

NUÔI CÂY MÔ SẸO VÀ DỊCH HUYỀN PHỤ TẾ BÀO CÂY BÈO ĐẤT *DROSERA BURMANNI VAHL* CHO MỤC TIÊU THU NHẬN QUINONE

Quách Ngô Diễm Phương⁽¹⁾, Hoàng Thị Thanh Minh⁽¹⁾, Hoàng Thị Thu⁽²⁾, Bùi Văn Lệ⁽¹⁾

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

(2) Trường ĐH Nông Lâm TP. HCM

(Bài nhận ngày 05 tháng 04 năm 2010, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 30 tháng 06 năm 2010)

TÓM TẮT: *Drosera burmanni Vahl* là một trong 3 loài *Drosera* ở Việt Nam đã được nuôi cấy *in vitro* thành công. Những nghiên cứu trước đây của nhóm chúng tôi đã chứng minh rằng dịch chiết của cây *Drosera burmanni Vahl* chứa những hợp chất quinone có hoạt tính sinh học như naphthoquinone, anthraquinone. Nhằm mục tiêu chủ động nhân nhanh sinh khối tế bào cũng như tăng sinh hàm lượng hợp chất thứ cấp, nhu cầu nuôi cấy mô sẹo cũng như dịch huyền phù cây *Drosera* trở nên vô cùng cấp thiết. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung vào việc xây dựng quy trình tạo mô sẹo và nuôi cấy dịch huyền phù tế bào cây *Drosera burmanni Vahl* hướng đến mục tiêu thu nhận quinone. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường tạo mô sẹo tốt nhất là môi trường Gamborg's B5, saccharose 20g/l, casein 100mg/l, PVP 1g/l. Hormone thích hợp để cảm ứng tạo sẹo là 2,4-D 0,2mg/l, NAA 0,2mg/l. Kiểu tăng sinh mô sẹo tối ưu nhất phù hợp với điều kiện nuôi cấy huyền phù tế bào và giúp sinh khối tế bào tăng trưởng mạnh nhất vào ngày thứ 12. Kết quả phân tích HPLC cho thấy có sự hiện diện của Plumbagin, một trong những hợp chất quinone quan trọng được xác định trong họ cây *Drosera*, trong sinh khối tế bào của huyền phù nuôi cấy được.

Từ khóa: *Drosera burmanni Vahl*, huyền phù tế bào, mô sẹo, plumbagin

1. MỞ ĐẦU

Drosera burmanni Vahl là một loài thực vật bắt mồi nhỏ, thân thảo, mang nhiều giá trị ứng dụng [[1],[3],[5],[12]]. Hình dáng lạ cùng màu sắc sặc sỡ và những lông tiết long lanh trong nắng tạo cho cây có vẻ đẹp độc đáo, vì thế *Drosera burmanni Vahl* được đánh giá cao trong làng hoa cảnh thế giới [[12], [13]]. Mặt khác, *Drosera burmanni Vahl* chứa nhiều hợp chất thứ cấp có giá trị y dược như: plumbagin, 7-methyljuglone, quercetin, myricetin [[9], [10], [12]]. Trong đó, nhóm chức quinone nổi

bật với tác dụng: kháng lao, chống ung thư, chữa phong, chống hen suyễn....[[12]]

Ở Việt Nam, hiện nay chỉ có 3 loài *Drosera* được tìm thấy [[2]]. Những nghiên cứu về *Drosera burmanni Vahl* của nhóm chúng tôi đã thu nhận một số thành công như: nuôi cấy *in vitro*, hoàn thành quy trình nhân chồi, quy trình thu nhận hợp chất anthraquinone từ cây *in vitro*, khảo sát hoạt tính sinh học của chất này [[4]]. Do đó, để hướng tới mục tiêu tự động hóa và chủ động tăng sinh hợp chất quinone có hoạt tính sinh học, chúng tôi nghiên cứu quy trình nuôi cấy

mô sẹo và huyền phù tế bào *Drosera burmanni* Vahl.

2. VẬT LIỆU- PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Cây *Drosera burmanni* Vahl *in vitro* nuôi cấy trên môi trường MS 1/2 lỏng bổ sung casein, pH 5,8 và phát triển trong điều kiện: nhiệt độ phòng 22-25⁰C, chiếu sáng 16giờ/ngày [[9]].

2.2. Phương pháp

Nuôi cấy mô sẹo

Ảnh hưởng của nền khoáng và nồng độ đường lên sự phát triển mẫu cấy lớp mỏng (TCL)

Các bộ phận gồm thân, lá non (lớp lá thứ nhất hay thứ hai) và phát hoa của cây *Drosera burmanni* Vahl *in vitro* được cắt thành các lớp mỏng (từ 0,2-0,5mm), cấy vào môi trường kết hợp giữa các nồng độ đường thay đổi từ 5-30g/l và nền khoáng thay đổi là MS, MS ½, Gamborg's B5.

Cảm ứng tạo mô sẹo từ mẫu cấy lớp mỏng trên nền khoáng đã tối ưu bằng hormone thích hợp

- *Tìm loại hormone thích hợp:* Mẫu cắt lát mỏng cây *Drosera burmanni* Vahl được cấy trên môi trường với thành phần khoáng và nồng độ đường đã tối ưu, bổ sung các cặp hormone tương ứng: NAA và 2,4-D [[7]], NAA và IBA [[11]], NAA và BA [[4]], ủ trong tối.
- *Tìm nồng độ hormone thích hợp:* Mẫu cắt lát mỏng của phát hoa, thân, lá non được

đưa vào môi trường Gamborg's B5 bổ sung NAA 0,2mg/l và nồng độ 2,4-D thay đổi từ 0,1-0,5mg/l và ủ tối 21 ngày.

Kiểu nuôi cấy tăng sinh mô sẹo

Mô sẹo được cấy lên môi trường Gamborg's B5, saccharose 20g/l, PVP 1g/l, casein 100mg/l, NAA 0,2mg/l, 2,4-D 0,2mg/l; các kiểu nuôi cấy khác nhau: rắn, lỏng lắc, lỏng tĩnh, bán rắn.

Nuôi cấy dịch huyền phù

Dịch huyền phù tế bào được tạo bằng cách đưa mô sẹo vào môi trường Gamborg's B5 lỏng với 20g/l saccharose, casein 100mg/l, PVP 1g/l, NAA 0,2mg/l, 2,4-D 0,2mg/l và được lắc với vận tốc 100vòng/phút ở trong tối, nhiệt độ 25°C ± 2°C. Dịch huyền phù tế bào được cấy chuyển liên tục: 12-18ngày/lần. Đường cong tăng trưởng của tế bào được xác định bằng cách đo mật độ quang tế bào ở bước sóng 610nm.

Sự hiện diện của Plumbagin trong dịch huyền phù nuôi cấy được

Bằng phương pháp đo mật độ quang: Quinone có phổ đồ đặc trưng ở độ dài sóng hấp thu trong khoảng 422nm. Plumbagin là một trong nhóm những hợp chất naphthoquinone. Vì vậy, mật độ quang của dịch chiết huyền phù tế bào ở bước sóng 422nm có thể phản ánh sơ bộ hàm lượng plumbagin trong huyền phù tế bào.

Bằng HPLC: Trước khi đem tiến hành định lượng Plumbagin bằng HPLC, dịch huyền phù tế bào *Drosera* được đem xử lý theo thứ tự: ly tâm để có dịch môi trường và sinh khối tế bào;

dịch môi trường được lọc qua đầu lọc 0,2 μ m trước khi tiêm cột, còn sinh khối tế bào được nghiền trong methanol tuyệt đối; đánh sóng siêu âm 30 phút thu dịch chiết, dịch chiết này được xử lý tương tự dịch môi trường trước khi tiêm vào cột.

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Nuôi cấy mô sẹo

Ảnh hưởng của thành phần khoáng và nồng độ đường lên sự phát triển của mẫu cấy lớp mỏng

Bảng 1. Tỷ lệ mẫu sống ở các nghiệm thức sau 14 ngày nuôi cấy

Loại môi trường	Nồng độ đường (g/l)			
	5	10	20	30
MS	16,67	11,67	11,67	10,00
MS ½	8,33	18,33	11,67	18,33
Gamborg's B5	13,33	20,00	36,67	13,33

Về nồng độ đường: Kết quả cho thấy rằng ở nồng độ đường 20g/l mẫu lớp mỏng sống và phát triển được (20% mẫu sống) trong khi ở nồng độ đường quá cao và quá thấp mẫu nuôi cấy đều chết. Một đặc điểm thường gặp ở phương pháp lớp mỏng tế bào là mẫu nuôi cấy khá nhạy cảm với áp suất thẩm thấu. Ghi nhận thực tế cho thấy, khi sử dụng nồng độ đường cao các mẫu nuôi cấy sẽ bị chết đen và có xu hướng co lại do mất nước.

Như vậy khi kết hợp cả hai yếu tố ảnh hưởng đến mẫu nuôi cấy chúng tôi chọn được môi trường tốt nhất cho mẫu cấy lớp mỏng *D. burmannii* là môi trường Gamborg's B5 với

Về thành phần khoáng: Kết quả cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa giữa việc sử dụng môi trường Gamborg's B5 với 2 loại môi trường MS và MS 1/2. Môi trường Gamborg's B5 cho tỷ lệ mẫu sống trung bình cao nhất (20,83%) và thấp nhất là môi trường MS, với tỷ lệ mẫu sống trung bình là 12,5%. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trên thế giới chọn môi trường Gamborg's B5 là môi trường cơ bản để tạo mô sẹo ở một số loài *Drosera* [[11]].

nồng độ đường 20g/l, nghiệm thức này cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất (36,67%).

Cảm ứng tạo mô sẹo từ mẫu cấy lớp mỏng trên nền khoáng đã tối ưu bằng hormone thích hợp

– *Tìm loại hormone thích hợp*

Sau 2 tuần nuôi cấy, kết quả sự hình thành mô sẹo từ lớp mỏng tế bào cây *D. burmannii* Vahl trên môi trường Gamborg's B5, saccharose 20g/l, bổ sung các cặp hormone khác nhau:

Bảng 2. Tỷ lệ tạo mô sẹo trên môi trường có kết hợp 2 loại hormone khác nhau

Các loại hormone kết hợp (mg/l)	NAA (0,2) 2,4-D (0,1)	NAA (0,5) IBA (1)	NAA (1) BA (0,2)
Tỷ lệ mẫu tạo sẹo	25,17 ^c	2,93 ^b	0 ^a

Kết quả từ bảng 2 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các nghiệm thức sử dụng hormone NAA/2,4-D; NAA/IBA; NAA/BA. Trong đó sự kết hợp 2 loại NAA/BA cho kết quả thấp nhất (không có sự tạo thành mô sẹo mà chỉ có sự hình thành chồi trực tiếp từ các mẫu thân) và sự kết hợp 2 loại hormone NAA/2,4-D cho kết quả tạo mô sẹo tốt nhất (25,17%). Sự kết hợp cùng lúc 2 loại auxin để tạo mô sẹo ở một số loài *Drosera* đã được ghi nhận trong một số nghiên cứu cả trong và ngoài nước [[6],[7],[8],[9]]. Thông thường mô sẹo được tạo thành khi có sự tác động đồng thời của cả 2 loại hormone auxin và cytokinin, trong đó hàm lượng auxin nhiều hơn. Tuy nhiên, ở một số đối tượng, lượng auxin nội sinh thấp, mẫu nuôi cấy cần lượng lớn hơn auxin để cảm ứng hình thành mô sẹo.

Tổng hợp các ghi nhận và phân tích, chúng tôi chọn sự kết hợp 2 loại hormone NAA/2,4-D cho việc cảm ứng hình thành mô sẹo từ lớp mỏng các bộ phận cây *D. burmanni* Vahl.

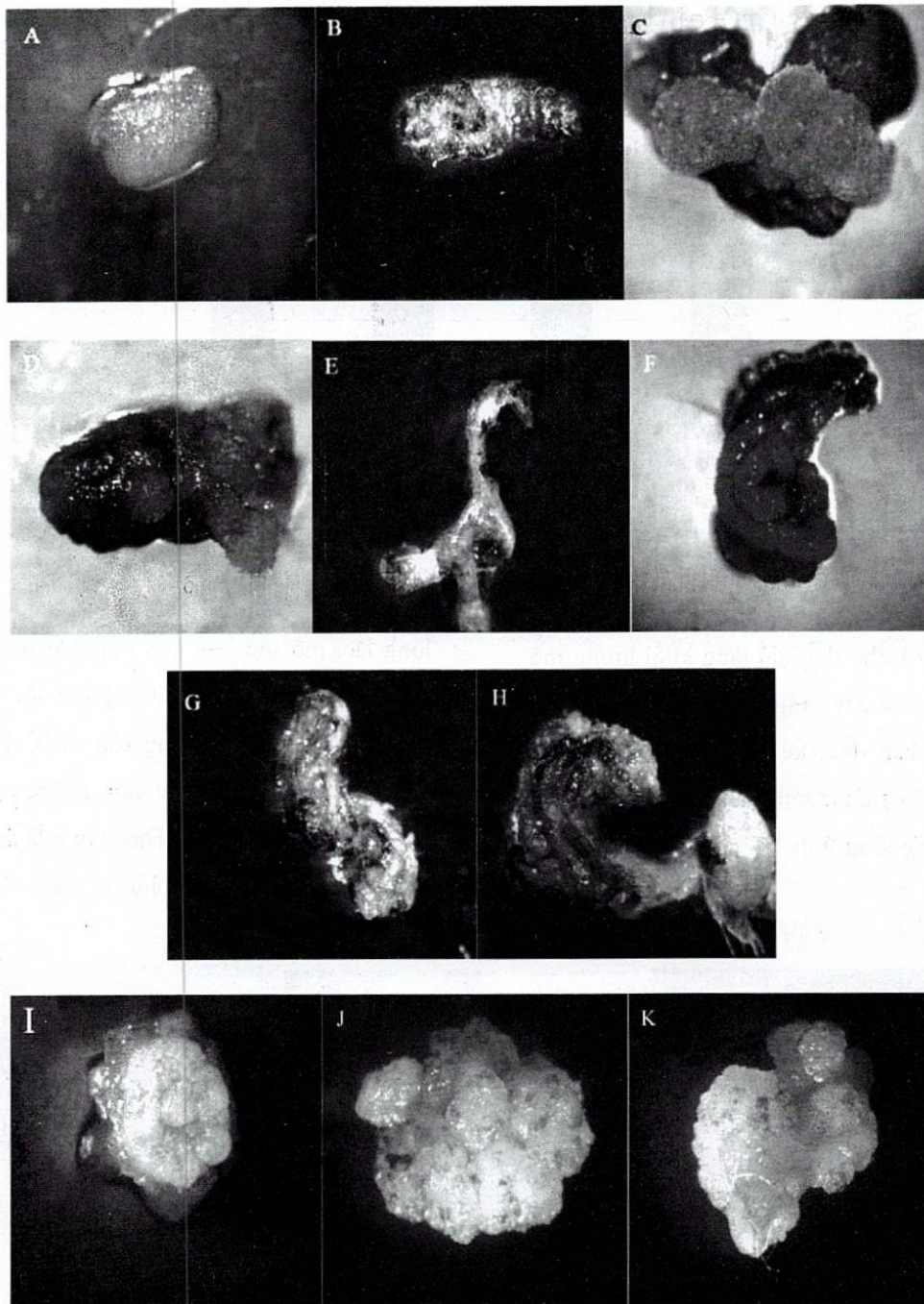
– *Tìm nồng độ hormone thích hợp*

Qua bảng 3, hình 1 cho thấy, đối với cả 3 loại vật liệu đầu tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đều thấp nhất ở nghiệm thức có môi trường chỉ bổ sung NAA (0,2mg/l). Trong khi ở nghiệm thức bổ sung NAA (0,2mg/l)/2,4-D (0,2mg/l) tỷ lệ tạo sẹo lớn nhất ở cả 3 loại mẫu: 52,77% ở mẫu phát hoa TCL, 72,23% ở mẫu thân TCL, 27,77% ở mẫu lá TCL. Qua kết quả này, cho thấy: các mẫu lớp mỏng từ lóng thân cho tỷ lệ tạo sẹo lớn nhất trong khi các mẫu lá thấp nhất. Kết quả này có lẽ là do đặc điểm hình thái của cây *D. burmanni* Vahl: bề mặt lá của chúng mang nhiều tua cuốn khiến chúng khó tiếp xúc với môi trường; các tua cuốn này lại chứa chất nhầy và nhiều loại enzyme thường gây ảnh hưởng không tốt đến các mẫu nuôi cấy.

Với những nhận xét trên, chúng tôi chọn nồng độ kết hợp tối ưu cho việc tạo mô sẹo là NAA 0,2mg/l và 2,4-D 0,2mg/l cho mọi loại vật liệu đầu từ lớp mỏng cây *D. burmanni* Vahl.

Bảng 3. Kết quả khảo sát nồng độ thích hợp của 2,4-D khi kết hợp với NAA (0,2mg/l) để cảm ứng tạo mô sẹo

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	% tạo mô sẹo từ lá	% tạo mô sẹo từ phát hoa	% tạo mô sẹo từ thân
0	8,30	5,53	0,00
0,1	16,70	22,23	38,90
0,2	27,77	52,77	72,23
0,3	22,23	36,10	55,53
0,4	13,90	19,47	50,00
0,5	13,90	22,23	22,23

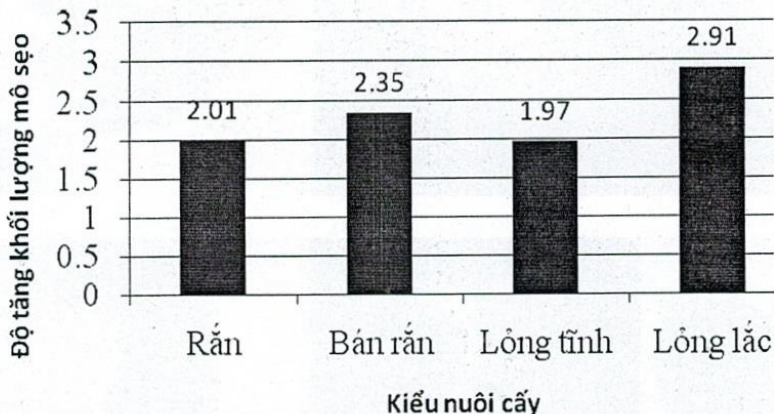


Hình 1. Mô sẹo được hình thành từ mẫu lớp mỏng cây *D. burmanni* Vahl trên môi trường Gamborg's B5, bổ sung NAA (0,2mg/l) và 2,4-D nồng độ thay đổi
A; B; C; D: Phát hoa TCL bổ sung 2,4-D lần lượt theo thứ tự 0; 0,1; 0,2; 0,5mg/l
E; F; G; H: Lá TCL bổ sung 2,4-D lần lượt theo thứ tự 0; 0,2; 0,3; 0,5mg/l
I; J; K; L: Thân TCL bổ sung 2,4-D lần lượt theo thứ tự 0,1; 0,2; 0,4; 0,5mg/l

Kiểu nuôi cấy tăng sinh mô sẹo

Ảnh hưởng của kiểu nuôi cấy lên sự tăng sinh khối mô sẹo được đánh giá qua khối lượng

sinh khối sau 21 ngày nuôi cấy so với khối lượng sinh khối ban đầu.



Biểu đồ 1. Độ tăng sinh khối mô sẹo so với sinh khối ban đầu ở các kiểu nuôi cấy khác nhau.

Biểu đồ 1 cho thấy độ tăng khối lượng mô sẹo ở kiểu nuôi cấy lông lắ là tốt nhất, 291% khối lượng ban đầu, kế đến là kiểu nuôi cấy bán rắn 235%, môi trường rắn 201%, cuối cùng là môi trường lông tnh 197%. Ở kiểu nuôi cấy

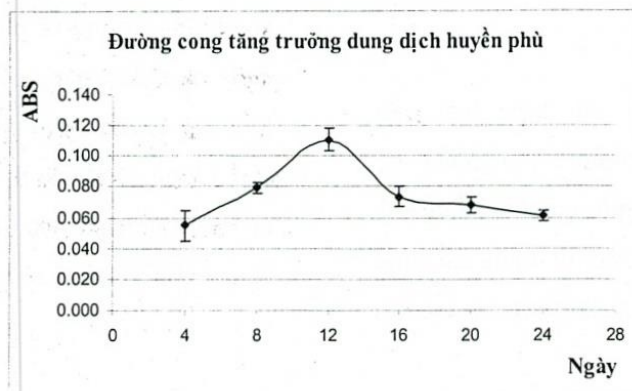
lông lắ, mô sẹo vừa hấp thu chất dinh dưỡng dễ dàng vừa có sự trao đổi khí tốt hơn nên trọng lượng mô sẹo tăng lớn nhất, đồng thời được tách rời thành các cụm tế bào và tế bào rời trong dịch nuôi cấy. Đây chính là dạng khởi đầu của dịch huyền phù tế bào (Hình 2).



Hình 2. Huyền phù tế bào từ mô sẹo có nguồn gốc thân cây *Drosera burmanni* Vahl

Nuôi cấy huyền phù tế bào

Dịch huyền phù tăng trưởng nhanh trong khoảng từ ngày thứ 8 đến ngày thứ 12 và đạt giá trị cực đại về độ đục ở ngày thứ 12



Biểu đồ 2. Đường cong tăng trưởng của dịch huyền phù tế bào *Drosera burmanni* Valh

Sự hiện diện của Plumbagin trong dịch huyền phù nuôi cấy được

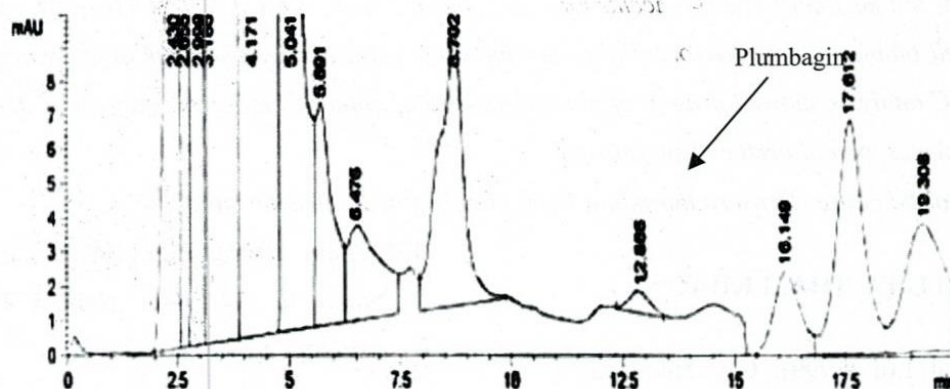
Bằng phương pháp đo mật độ quang

Kết quả bán định lượng bằng phương pháp đo mật độ quang cho thấy rằng hàm lượng quinone trong dung dịch huyền phù là: $0,00331 \pm 0,00024 \text{ mg/ml}$.

Bằng HPLC

Kết quả chạy HPLC cho thấy hàm lượng plumbagin trong dung dịch môi trường của huyền phù tế bào chỉ ở dạng vết, còn trong sinh khối tế bào là 0,02%. Kết quả này tương đối

thấp so với nghiên cứu trên thế giới về dịch huyền phù của những cây khác trong họ *Drosera*. Chẳng hạn như nghiên cứu của Hook L.I.I. (2001), naphthoquinone trong huyền phù tế bào *Dionaea muscipula*, *Drosera capensis* đều tiết ngoại bào. Trong đó, hàm lượng plumbagin trong huyền phù dung dịch tế bào *Dionaea muscipula* là 2,59% , hàm lượng 7-methyljuglone dung dịch huyền phù tế bào *Drosera capensis* là 1,24% [[7]]. Do đó, trong những nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sẽ tối ưu hóa các điều kiện môi trường, nhiệt độ, pH nuôi cấy để thu nhận hợp chất thứ cấp cao hơn.



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC của sinh khối tế bào từ dịch huyền phù.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã khảo sát được loại môi trường, đường, loại hormone và nồng độ hormone phù hợp để tạo mô sẹo; kiểu nuôi cấy phù hợp để tăng sinh mô sẹo; từ đó đã tạo được dịch huyền phù tế bào cây *Drosera burmanni*

Vahl tăng trưởng và phát triển tốt chỉ trong 12 ngày và có khả năng tích lũy hợp chất quinone. Kết quả là bước tiến vô cùng quan trọng cho chiến lược tăng sinh thu nhận hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học từ loài cây *Drosera* bằng công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật.

CALLUS AND CELL SUSPENSION CULTURE OF *DROSERA BURMANNI* VAHL FOR QUINONE PRODUCTION

Quach Ngo Diem Phuong⁽¹⁾, Hoang Thi Thanh Minh⁽¹⁾, Hoang Thi Thu⁽²⁾, Bui Van Le⁽¹⁾

(1) University of Natural Sciences, VNU-HCM

(2) University of Agriculture and Forestry

ABSTRACT: *Drosera burmanni* Vahl, one of three *Drosera* species in Vietnam, has been successfully cultured in vitro. Our previous researchs have shown that extracts of *Drosera burmanni* Vahl contain bioactive compounds such as naphthoquinone, anthraquinone. To obtain cell biomass as well as increase secondary metabolites, callus and cell suspension culture of *Drosera burmanni* Vahl become extremely urgent. Therefore, in this study, we focused on building *Drosera burmanni* Vahl callus and suspension culture process to obtain quinone. Our results show that the most optimized medium for callus culture is Gamborg's B5, saccharose 20g/l, casein 100 mg/l, PVP 1g/l. To induce callus culture, the best hormone's concentration is 2,4-D 0,2 mg/l, NAA 0,2 mg/l. Growing callus and increasing cell biomass in suspension culture are the same culture type. The peak of growing phase is on 12th. HPLC analysis showed present of plumbagin, one of quinone bioactive compounds determined in *Drosera* species, on cultured cell suspension.

Key words: callus, *Drosera burmanni* Vahl, plumbagin, suspension cultures

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đỗ Tất Lợi (1999). Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nxb. Y học, TP. HCM.
- [2]. Phạm Hoàng Hộ (1993). Cây cỏ Việt Nam. Nxb. Giáo dục, TP.HCM.

- [3]. Phạm Hoàng Hộ (1994). Cây cỏ vị thuốc ở Việt Nam. Nxb. Y học, TP. HCM.
- [4]. Quách Ngô Diễm Phương, Bùi Văn Lê (2007). Nhân giống *in vitro* cây bắt ruồi *Drosera burmanni* Vahl để thu nhận hợp chất quinone có hoạt tính sinh học.

- Tạp chí phát triển KH&CN*, tập 10, 59-66
- [5]. Võ Văn Chi, Trần Hợp (1999). *Cây cỏ có ích ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Giáo dục, TP. Hồ Chí Minh, tr. 342-346.
- [6]. Blehová A., Erdelský K., Repečák M., Garcár J. (1995). Production and accumulation of 7-methyljuglone in callus and organ culture of *Drosera spathulata* Labill. *Biologia*, 50, pp. 397-401.
- [7]. Hook L. I. Ingrid (2001), Naphthoquinone contents of *in vitro* cultured plants and cell suspensions of *Dionaea muscipula* and *Drosera species*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67 (3): 281-285
- [8]. Jayaram K., Prasad M. N. V. (2005). Rapidly *in vitro* multiplied *Drosera* as reliable source for plumbagin bioprospection. *Current science*, 89, pp. 447-448
- [9]. K. Jayaram, M.N.V. Prasad (2006). *Drosera indica* L. and *D. burmanii* Vahl, medicinally important insectivorous plants in Andhra Pradesh-regional threats and conservation. *Current Science*. Vol. 91, No. 7, 943-946
- [10]. Madhavan V, Hema Basnett, Gurudeva MR, Yoganarasimhan (2009). Pharmacognostical evaluation of *Drosera burmanii* Vahl (*Droseraceae*). *Indian Journal of Traditional Knowledge*. Vol. 8(3), pp. 326-333.
- [11]. Nahálka J., Blanárik P., Geimeiner P., Matúsová E., Partlová I., (1996). Production of plumbagin by cell suspension cultures of *Drosophyllum lusitanium* Link. *Journal of Biotechnology* 49: 153-161
- [12]. Samaj J, Blehová A., Repečák M., Ovecka M. và M. BoBák, (1999). *Drosera* species (Sundew): *In vitro* culture and the production of plumbagin and other secondary metabolites. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 43: 105-135
- [13]. Sundews
www.botany.uwc.ac.za/gavin/pop_articles/popart03.html