

Ảnh hưởng của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* đến sự phát triển và sinh tổng hợp alkaloid trong cây dứa cạn (*Catharanthus roseus*) trồng trong điều kiện khí canh

- **Bùi Xuân Lượng**
Trường Cao Đẳng Nghề Số 8, Đồng Nai
- **Trần Thị Lệ Minh**
Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 08 tháng 01 năm 2016, nhận đăng ngày 02 tháng 12 năm 2016)

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm mục đích cải tiến lượng sinh khối và gia tăng hàm lượng hợp chất thứ cấp ở cây dứa cạn (*Catharanthus roseus*) bằng cách trồng cây trên hệ thống khí canh có bổ sung vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. Kết quả nghiên cứu đã xác định được cây dứa cạn trồng trên hệ thống khí canh bổ sung vi khuẩn nồng độ 10^9 CFU/mL có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt hơn so với cây

trồng không bổ sung vi khuẩn *A. rhizogenes*. Mẫu lá khi cây ra nụ và cây có quả được chiết suất và phân tích hàm lượng vincristine và vinblastine bằng hệ thống HPLC. Hàm lượng vincristine và vinblastine ở lá của cây trồng trong hệ thống khí canh bổ sung vi khuẩn *A. rhizogenes* với nồng độ 10^9 CFU/mL cao hơn so với cây trồng trên hệ thống khí canh không bổ sung vi khuẩn.

Từ khóa: Dứa cạn, khí canh, *Agrobacterium rhizogenes*

MỞ ĐẦU

Hiện nay, trên toàn cầu có khoảng 25 triệu người đang phải sống chung với căn bệnh ung thư và mỗi năm có thêm khoảng 11 triệu trường hợp mắc bệnh mới. Việc tìm ra các hợp chất có khả năng ức chế ung thư đã được các nhà khoa học tập trung nghiên cứu và tổng hợp bằng nhiều con đường khác nhau. Nhiều loại thuốc tổng hợp đã được sử dụng nhưng vẫn không thay thế được các loại thuốc có nguồn gốc từ các loại thảo dược. Qua nghiên cứu, các nhà khoa học nhận thấy một số chất được thực vật sản sinh ra, còn được gọi là hợp chất thứ cấp, có thể làm chất nhuộm, các chất tạo mùi thực phẩm và dược phẩm. Vincristine và vinblastine là hai alkaloid được chiết xuất từ cây dứa cạn có tác dụng điều trị ung thư thông qua ức chế sự phân chia tế bào

[1]. Tuy nhiên các hợp chất này lại có hàm lượng rất nhỏ trong tế bào thực vật và việc tổng hợp các hợp chất này bằng con đường hóa học không khả thi về kinh tế do cấu trúc phức tạp và trọng lượng phân tử lớn. Mặt khác nhiều thuốc tổng hợp hóa học toàn phần có cấu trúc hóa học khác với cấu trúc hóa học của các hợp chất thiên nhiên nên đã sinh ra nhiều tác dụng phụ độc hại cho cơ thể con người như gây quái thai, ung thư, và các tai biến nguy hiểm khác như dị ứng, điếc, rụng tóc...[2].

Vì vậy, nhiều chiến lược nhằm gia tăng tổng hợp alkaloid trong tế bào đã, đang được nghiên cứu và thực hiện như bổ sung tiền chất, cơ chất hay nhân tố cảm ứng. Phương pháp sử dụng vi khuẩn *A. rhizogenes* lây nhiễm vào thực vật cũng giúp gia tăng hợp chất thứ cấp trong cây [3].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thí nghiệm được tiến hành trên cây dứa cạn (*Catharanthus roseus*). Sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* chủng ATTC 11325. Pha loãng vi khuẩn trong môi trường YMB ở nồng độ 10^9 CFU/ mL. Phun trực tiếp dung dịch vi khuẩn 10^9 CFU/ mL và dung dịch đối chứng (môi trường YMB) vào rễ cây trồng trên hệ thống khí canh. Khảo sát sinh trưởng của cây (số lá, chiều cao thân, chiều dài rễ và trọng lượng tươi). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại.

Hệ thống khí canh được thiết kế theo mô hình của Roberto năm 2003 [4]. Hệ thống gồm 3 thùng nhựa chứa cây cao 70 cm, đường kính đáy 40 cm, đường kính nắp 60 cm. Giá đỡ để trồng cây bằng xốp. Bên trong mỗi thùng được thiết kế 4 béc phun sương (loại béc số 3), các béc phun sương được nối vào máy phun sương và 1 bình chứa dung dịch. Dung dịch sau khi phun được thu về bình chứa nhờ hệ thống ống dẫn. Máy phun sương được nối với bộ điều khiển thời gian phun và ngừng phun.

Chu kỳ phun dung dịch dinh dưỡng trong hệ thống khí canh là 15 giây phun và 30 phút ngừng phun.

Chỉ tiêu theo dõi: Sinh trưởng và phát triển của cây dứa cạn. Sinh tổng hợp alkaloid trong cây dứa cạn.

Các kết quả được phân tích dựa vào bảng ANOVA, bảng trắc nghiệm phân hạng so sánh sự khác biệt các giá trị trung bình giữa các nghiệm thức bằng phương pháp LSD.

Phương pháp ly trích alkaloid: lá cây dứa cạn thu ở giai đoạn sau 42 và 56 ngày trồng được sấy ở nhiệt độ ở 40°C ; sau đó mẫu lá khô được xay nhuyễn và thu dịch chiết theo quy trình ly trích alkaloid từ nguyên liệu khô. Sau đó xác định hàm lượng vincristine và vinblastine bằng kỹ thuật HPLC [5].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

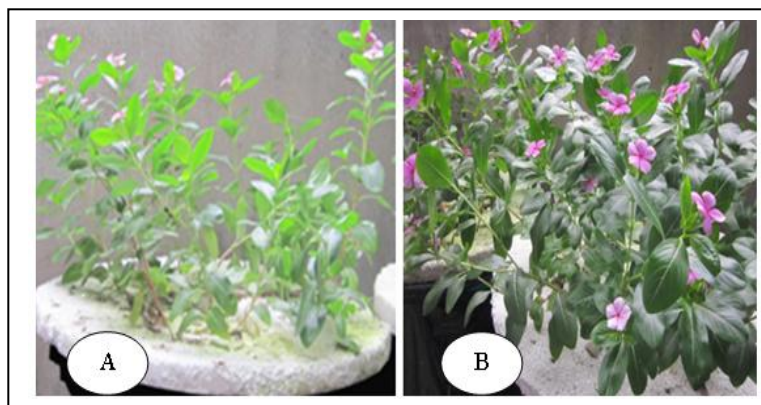
Vi khuẩn *A. rhizogenes* được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu sản xuất hợp chất thứ cấp cung cấp cho ngành dược. Tiến hành bổ sung vi khuẩn với 10^9 CFU/mL và đối chứng (không bổ sung vi khuẩn). Mặc dù không sử dụng cefotaxime để loại bỏ vi khuẩn *A. rhizogenes*, sau 56 ngày trồng, cây dứa cạn ở các nghiệm thức vẫn phát triển tốt và được đánh giá ảnh hưởng của vi khuẩn *A. rhizogenes* đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp alkaloid của cây.

Ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *A. rhizogenes* nồng độ 10^9 CFU/ mL cây có khả năng sinh trưởng cao. Từ kết quả Bảng 1 cho thấy chiều dài rễ ở giai đoạn cây trồng sau 56 ngày giữa 2 nghiệm thức không có sự khác biệt, tuy nhiên trọng lượng cây, chiều cao thân, số lá và số nhánh có sự khác biệt ở mức rất ý nghĩa (Bảng 1, Hình 1).

Bảng 1. Kết quả trắc nghiệm thống kê so sánh về số lá, chiều cao thân, chiều dài rễ và trọng lượng tươi của cây dứa cạn trồng trong hệ thống khí canh có bổ sung vi khuẩn và đối chứng sau 56 ngày trồng

Nghiệm thức	Trọng lượng tươi (g)	Số lá (lá)	Chiều cao thân (cm)	Chiều dài rễ (cm)
NTA	45,5	33,56	29,2	53,7
NTB	70,91	40,67	35,5	55,89
T _{tính}	26,91**	6,03**	4,30**	1,56 ^{ns}

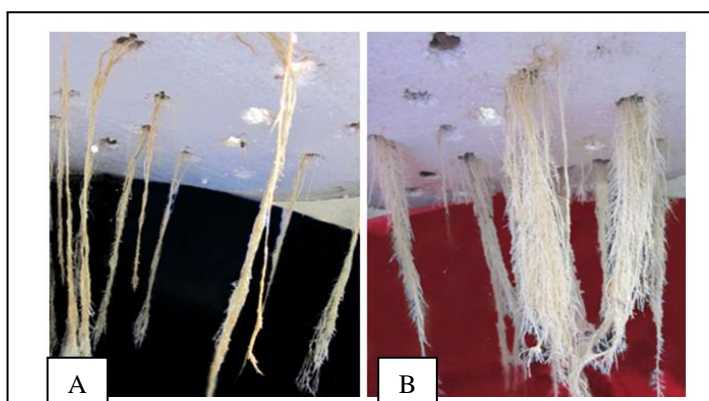
(**): Khác biệt rất có ý nghĩa ($P < 0,01$); NTA: Không bổ sung vi khuẩn; NTB: Bổ sung vi khuẩn.)



Hình 1. Thân và lá cây dừa cạn sau 56 ngày
A. Nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn; B. Nghiệm thức bổ sung vi khuẩn

Mặc dù chiều dài rễ ở 2 nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa về thống kê tuy nhiên ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn, bộ rễ phát triển

mạnh hơn, nên lượng sinh khối bộ rễ của cây ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn lớn hơn (Hình 2).



Hình 2. Rễ cây dừa cạn sau 56 ngày trồng
A. Nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn; B. Nghiệm thức bổ sung vi khuẩn

Trọng lượng tươi của cây ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn và nghiệm thức đối chứng có sự khác biệt ở mức rất có ý nghĩa. Ở giai đoạn cây dừa cạn sau khi trồng 56 ngày, trọng lượng tươi của cây ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn cao gấp 1,5 lần so với cây ở nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn.

Về chiều cao thân, cây dừa cạn ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn cao gấp 1,2 lần so với cây ở nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Tran, 2005 [3] ở cây cà độc dược trồng trên hệ thống thủy

canh. Bổ sung vi khuẩn *A. rhizogenes* chiều cao cây tăng gấp 1,5 lần, trọng lượng tươi của cây cao hơn 1,8 lần so với đối chứng.

Như vậy, nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *A. rhizogenes* nồng độ 10^9 CFU/ mL giúp cây sinh trưởng và phát triển tốt, cho lượng sinh khối lớn hơn so với đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Lượng sinh khối lớn có ý nghĩa quan trọng vì các bộ phận rễ, thân lá cây dừa cạn đều có chứa các loại alkaloid quan trọng trong y học.

Trong lá dừa cạn có 2 loại alkaloid quý như vincristine và vinblastine. Giai đoạn 42 và 56

ngày sau khi trồng trên hệ thống khí canh, cây bắt đầu ra nụ và có quả. Hai giai đoạn này cây tập trung sinh tổng hợp alkaloid nhằm bảo vệ hoa và

quả. Mẫu lá dứa cạn của cây ra nụ và cây có quả được chiết suất và phân tích bằng hệ thống HPLC.

Bảng 2. Hàm lượng vincristine và vinblastine

Giai đoạn/ Nghiệm thức	Vincristine (mg/kg lá khô)	Vinblastine (mg/kg lá khô)
Mẫu lá khi cây ra nụ / NTA	0,305	0,024
Mẫu lá khi cây ra nụ/ NTB	0,312	0,016
Mẫu lá khi cây có quả/NTA	0	0
Mẫu lá khi cây có quả/ NTB	0,466	0,033

(NTA: Không bổ sung vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*; NTB: Bổ sung vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*).

Mẫu lá giai đoạn cây ra nụ có hàm lượng vincristine và vinblastine ở 2 nghiệm thức không có sự khác biệt lớn (Bảng 2).

Ở mẫu lá giai đoạn cây có quả, nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn không phát hiện thấy vincristine và vinblastine, ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn hàm lượng vincristine và vinblastine rất cao, lần lượt là 0,466 mg/kg và 0,033 mg/kg.

Trong các giai đoạn sinh trưởng của cây, các hợp chất thứ cấp luôn được tạo ra để bảo vệ cho cây. Đến giai đoạn cây có quả, các hợp chất thứ cấp tập trung về quả để bảo vệ hạt vì vậy mẫu lá cây ở nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn không phát hiện thấy vincristine và vinblastine. Tuy nhiên mẫu lá cây ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn, hàm lượng vincristine và vinblastine rất cao, điều này có thể do 2 nguyên nhân sau:

Do vi khuẩn *A. rhizogenes* lây nhiễm vào thực vật, thực vật sẽ có những phản ứng bảo vệ liên quan đến stress nên các hợp chất thứ cấp được tích lũy nhiều hơn và các hợp chất thứ cấp này luôn có trong các bộ phận của cây để bảo vệ cây. Mặt khác, khi lây nhiễm vào thực vật vi khuẩn *A. rhizogenes* đã chuyển đoạn Ri – plasmid có các gen (*aux1*, *aux2*, *rol B*, *TR*, *mass1*, *mass2* và *ags*) điều khiển quá trình tổng hợp auxin [6]. Auxin tham gia vào con đường tổng hợp alkaloid trong cây dứa cạn [7]. Vì vậy

cây dứa cạn nhiễm vi khuẩn *A. rhizogenes* luôn có chứa alkaloid.

Hàm lượng vincristine rất cao trong mẫu lá của cây dứa cạn khi cây có quả có ý nghĩa lớn, vì vincristine có vai trò quan trọng trong y học và giá thành của vincristine rất cao.

Như vậy, hàm lượng vincristine và vinblastine trong mẫu lá của cây dứa cạn trồng trên hệ thống khí canh bổ sung vi khuẩn cao hơn so với mẫu lá của cây trồng trong điều kiện không bổ sung vi khuẩn, nhất là trong giai đoạn cây cho quả. Do đó muốn thu được hàm lượng vincristine và vinblastine cao nhất nên sử dụng hệ thống khí canh bổ sung vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* mật độ 10^9 CFU/mL và thu hoạch ở giai đoạn cây cho quả.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu lây nhiễm vi khuẩn *A. rhizogenes* đối với cây dứa cạn trồng trong hệ thống khí canh đã thành công. Đánh giá được sinh trưởng và sinh tổng hợp alkaloid trong cây dứa cạn trồng trong hệ thống khí canh. Nghiên cứu mở ra hướng mới trong ứng dụng vi khuẩn *A. rhizogenes* đối với cây dược liệu.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ môn Công nghệ sinh học Trường Đại học Nông Lâm, Trường Cao đẳng Nghề số 8 đã tạo điều kiện thuận lợi để nhóm thực hiện nghiên cứu này.

Effect of *Agrobacterium rhizogenes* on the development and alkaloid biosynthesis of *Catharanthus roseus* growing in an aeroponic system

- **Bui Xuan Luong**
Vocational College Number 8, Dong Nai province
- **Tran Thi Le Minh**
Nong Lam University, Ho Chi Minh City

ABSTRACT

The aim of this study is to improve the biomass and the content of secondary metabolites of the Catharanthus roseus using an aeroponic system with the addition of Agrobacterium rhizogenes. The results showed that the growth of Catharanthus roseus on the aeroponic system with the addition of A. rhizogenes into the nutrition medium at the concentration of 10⁹

CFU/mL was better than the treatments without addition of A. rhizogenes. The leaf samples of plants having bud and fruits were extracted and analysed the content of vincristine and vinblastine by HPLC system. Higher content of vincristine and vinblastine was obtained from the treatment with addition of A. rhizogenes.

Keywords: *Catharanthus roseus, aeroponic system, Agrobacterium rhizogenes*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. N.V. Đản, N.V. Tựu, Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc, Nhà xuất bản Y học (1985).
- [2]. P.Q. Kinh, Giáo trình các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, 5–40 (2011).
- [3]. T.L.M. Tran, Synthèse et accumulation d'alcaloïdes chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en hydroponie: analyse des effets de l'environnement biotique et abiotique; essais de mise en place d'une nouvelle technologie de production, *Institut National Polytechnique de Lorraine*, Thèse, 140 (2005).
- [4]. K. Roberto, How to the hydroponics, 4th Edition, The Futuregarden Press, New York, U.S.A, 102 (2003)
- [5]. T.L.M. Tran, Étude de la croissance et la mise en place de la méthode de dosage des alcaloïdes indolique chez le *Catharanthus roseus* .L.G. Don, *Laboratoire d'Agronomie et Environnement.*, Thèse, 20 (2006).
- [6]. V.V. Taylor, G. Christopher, *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications, *In vitro cell. Dev. Biol. Plant*, 43, 383–403 (2007).
- [7]. A.C. Geoffrey, The alkaloid chemistry and pharmacology, *Academic Press*, 49, 221–299 (1997).