

KHẢO SÁT SỰ TẠO MÔ SẸO CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CAPSAICINOID TỪ CÂY MẦM ỚT *CAPSICUM SP.*

Võ Thanh Phúc, Lê Thị Thủy Tiên

Trường Đại Học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 20 tháng 11 năm 2011)

TÓM TẮT: Mô sẹo hình thành từ trụ hạ diệp và tử diệp của cây mầm ớt *Capsicum sp.* *in vitro* trên môi trường MS bổ sung kinetin 0,5 mg/l với 2,4-D hoặc NAA nồng độ thay đổi (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0 mg/l). Sự hình thành mô sẹo từ tử diệp trong điều kiện tối tốt hơn trong điều kiện chiếu sáng, ngược lại, mẫu cây từ trụ hạ diệp tạo sẹo tốt trong điều kiện chiếu sáng. Mô sẹo có dạng bờ và tăng trưởng tốt hơn trên môi trường bổ sung 2,4-D và kinetin. Mô sẹo từ tử diệp tăng trưởng tốt nhất trên môi trường có 2,4-D 3,0 mg/l và kinetin 0,5 mg/l. Mô sẹo từ trụ hạ diệp tăng trưởng tốt nhất trên môi trường có 2,4-D 1,5 mg/l và kinetin 0,5 mg/l. Capsaicinoid có mặt trong mô sẹo ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm, được xác định bằng phương pháp sắc kí bản mỏng.

Từ khóa: capsaicinoid, cây mầm ớt, mô sẹo.

GIỚI THIỆU

Ớt là một trong những loại cây trồng phổ biến trên thế giới. Thành phần tạo nên vị cay và nóng của các loài ớt là một nhóm hợp chất alkaloid liên quan đến capsaicin (8-methyl 6-nonenoyl- vanillylamine) được gọi là capsaicinoid. Các hợp chất này giúp thực vật chống lại sự xâm hại của động vật, một số vi khuẩn và nấm, ...

Capsaicinoid được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm (sản xuất các sốt cay,...), dược phẩm (sản xuất thuốc giảm đau cơ,...), quân sự (thành phần chính trong thuốc xịt phòng vệ,...). Capsaicin còn được nhận thấy có khả năng chống ung thư và chống oxi hóa mạnh [2].

Hiện nay, nhu cầu về hợp chất này trong thực phẩm cũng như dược phẩm đang tăng cao. Trong khi đó, qui trình sản xuất capsaicin

thương mại từ ớt phải trải qua nhiều bước tinh sạch phức tạp. Do đó, nhiều nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp capsaicin của tế bào ớt *Capsicum sp. in vitro* đã được tiến hành nhằm mục đích tiến tới sản xuất capsaicin ở qui mô công nghiệp có điều khiển chặt chẽ.

Thí nghiệm này được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự hình thành, tăng trưởng và tổng hợp capsaicinoid của mô sẹo từ cây mầm ớt *Capsicum sp.* như nguồn gốc mẫu cây, chất điều hòa sinh trưởng thực vật và điều kiện chiếu sáng.

THỰC NGHIỆM

Vật liệu

Tử diệp và trụ hạ diệp từ cây mầm ớt trên môi trường MS bổ sung myo-inositol 100 mg/l, sucrose 20 g/l, agar 6 g/l. Hột giống tạo cây

con là hạt giống ớt cay *Capsicum* sp. FITN 139 (công ty TNHH - TM Trang Nông).

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn gốc mẫu cây, chất điều hòa sinh trưởng và điều kiện chiếu sáng lên sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo

Môi trường tạo sẹo là môi trường MS có bổ sung myo-inositol 100 mg/l, sucrose 30 g/l, agar 6,5g/l, kinetin 0,5 mg/l và auxin (2,4-D, NAA) với các nồng độ 1; 1,5; 2; 2,5 và 3 mg/l. Mẫu cây được duy trì ở nhiệt độ 25 ± 2°C, ẩm độ 70 ± 5%. Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện sáng (2800 lux, 16 giờ/ngày) và trong tối. Mô sẹo hình thành sẽ được cấy chuyển sau mỗi 3 tuần.

Thu nhận và xác định sự hiện diện của capsaicinoid trong mô sẹo bằng phương pháp sắc ký bản mỏng

Mô sẹo 9 tuần tuổi được sấy ở nhiệt độ 40-50°C cho đến khô, sau đó được nghiền nhuyễn để thu bột nguyên liệu. Dung môi sử dụng để ly

trích capsaicinoid là aceton khan. Dung dịch sau trích ly được ly tâm với tốc độ 10 000 vòng/phút để thu dịch chiết có chứa capsaicinoid [6]. Bản mỏng sắc ký được sử dụng là bản silicagel trắng nhôm (Merck 60 F₂₅₄) 10 x 10 cm. Tiến hành chấm sắc ký dịch chiết từ mô sẹo song song với dịch chiết từ trái ớt để so sánh. Hệ dung môi di chuyển là benzene: methanol 16: 1 (theo thể tích). Phát hiện capsaicinoid bằng cách ngâm bản sắc ký trong thuốc thử NaOH 0.4 % + phosphomolybdic acid 3%, sau đó, lấy bản mỏng ra và để khô tự nhiên. Sau 12 giờ, thu kết quả sắc ký. Vệt capsaicin sẽ hiện màu xanh dương với giá trị R_f = 0.16 [2].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự hình thành mô sẹo từ mẫu cây

Sự tạo mô sẹo trong nuôi cấy *in vitro* phụ thuộc vào nhiều yếu tố: kiểu gen, loại mô, cơ quan, chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh và ngoại sinh bao gồm loại, nồng độ và tỉ lệ auxin/ cytokinin ... (Pierik, 1987) [5].

Bảng 1. Sự hình thành mô sẹo từ tử diệp và trụ hạ diệp cây mầm ớt trên môi trường bổ sung kinetin 0,5 mg/l với 2,4-D nồng độ thay đổi sau 7 ngày nuôi cấy

2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Mẫu cây	Tỷ lệ mẫu cây tạo sẹo (%)	
			Sáng	Tối
1,0	0,5	Từ diệp	60	100
		Trụ hạ diệp	100	80
1,5		Từ diệp	80	100
		Trụ hạ diệp	100	80
2,0		Từ diệp	90	100
		Trụ hạ diệp	90	90
2,5		Từ diệp	100	100
		Trụ hạ diệp	100	100
3,0		Từ diệp	100	100
		Trụ hạ diệp	100	100

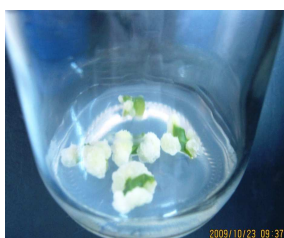
Bảng 2. Sự hình thành mô sẹo từ tử diệp và trụ hạ diệp cây mầm ớt trên môi trường bổ sung kinetin 0,5 mg/l với NAA nồng độ thay đổi sau 7 ngày nuôi cấy

NAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Mẫu cây	Tỷ lệ mẫu cây tạo sẹo (%)	
			Sáng	Tối
1,0	0,5	Tử diệp	80	100
		Trụ hạ diệp	100	80
1,5		Tử diệp	80	100
		Trụ hạ diệp	100	90
2,0		Tử diệp	80	100
		Trụ hạ diệp	100	90
2,5		Tử diệp	100	100
		Trụ hạ diệp	100	100
3,0		Tử diệp	100	100

Mô sẹo hình thành từ vết thương trên mẫu cây tử diệp và trụ hạ diệp cây mầm ớt. Mô sẹo mới hình thành có dạng bột, màu trắng đục, chuyển dần sang màu vàng trong theo sự kéo dài thời gian nuôi cấy (Hình 1a, 1b và 1c). Môi trường có nồng độ auxin cao kích thích sự hình thành mô sẹo nhanh hơn trên môi trường có nồng độ auxin thấp (Bảng 1 và 2). Sự khởi tạo mô sẹo chậm hơn trên các môi trường có nồng độ auxin thấp có thể do sự giảm hoạt tính

enzyme RNA polymerase liên quan đến quá trình phiên mã cần thiết cho hoạt động phân chia tế bào [7].

Sự ảnh hưởng của điều kiện sáng tối lên quá trình hình thành mô sẹo không rõ ràng. Tuy nhiên, nhìn chung điều kiện tối thuận lợi cho việc hình thành mô sẹo từ mẫu cây tử diệp, điều kiện sáng thích hợp cho sự hình thành mô sẹo từ trụ hạ diệp.



(a)



(b)



(c)

Hình 1. Sự tăng trưởng của mô sẹo có nguồn gốc từ tử diệp trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 3,0 mg/l và kinetin 0,5 mg/l trong điều kiện sáng

(a) mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy, (b) mô sẹo sau 6 tuần nuôi cấy, (c) mô sẹo sau 9 tuần nuôi cấy

Mô sẹo trên môi trường chứa NAA và kinetin có dạng chắc và có sự hình thành rễ bất định. Trong khi đó, mô sẹo trên môi trường

chứa 2,4-D tăng trưởng tốt mà không có sự phát sinh hình thái. Rễ bất định hình thành nhiều hơn trên môi trường có nồng độ NAA

thấp (1,0 và 1,5 mg/l). Trên các môi trường có nồng độ NAA cao hơn, sự tăng trưởng của mô sẹo chiếm ưu thế. Sự cảm ứng rễ cần một nồng độ auxin cao nhưng để kéo dài phác thể rễ thì nồng độ auxin thấp là cần thiết [1]. Cũng trên môi trường có NAA, sự tạo rễ bất định từ mô sẹo xảy ra mạnh trong điều kiện tối. Sự phát sinh rễ bất định trong điều kiện chiếu sáng ít hơn trong tối có thể do auxin nội sinh bị phân hủy [3].

Các yếu tố ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của mô sẹo

Auxin

Mô sẹo từ trụ diệp tăng trưởng tốt trên môi trường có 2,4-D 3,0 mg/l nhưng mô sẹo từ trụ hạ diệp tăng sinh mạnh nhất trên môi trường có 2,4-D 1,5 mg/l (Hình 2, 3). Nhu cầu về nồng độ auxin cho sự phân chia của tế bào khác nhau tùy theo kiểu di truyền hay mức độ nhạy cảm của tế bào trong mô hay cơ quan nào đó [1].

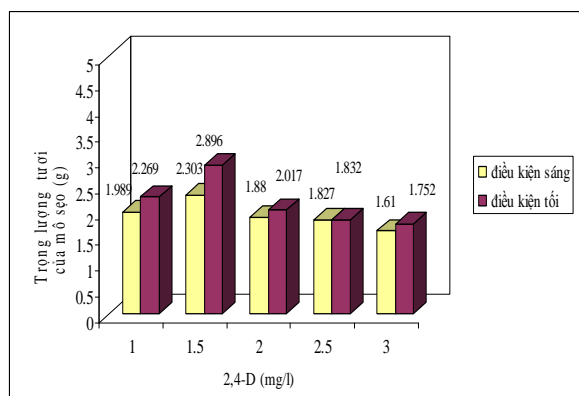
Với mẫu cấy là trụ hạ diệp, môi trường có kinetin 0,5 mg/l phối hợp với 2,4-D 1,5 mg/l hay NAA 1,5 mg/l thích hợp cho sự gia tăng trọng lượng tươi của mô sẹo (Hình 2, 4). Nồng độ auxin thấp hơn hoặc cao hơn đều hạn chế sự gia tăng sinh khối. Taiz và Zeiger (2002) cho rằng nồng độ auxin tối ưu sẽ hoạt hóa một số enzyme, dẫn đến tăng hàm lượng DNA, RNA và protein giúp cho sự phân chia của tế bào mô sẹo. Nồng độ auxin ngoại sinh thấp hơn nồng độ tối ưu sẽ làm giảm IAA nội sinh cần thiết

cho sự hoạt hóa các enzyme liên quan đến sự phiên mã RNA [7]. Trong khi đó, nồng độ auxin cao quá sẽ cảm ứng sinh tổng hợp ethylene. Sự tích lũy ethylene dù chỉ một lượng nhỏ trong bình nuôi cấy có thể ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nhiều mẫu cấy thực vật [3].

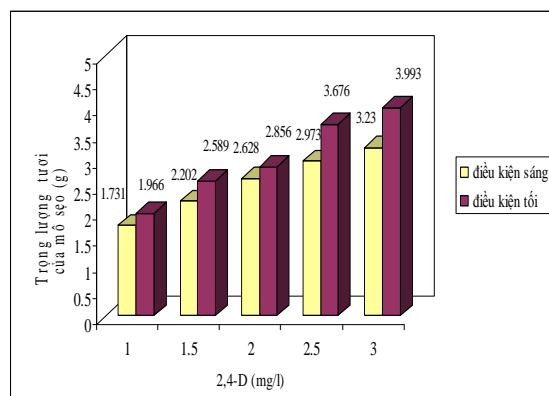
Sự phối hợp giữa 2,4-D và kinetin kích thích sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo tốt hơn môi trường có sự phối hợp giữa NAA và kinetin. Mô sẹo trên môi trường có 2,4-D và kinetin có màu trắng, dạng bờ và tăng sinh nhanh, thích hợp để làm nguyên liệu tạo dịch treo tế bào. Kết quả này phù hợp với kết luận của Phillips và Hubstenberger (1985) khi các ông cho rằng 2,4-D là chất điều hòa sinh trưởng tốt nhất trong sự tạo sẹo từ cây ớt *Capsicum* [4].

Ánh sáng

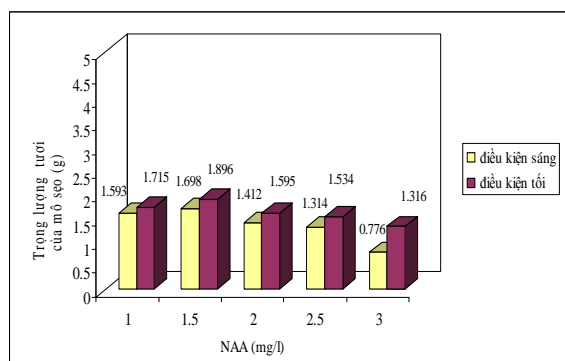
Ánh sáng làm chậm sự tăng trưởng của mô sẹo (Hình 2 -5). Nguyên nhân có thể là do sự phân hủy của auxin tự nhiên trong mẫu cấy. Bên cạnh đó, ánh sáng có thể kích thích sản xuất các hợp chất phenol trong mô sẹo ở một số loài thực vật. Các hợp chất phenol này có thể liên kết với các enzyme liên quan đến sự tăng trưởng của tế bào và ngăn cản sự hoạt động của các enzyme này [1].



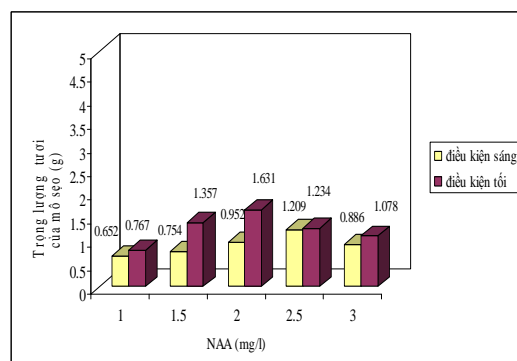
Hình 2. Sự biến thiên trọng lượng tươi của mô sẹo từ trụ hạ điệp trên môi trường có kinetin 0,5 mg/l và 2,4-D sau 6 tuần nuôi cấy



Hình 3. Sự biến thiên trọng lượng tươi của mô sẹo từ trụ hạ điệp trên môi trường có kinetin 0,5 mg/l và 2,4-D sau 6 tuần nuôi cấy

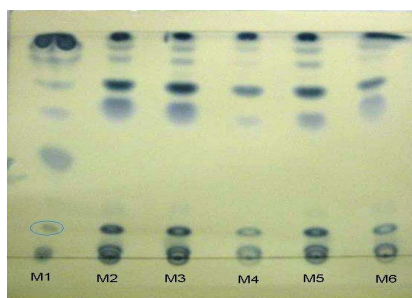


Hình 4. Sự biến thiên trọng lượng tươi của mô sẹo từ trụ hạ điệp trên môi trường có kinetin 0,5 mg/l và NAA sau 6 tuần nuôi cấy



Hình 5. Sự biến thiên trọng lượng tươi của mô sẹo từ trụ hạ điệp trên môi trường có kinetin 0,5 mg/l và NAA sau 6 tuần nuôi cấy

Xác định sự hiện diện của capsaicinoid trong mô sẹo



Hình 6. Kết quả xác định sự hiện diện của capsaicinoid trong mô sẹo từ trụ hạ điệp trên môi trường bổ sung 2,4-D và kinetin ở điều kiện sáng trên bản mỏng sắc kí

M1: dịch chiết ợt

M2, M3, M4, M5, M6: dịch chiết mô sẹo trên môi trường có 2,4-D (1; 1,5; 2; 2,5; 3 mg/l) và kinetin 0,5 mg/l.

Kết quả từ bản mỏng sắc kí cho thấy có sự hiện diện của capsaicinoid trong mô sẹo qua sự xuất hiện của các chấm màu xanh dương ở vị trí $R_f = 0.16$ (Hình 6). Ngoài chấm màu xanh dương ở vị trí $R_f = 0.16$, còn có sự xuất hiện của các chấm khác ở các vị trí có giá trị R_f cao hơn, được tạo ra do các hợp chất có tính khử trong mẫu tác dụng với phosphomolybdic acid. Các vết này xuất hiện ở cả mẫu dịch chiết ớt và mẫu dịch chiết mô sẹo. Điều này chứng tỏ mẫu sẹo có thể chứa các hợp chất tương tự như trong quả ớt.

Các mẫu mô sẹo từ tử diệp và trụ hạ diệp trên các môi trường và điều kiện nuôi cấy còn lại đều thu được kết quả tương tự. Như vậy, qua kết quả thu được trên bản mỏng sắc ký, ban đầu có thể nhận định sự hiện diện của nhóm hợp chất capsaicinoid trong mô sẹo có nguồn gốc từ tử diệp và trụ hạ diệp cây mầm ớt. Tuy nhiên, mẫu cấy, nồng độ chất điều hòa sinh trưởng cũng như điều kiện nuôi cấy nào là tối

ưu cho tích lũy capsaicinoid vẫn chưa xác định được. Vì vậy, việc định lượng capsaicinoid cần được tiến hành để xác định được nghiệm thức tối ưu cho sự tích lũy capsaicinoid trong mô sẹo làm nguồn nguyên liệu tạo dịch treo tế bào.

KẾT LUẬN

Mô sẹo từ tử diệp và trụ hạ diệp cây mầm hình thành và tăng trưởng tốt trên môi trường bổ sung kinetin 0,5 mg/l kết hợp với 2,4-D. Nồng độ 2,4-D khác nhau tùy theo nguồn gốc của mô sẹo. Mô sẹo từ tử diệp tăng trưởng tốt nhất trên môi trường có kinetin 0,5 mg/l và 2,4-D 3,0 mg/l, mô sẹo từ trụ hạ diệp tăng trưởng tốt nhất trên môi trường có kinetin 0,5 mg/l và 2,4-D 1,5 mg/l trong điều kiện tối. Capsaicinoid có mặt trong mô sẹo ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm, được xác định bằng phương pháp sắc ký bản mỏng.

STUDYING ON CALLUS FORMATION FROM CHILLI PLANTLET *CAPSICUM SP.* AND CAPSAICINOID ACCUMULATION *IN VITRO*

Vo Thanh Phuc, Le Thi Thuy Tien

University of Technology, VNU-HCM

ABSTRACT: *Callus was initiated from hypocotyls and cotyledons explants of chilli Capsicum sp. in vitro on MS medium with 0,5 mg/l kinetin and 2,4-D /NAA (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 and 3,0 mg/l). Callus from cotyledon explants was induced in the dark better than in the light, whereas callus from hypocotyl explants was initiated in the light better than in the dark. Callus was more friable and grew faster on medium with 2,4-D and kinetin. MS medium with 3,0 mg/l 2,4-D and 0,5 mg/l kinetin was optimal for the growth of callus from cotyledon explants. Besides, callus from hypocotyl explants grew best on MS*

medium with 1,5 mg/l 2,4-D and 0,5 mg/l kinetin. Capsaicinoid from callus which was determined by thin layer chromatography was recognized in all treatment experiments.

Key words: capsaicinoid, chilli plantlet, callus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Đức Lương, Lê Thị Thủy Tiên. *Công nghệ tế bào*. Nhà xuất bản đại học quốc gia TP Hồ Chí Minh (2006).
- [2]. De, A.K. *Capsicum – Medicinal and aromatic plants- Industrial Profiles*. Taylor and Francis Group (2003).
- [3]. George, E.F. *et al. Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer (2008).
- [4]. Phillips, G.C., Hubstenberger. Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4, 261-269 (1985).
- [5]. Pierik. *In vitro culture of higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster (1987).
- [6]. Sadasivam, S *et al. Biochemical methods*. New Age International Publishers (1996).
- [7]. Taiz, L., Zeiger, E. *Auxin: Plant Physiology*. Sinaver Associates Inc Pub (2002).