

TÌM HIỂU VAI TRÒ CỦA MỘT VÀI YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG VÀ CÁC CHẤT ĐIỀU HOÀ TĂNG TRƯỞNG THỰC VẬT TRÊN HÀM LƯỢNG NICOTIN Ở LÁ THUỐC LÁ (*NICOTIANA TABACUM* L.)

Nguyễn Đình Sỹ, Hồ Kỳ Quang Minh, Bùi Trang Việt

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT: Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của vài yếu tố môi trường và chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự thay đổi hàm lượng nicotin trong lá thuốc lá. Hàm lượng nicotin gia tăng theo sự tăng trưởng lá. Sự chiếu sáng 12 giờ trong ngày và tỉ lệ NO_3^-/NH_4^+ thấp làm giảm sự tích tụ nicotin trong lá. Xử lý GA_3 10mg/l kích thích sự tăng trưởng nhưng làm giảm hàm lượng nicotin trong lá. Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật: auxin, cytokinin, gibberelin và acid abscisic được thảo luận liên hệ với sự tăng trưởng rễ và lá và hàm lượng nicotin của lá.

Từ khóa: *Nicotiana tabacum* L., nicotin, chất điều hòa tăng trưởng thực vật, tỉ lệ NO_3^-/NH_4^+ .

1. MỞ ĐẦU

Con đường sinh tổng hợp nicotin ở thực vật, qua phản ứng kết hợp giữa glyceraldehyd 3-phosphat và acid aspartic, dẫn tới acid nicotinic, tiền chất của alkaloid nicotin. Con đường sinh tổng hợp này có tầm quan trọng đặc biệt không chỉ vì các hiệu ứng độc hại của nicotin (một thành phần của khói thuốc lá) mà còn vì acid nicotinic là một thành phần của NAD và NADP, các chất có vai trò chuyển điện tử không thể thiếu trong tế bào (Taiz and Zeiger 1991). Bằng cách ghép thuốc lá với cà chua, người ta chứng minh nicotin được tổng hợp ở rễ thuốc lá. Sau khi được tổng hợp ở rễ, nicotin theo mạch mội di chuyển lên trên và tích tụ ở những cơ quan khác nhau, nhiều nhất là ở lá (Tso 1990).

Trồng và chế biến thuốc lá đã phát triển trên khắp hành tinh, đem lại lợi ích kinh tế cho nhiều quốc gia trên thế giới. Nhưng y học cũng đã phát hiện sự độc hại của thuốc lá cho sức khỏe con người (Davis and Nidsen 1999). Cuộc đấu tranh để loại bỏ “thói quen” hút thuốc không phải lúc nào cũng đạt hiệu quả như mong muốn. Do đó, chúng tôi tìm hiểu sự ảnh hưởng của một vài yếu tố môi trường và chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự tổng hợp nicotin ở cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* L. với mục đích làm giảm đi phần nào lượng nicotin tồn tại trong lá thuốc.

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu: Hạt thuốc lá *Nicotiana tabacum* L. thuộc giống C₁₇₆.

2.2. Phương pháp:

Nuôi cấy *in vitro* và theo dõi đường cong tăng trưởng: Hạt được khử trùng và gieo trên môi trường MS trong ống nghiệm. Sau 120 ngày, cây cao 15 – 17 cm, có 7 – 10 lông, được cắt thành các khúc cắt bao gồm 1 đốt và 1 chồi ngủ (chỉ lấy phần giữa thân, bỏ phần chồi ngọn và 2-3 đốt gốc). Các khúc cắt được cấy chuyển trên môi trường MS ở các điều kiện 2500 ± 500 lux, 30 ± 2 °C và độ ẩm tương đối 56%. Xác định sự tăng trưởng của lá thuốc theo thời gian. Các khúc cắt cũng được nuôi trên môi trường được giảm nitrat (bảng 1) trong ống nghiệm. Quan sát sự tăng trưởng thực vật và hàm lượng nicotin trong lá 17 ngày tuổi.

Bảng 1: Thành phần N, P và K trong môi trường nuôi cấy

Môi trường	Nồng độ (g/l)			
	NH ₄ NO ₃	KNO ₃	KH ₂ PO ₄	KCl
Chuẩn (MS)	1,65	1,9	0,17	0
Giảm NO ₃	1,65	0	0,17	1,3

Xử lý ánh sáng trên lá tách rời: Lá (thứ 2) của cây *in vitro* 17 ngày tuổi được nuôi cấy trong Erlen chứa môi trường bán lỏng MS½ ở các điều kiện: 12 giờ sáng/ngày, 6 giờ sáng/ngày, 0 giờ sáng/ngày. Một số chỉ tiêu sinh lý và hàm lượng nicotin được đo sau 5 ngày nuôi cấy.

Xử lý chất điều hoà tăng trưởng thực vật trên lá và rễ tách rời: Lá và rễ cây *in vitro* 17 ngày tuổi được nuôi cấy trong Erlen chứa môi trường bán lỏng MS ½) với IAA 2mg/l, BA 1mg/l hay GA₃ 10mg/l. Một số chỉ tiêu sinh lý và hàm lượng nicotin được đo sau 5 ngày xử lý.

Đo cường độ quang hợp và cường độ hô hấp: Cường độ quang hợp và cường độ hô hấp của các lá được đo ở 25°C, bằng máy Warburg.

Hàm lượng chất điều hoà tăng trưởng thực vật: Li trích chất điều hoà tăng trưởng thực vật được thực hiện dựa vào sự thay đổi dung môi và pH. Hàm lượng các chất điều hoà tăng trưởng thực vật được đo nhờ các sinh trắc nghiệm chuyên biệt và hàm lượng được tính dựa vào các dung dịch chuẩn (Bùi Trang Việt 1992).

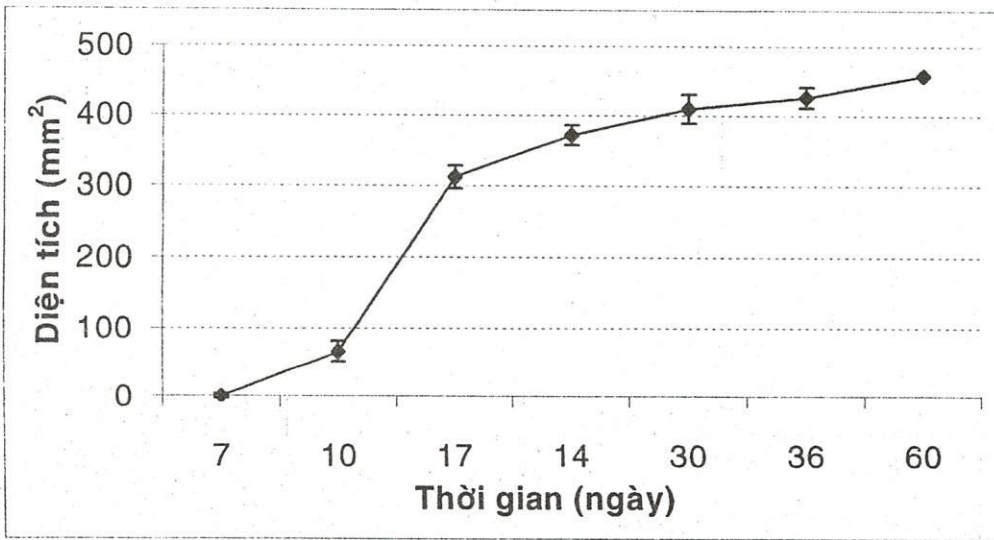
Xử lý GA₃ trên cây thuốc lá được trồng trong vườn thực nghiệm: Cây thuốc lá 45 ngày tuổi trong chậu được xử lý với GA₃ 10mg/l, bằng cách phun trực tiếp lên lá vào mỗi buổi sáng cho đến khi lá thuốc bắt đầu chín (cuống lá chuyển từ màu xanh sang màu trắng đục).

Đo hàm lượng nicotin: Sự ly trích và đo hàm lượng nicotin được thực hiện theo phương pháp của Phân viện Kinh tế – Kỹ thuật thuốc lá TP. Hồ Chí Minh. Ly trích nicotin dựa vào sự kiềm hóa mẫu và lôi kéo bằng hơi nước. Hàm lượng nicotin được tính dựa vào sự hấp thụ ở các bước sóng: 236, 259 và 280nm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Theo dõi đường cong tăng trưởng, cường độ quang hợp và hô hấp và hàm lượng nicotin của lá trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Cặp lá số 2 xuất hiện sau 7 ngày nuôi cấy được chọn làm vật liệu khảo sát. Sự tăng trưởng lá nhìn chung theo đường cong hình chữ S (hình 1). Cường độ quang hợp và hô hấp tăng cao trong giai đoạn tăng trưởng nhanh (ngày 30), sau đó giảm trong giai đoạn tăng trưởng chậm (ngày 60) (bảng 2). Cùng với sự tăng trưởng, nicotin tích tụ ngày càng nhiều ở lá, cao nhất khi lá thuốc ở trạng thái chín (ở 60 ngày sau khi xuất hiện). Sự tăng cao cường độ hô hấp và quang hợp ở ngày 30 chắc chắn có liên quan tới sự tích lũy này, vì quang hợp cung cấp nhiên liệu cho hô hấp, và chính sự hô hấp tế bào tạo nhiều ATP và các tiền chất cho sinh tổng hợp nicotin (Taiz and Zeiger 1991).



Hình 1: Đường cong tăng trưởng của lá cây thuốc lá *in vitro*.

Bảng 2: Cường độ quang hợp, hô hấp và hàm lượng nicotin của lá thuốc lá ở 17, 30 và 60 ngày tuổi.

Chỉ tiêu	17 ngày	30 ngày	60 ngày
Cường độ quang hợp ($\mu\text{O}_2/\text{cm}^2/\text{giờ}$)	12,00 ± 0,90	14,00 ± 0,70	3,00 ± 0,20
Cường độ hô hấp ($\mu\text{O}_2/\text{g}/\text{giờ}$)	43,00 ± 0,90	76,00 ± 2,00	64,00 ± 3,00
Nicotin (%)	0,62 ± 0,01	0,74 ± 0,01	1,51 ± 0,13

3.2. Ảnh hưởng của sự giảm nitrat trong môi trường trên cường độ quang hợp, hô hấp và hàm lượng các chất điều hoà tăng trưởng thực vật và nicotin của lá

Hàm lượng nicotin giảm mạnh khi môi trường giảm hàm lượng nitrat. Khi cây được nuôi cấy trên môi trường này, cường độ hô hấp tương đối cao, cường độ quang hợp thấp, và hàm lượng gibberelin khá cao (bảng 3).

Bảng 3: Cường độ quang hợp, hô hấp và hàm lượng các chất điều hoà tăng trưởng thực vật và nicotin trong lá cây thuốc lá được nuôi trên môi trường giảm nitrat.

Chỉ tiêu theo dõi		Môi trường MS	Môi trường giảm nitrat
Cường độ quang hợp ($\mu\text{O}_2/\text{cm}^2/\text{giờ}$)		47,00 ± 0,80	30,00 ± 0,10
Cường độ hô hấp ($\mu\text{O}_2/\text{g}/\text{giờ}$)		11,00 ± 0,70	17,00 ± 0,50
Hàm lượng (mg/l)	Auxin	0,13 ± 0,05	0,19 ± 0,01
	Acid abscisic	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	Cytokinin	0,36 ± 0,08	0,28 ± 0,01
	Giberelin	4,47 ± 0,30	5,13 ± 0,10
Nicotin (%)		0,69 ± 0,02	0,25 ± 0,01

3.3. Ảnh hưởng của ánh sáng trên lá tách rời

Lá được đặt trong điều kiện 12 giờ sáng/ngày có hàm lượng nicotin thấp nhất trong khi trọng lượng khô gia tăng, diện tích và trọng lượng tươi thay đổi không đáng kể (bảng 4). Có lẽ vì lá là cơ quan dự trữ nicotin, nên khi nguồn alkaloid này từ rễ bị cắt đứt trong lá tách rời, thì hàm lượng nicotin trong lá sẽ giảm trong khi lá gia tăng trọng lượng khô.

Bảng 4: Ảnh hưởng của ánh sáng trên sự tăng trưởng và hàm lượng nicotin trong lá thuốc lá

Chỉ tiêu	0 giờ sáng/ngày	6 giờ sáng/ngày	12 giờ sáng/ngày
Diện tích (mm ²)	451 ± 10	442 ± 15	436 ± 13
Trọng lượng tươi (g)	1,80 ± 0,02	1,81 ± 0,05	1,85 ± 0,02
Trọng lượng khô (g)	0,91 ± 0,01	1,02 ± 0,01	1,12 ± 0,01
Nicotin (%)	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,01

3.4. Ảnh hưởng của các chất điều hoà tăng trưởng thực vật trên lá

Lá được nuôi trên môi trường có bổ sung GA₃ 10mg/l tăng trưởng mạnh (ảnh 1), với diện tích, trọng lượng tươi và trọng lượng khô cao so với chuẩn và các xử lý với các chất điều hoà tăng trưởng thực vật khác. Cũng trên môi trường với GA₃, lá có cường độ hô hấp mạnh trong khi cường độ quang hợp yếu hơn và hàm lượng nicotin thấp. Lá khi được xử lý chất điều hoà tăng trưởng thực vật nào thì có hàm lượng chất điều hoà đó cao nhất (bảng 5).

Bảng 5: Ảnh hưởng của các chất điều hoà tăng trưởng thực vật trên sự tăng trưởng và hàm lượng nicotin của lá

Chỉ tiêu	Chuẩn	IAA (2 mg/)	BA (1mg/)	GA ₃ (10mg/)	
Diện tích (mm ²)	429 ± 13	596 ± 10	536 ± 21	1123 ± 16	
Trọng lượng tươi (g)	1,62 ± 0,06	2,16 ± 0,11	2,20 ± 0,10	4,26 ± 0,22	
Trọng lượng khô (g)	1,01 ± 0,02	1,39 ± 0,01	1,42 ± 0,01	1,42 ± 0,01	
Cường độ quang hợp (µlO ₂ /cm ² /giờ)	14,0 ± 0,30	14,00 ± 0,90	27,00 ± 0,90	10,00 ± 0,90	
Cường độ hô hấp (µlO ₂ /g/giờ)	102,0 ± 6,0	113,0 ± 2,0	62,0 ± 2,00	138,00 ± 2,0	
Hàm lượng (mg/l)	Auxin	0,26 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,31 ± 0,01
	Acid abcisic	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,01
	Cytokinin	0,42 ± 0,02	0,56 ± 0,03	1,19 ± 0,09	0,25 ± 0,05
	Giberelin	4,13 ± 0,09	4,95 ± 0,10	1,64 ± 0,08	6,37 ± 0,09
Nicotin (%)	0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	

3.5. Ảnh hưởng của chất điều hoà tăng trưởng thực vật trên rễ

Trên môi trường có bổ sung IAA 2mg/l, rễ có trọng lượng tươi và trọng lượng khô cao nhất. Sự tăng trưởng của rễ đồng thời với việc tăng hàm lượng nicotin trong rễ. GA₃ không

kích thích sự tăng trưởng rễ và cũng không làm thay đổi đáng kể hàm lượng nicotin trong rễ (bảng 6).

Bảng 6: Ảnh hưởng của các chất điều hoà tăng trưởng thực vật lên sự tăng trưởng và hàm lượng nicotin của rễ thuốc lá

Chỉ tiêu	Chuẩn	IAA (2 mg/)	BA (1mg/)	GA ₃ (10mg/)
Trọng lượng tươi (g)	0,68 ± 0,02	0,70 ± 0,02	0,56 ± 0,01	0,57 ± 0,01
Trọng lượng khô (g)	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01
Nicotin (%)	1,03 ± 0,01	1,12 ± 0,01	0,89 ± 0,01	0,99 ± 0,03

3.6. Xử lý GA₃ trên cây thuốc lá được trồng trong vườn thực nghiệm

Đối với xử lý trên cây nguyên, GA₃ 10mg/l kích thích sự kéo dài mô phân sinh lóng và kích thích sự tăng trưởng lá (ảnh 2). Điều này làm cho hàm lượng nicotin trong lá giảm, vì gibberelin ít tác động lên sự tăng trưởng rễ và do đó không qua sự tăng trưởng rễ để làm tăng sự tổng hợp nicotin. Kết quả chúng tôi đạt được như sau: hàm lượng nicotin là 1,45% với xử lý GA₃ 10mg/l, so với chuẩn là 1,87%.

4. KẾT LUẬN

- Sự chiếu sáng, sự giảm nitrat (giảm tỉ lệ NO₃⁻/NH₄⁺) trong môi trường nuôi cấy có tác dụng làm giảm nicotin trong lá.
- GA₃ có tác dụng kích thích sự tăng trưởng lá nhưng làm giảm hàm lượng nicotin của lá thuốc.
- Sự tăng trưởng của rễ đi kèm với sự gia tăng tổng hợp nicotin ở rễ.

ROLES OF SOME ENVIRONMENT FACTORS AND PLANT GROWTH REGULATORS ON THE CHANGE IN NICOTINE LEVELS IN *NICOTIANA TABACUM* L. LEAVES

Nguyễn Đình Sy, Hồ Kỳ Quang Minh, Bùi Trang Việt

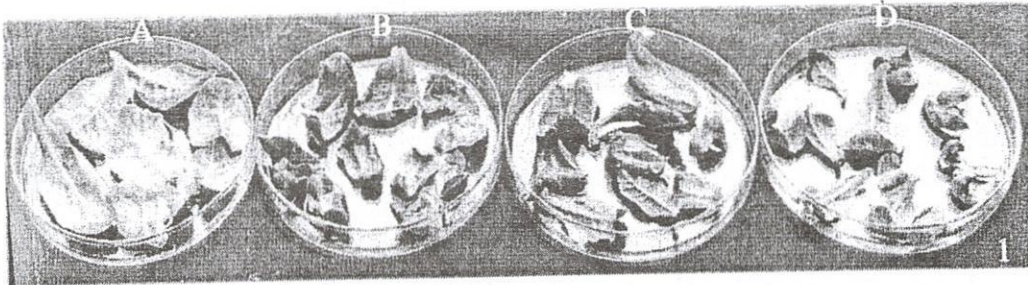
University of Natural Sciences – VietNam National University Ho Chi Minh City

ABSTRACT: *In this paper, the roles of some environment factors and plant growth regulators on the change in nicotine levels in Nicotiana tabacum L. leaves were studied. Nicotine levels increased during leaf growth. The nicotine accumulation in tobacco leaves was inhibited by 12:12 hours light:dark photoperiod and low NO₃⁻/NH₄⁺ ratio. GA₃ (10-mg/l) treatment was required for decreasing nicotine levels in leaves, but increasing plant growth. The roles of plant growth regulators: auxins, cytokinins, gibberellins and abscisic acid were discussed in relation to the root and leaf growth on leaf nicotine levels.*

Key words: *Nicotiana tabacum L., nicotine, plant growth regulators, NO₃⁻/NH₄⁺ ratio.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Benfeld P. *Biogenetic of natural compounds*. Pergamon press Ltd, 1963.
- [2]. Bùi Trang Việt. *Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng "bông" và "trái non" Tiêu (Piper nigrum L.)*. Tập san khoa học ĐHTH TP HCM, số 1, 155-165, 1992.
- [3]. Davis D. L. and Nielsen M. T., *Tobacco, production, chemistry and technology*. Cresta Blackwell science Ltd, 1990.
- [4]. Murashige T. and Skoog F. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol Plant*. 15: 473- 497, 1962.
- [5]. Taiz L. and Zeiger E. *Plant Physiology*. The Benjamin / Cummings, 1991.
- [6]. Tso T. C., *Production, Physiology, and Biochemistry of tobacco plant*. Dowden, Hitchinson and Ress, Inc. Stroudburg, PA, 1990.



Ảnh 1: Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật lên sự tăng trưởng của lá thuốc lá. A: GA 3 10mg/l, B: BA 1mg/l, C: AIA 2mg/l, D: MS 1/2



Ảnh 2: Ảnh hưởng của GA 3 lên sự tăng trưởng của cây thuốc lá trồng ở vườn thực nghiệm. A: GA 10mg/l, B: đối chứng