06^b \pm 0,45$	Chồi màu vàng, ngắn

Các chữ đi kèm theo sau các số khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ở $p \leq 0,05$.



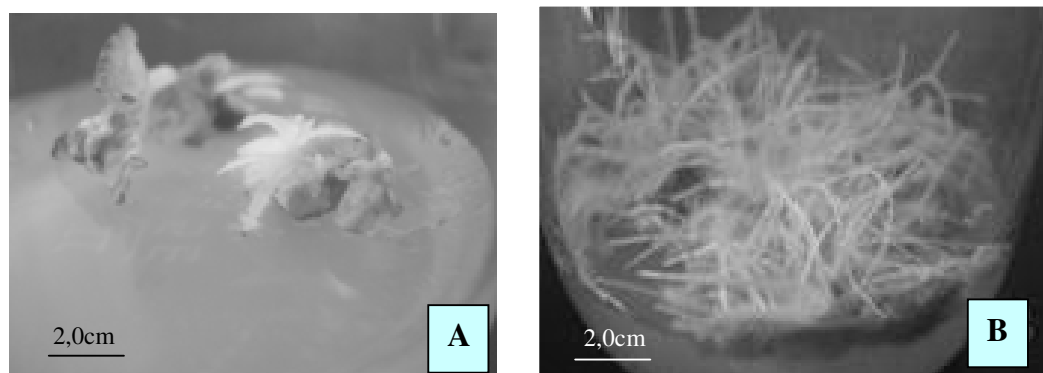
Hình 3. Sự phát sinh chồi từ mô sẹo. (A) Chồi phát sinh trên nghiệm thức C4 (B) Chồi phát sinh trên nghiệm thức C2

Khối mô sẹo 4 tuần tuổi nuôi cấy trên các nghiệm thức tạo rễ bổ sung nguồn auxin là NAA, sau 2 tuần rễ phát sinh khắp bề mặt khối mô sẹo. Ở nghiệm thức R1, số lượng rễ thu được cao nhất $22,67 \pm 0,58$ rễ/khối mô sẹo, rễ có đặc điểm tốt (trắng, dài). Trên các nghiệm thức có nguồn auxin là 2,4-D, số lượng rễ thu được là không đáng kể, rễ mảnh và nhiều lông rễ. Như vậy, nguồn auxin là NAA với nồng độ 1,0 ml/l phù hợp cho sự tái sinh rễ từ khối mô sẹo.

Bảng 6. Ảnh hưởng của auxin lên quá trình tái sinh rễ từ mô sẹo

Tên nghiệm thức	Số lượng rễ	Đặc điểm
DC	0,00 ^a ± 0,00	Không xuất hiện rễ
R1	22,67 ^b ± 0,58	Rễ mọc đều các mẫu, rễ trắng, dài
R2	21,61 ^b ± 1,15	Rễ mọc đều, trắng, dài
R3	20,34 ^b ± 0,52	Rễ mọc tập trung gần cuống, dài, trắng
R4	6,32 ^c ± 1,45	Rễ mảnh, nhiều lông rễ
R5	3,49 ^c ± 0,22	Rễ ngắn, mảnh
R6	3,32 ^c ± 1,18	Rễ mảnh, nhiều lông rễ, rất ngắn

Các chữ đi kèm theo sau các số khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ở $p \leq 0,05$.



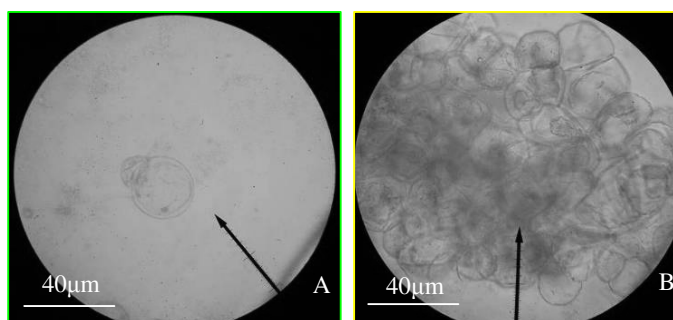
Hình 4. Sự phát tái sinh rễ từ mô sẹo. (A) Rễ tái sinh trên nghiệm thức R4, (B) Rễ tái sinh trên nghiệm thức R1

3.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của auxin và cytokinin lên khả năng tạo dịch huyền phù tế bào từ mô sẹo

Khối mô sẹo nuôi cấy trên môi trường lỏng, trong điều kiện nuôi cấy lắc, sau 7 ngày, các tế bào từ khối mô sẹo có khuynh hướng tách ra tạo nên các tế bào đơn và các cụm tế bào có kích thước khác nhau. Ở nghiệm thức H1 (bổ sung 2,4-D 0,5 mg/l + BA 0,5 mg/l) tạo được huyền phù tốt nhất với số lượng tế bào đơn và cụm tế bào nhiều nhất, các nghiệm thức còn lại số lượng tế bào đơn và cụm tế bào rất ít. Các tế bào và cụm tế bào tạo thành, tăng trưởng tốt.

Bảng 7. Ảnh hưởng của auxin và cytokinin đến sự tạo dịch huyền phù tế bào từ mô sẹo

Tên nghiệm thức	Số lượng và đặc điểm tế bào
DC	Không xuất tế bào đơn
H1	Xuất hiện nhiều tế bào đơn đẳng kính, số lượng tế bào nhân lên rất nhiều, xuất hiện nhiều cụm tế bào với kích thước khác nhau.
H2	Có xuất hiện một vài tế bào đơn đẳng kính và mảnh vỡ tế bào.
H3	Xuất hiện một vài tế bào đơn và vài cụm tế bào, mảnh vỡ tế bào.
H4	Có một vài tế bào đơn, tế bào chất trong tế bào không tròn đầy, mảnh vỡ tế bào.

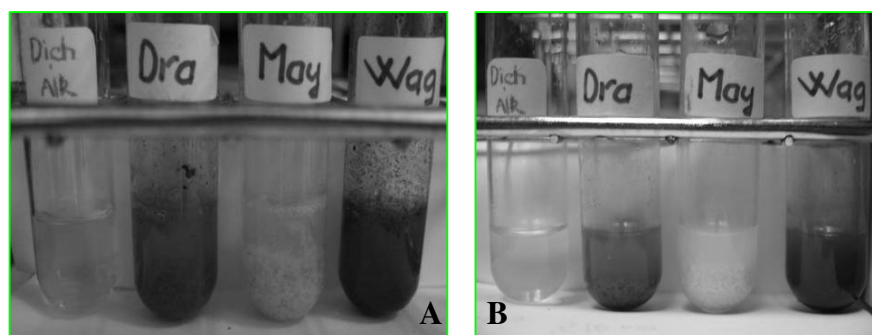


Hình 5. Tế bào và cụm tế bào của dịch huyền phù tế bào dưa cạn. (A) Tế bào đơn, (B) Cụm tế bào

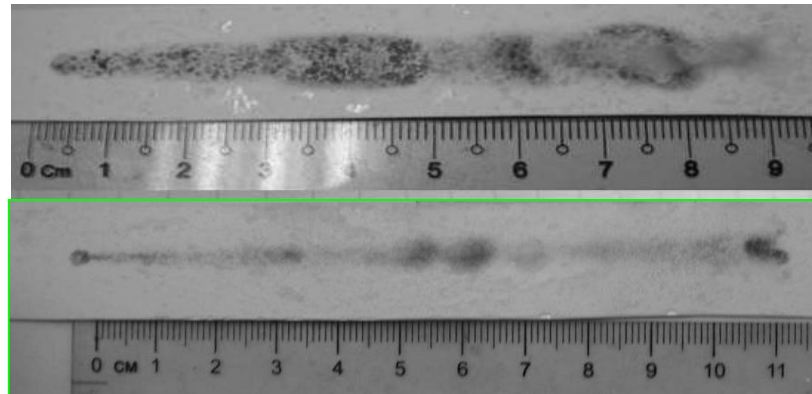
3.4. Li trích và định tính alkaloid

Thuốc thử alkaloid cho phép định tính alkaloid toàn phần có trong mẫu, được biểu hiện qua lượng tủa và qua phản ứng màu đặc trưng: Dragendorff tạo kết tủa đỏ cam, Mayer tủa màu trắng hồng và Wagner tủa màu nâu đất. Qua khảo sát cho thấy tất cả các mẫu đều tạo tủa và phản ứng màu đặc trưng của thuốc thử. Như vậy, ở cây dưa cạn tự nhiên, và các mẫu nuôi cấy *in vitro* đều có alkaloid. Lượng tủa ở mẫu lá và mẫu rễ cao hơn mẫu thân, chứng tỏ hàm lượng alkaloid toàn phần ở rễ nhiều hơn ở thân. Lượng tủa ở mẫu chồi *in vitro*, rễ *in vitro* cao hơn mô sẹo và dịch huyền phù.

Trên bản sắc kí lớp mỏng, mẫu lá, thân, rễ cây tự nhiên, chồi, rễ, mô sẹo nuôi cấy *in vitro* và dịch huyền phù tế bào đều có chứa alkaloid vinblastine (màu xám nhạt) và một số alkaloid khác như vindoline (màu đỏ hồng chuyển sang xanh), catharanthine (màu xanh chuyển sang màu vàng).



Hình 6. Định tính alkaloid toàn phần dưa cạn bằng thuốc thử Dragendorff, Mayer, Wagner. (A) Mẫu thân cây tự nhiên, (B) Mẫu chồi nuôi cấy *in vitro*



Hình 7. Định tính alkaloid cây Dừa cạn bằng phương pháp sắc kí lớp mỏng. (A) Mẫu lá cây tự nhiên có vinblastine ở Rf 0,57; catharanthine ở Rf 0,79; vindoline ở Rf 0,78. (B) Mẫu rễ in vitro có vinblastine ở Rf 0,64; catharanthine ở Rf 0,95; vindoline ở Rf 0,55.

4. KẾT LUẬN

Sự cảm ứng tạo mô sẹo từ các tế bào nhu mô libe gân chính của tử diệp dừa cạn đạt hiệu quả cao trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 1,0 mg/l, BA 0,5 mg/l.

Sự phát sinh chồi từ mô sẹo tốt nhất trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l và BA 2,0 mg/l. Rễ phát sinh từ mô sẹo tốt nhất trên môi trường MS bổ sung NAA 1,0 mg/l.

Dịch huyền phù tế bào được tạo thành từ mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 0,5 mg/l và BA 0,5 mg/l.

Tất cả các mẫu tự nhiên và mẫu nuôi cấy in vitro đều chứa alkaloid vinblastin. Mẫu mô sẹo và dịch huyền phù có hàm lượng alkaloid vinblastin thấp hơn những mẫu khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Kim Quy - Nghiên cứu ly trích Vinblastine. Đề tài Khoa học Trường Đại học Tổng hợp TP.Hồ Chí Minh, 1993.
2. Lâm Hồng Hải - Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Vinh. Nhân giống cảm chương nhập nội bằng phương pháp nuôi cấy mô thực vật, Tạp chí Nông nghiệp Công nghiệp thực phẩm, (1997) 547-548.
3. Nguyen Van Vinh et al. - Physiological analysis, micropropagation, radiation sensitivity and induced mutation of Bananas in Viet Nam, IAEA-312.D2.RC.579.2, 1998.
4. Murashige T, Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures, Plant Physiology **15** (1962) 473-497.
5. Oliver Kayser and Wim J.Quax - Medicinal plant Biotechnology. From basic research to industrial applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2007.

SUMMARY

RESEARCH SOME BIOLOGICAL ALKALOIDS OF *CATHARANTHUS ROSEUS* L. IN CONDITION IN VITRO CULTURES

Callus regenerated conveniently from leaf segment of *Catharanthus roseus* L. on medium containing the combination of 2,4-D (1.0 mg l^{-1}) and BA 0.5 mg l^{-1} . They were solid, dry and developed on the surface of segment. The callus derived from leaf libe parenchyma. The four – week callus regenerated into shoot after three weeks of culturing on MS medium supplemented with NAA 0.5 mg l^{-1} ; BA 2.0 mg l^{-1} . It took three weeks for the callus cultured on MS supplemented with NAA 1.0 mg l^{-1} to regenerate into root. There was cell suspension formation after three weeks of shake culture of callus on liquid MS supplemented with 2,4-D 0.5 mg l^{-1} and BA 0.5 mg l^{-1} . The cells in suspension proliferated conveniently with cells of same size gathering into clusters of 5 – 7 cells. The present of some main alkaloids of *Catharanthus roseus* L., especially vinblastine in the extraction from in vitro cultures including shoots, roots and calluses was confirmed using Thin Layer Chromatography (TLC) and qualitative test using indicator reagents.

Key words: vinblastine, callus, cell suspension

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 7 tháng 8 năm 2009

Trường Đại học Công nghiệp TP. Hồ Chí Minh