

KHẢO SÁT SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA HUYỀN PHÙ TẾ BÀO DÂU TÂY (*FRAGARIA ANANASSA* L.) CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ANTHOCYANIN

Phạm Thị Mỹ Trâm⁽¹⁾, Lê Thị Thuý Tiên⁽²⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một, Bình Dương

(2) Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG - HCM

(Bài nhận ngày 06 tháng 02 năm 2012, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 27 tháng 03 năm 2012)

TÓM TẮT: Huyền phù tế bào hình thành từ mô sẹo có nguồn gốc từ lá dâu tây (*Fragaria ananassa* L.) *in vitro*, trên môi trường MS bổ sung đường 30 g/l, 2,4-D 1,0 mg/l và kinetin 0,3 mg/l. Qua nhiều thí nghiệm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của huyền phù tế bào, chúng tôi ghi nhận được các yếu tố thích hợp cho sự tăng trưởng của huyền phù tế bào như mật độ tế bào khởi đầu là 1 g tế bào trong 20 ml môi trường lỏng, đường 30 g/l ở tốc độ lắc 100 vòng/phút. Sự hiện diện của anthocyanin trong tế bào huyền phù được xác định bằng phương pháp pH vi sai.

Từ khoá: anthocyanin, dâu tây, *Fragaria ananassa* L., huyền phù tế bào, mô sẹo

MỞ ĐẦU

Dâu tây (*Fragaria ananassa*) được gọi là cây thuốc từ thế kỷ 13. Nó được sử dụng rộng rãi bởi các quốc gia khác nhau trên thế giới. Theo dân gian Mỹ, thuốc dâu tây được sử dụng để tạo sự thèm ăn và ổn định tiêu hóa. Ở Đức, lá được sử dụng để chống sỏi mật, chữa bệnh về thần kinh, hen phế quản, mất ngủ...

Quả dâu tây giàu các hợp chất chống oxy hoá quan trọng và cũng là nguồn cung cấp chính của acid ellagic và các flavonoid mà đặc biệt là hai anthocyanin, peonidin – 3 – glucoside và cyanidin – 3 – glucoside có tác dụng giảm nguy cơ ung thư và tim mạch [7].

Theo nghiên cứu của Kandil và đồng tác giả (2000), hàm lượng của flavonoid của một trái cây có thể chỉ chiếm khoảng 1% tổng hàm lượng các chất có trong quả đó, trong khi việc nuôi cấy tế bào có thể gia tăng hàm lượng các

chất flavonoid tới 20 – 30% tổng thể tích. Vì vậy, việc nghiên cứu và tìm ra phương pháp thích hợp để gia tăng hợp chất thứ cấp luôn được các nhà khoa học quan tâm [8].

Phương pháp nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật là một trong những phương pháp hiệu quả để tăng khả năng thu nhận các hợp chất thứ cấp với sản lượng cao mà không thể được sản xuất bởi vi khuẩn hoặc tổng hợp bằng con đường hóa học [9]. Nhiều nghiên cứu đã thực hiện nhằm thu nhận anthocyanin từ huyền phù tế bào của nhiều loài thực vật như *Catharanthus roseus* [2], *Vitis* sp [3], *Fragaria* [5] ...

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây Đà Lạt *Fragaria ananassa* L. như mật độ tế bào, nồng độ đường, chất điều hoà sinh trưởng thực vật, tốc độ lắc và sự sinh tổng hợp anthocyanin

nhằm thu được lượng lớn sinh khối tế bào có khả năng sinh tổng hợp anthocyanin.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây dâu tây *Fragaria ananassa* L. *in vitro* (cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu Rau, Hoa và Khoai tây Đà Lạt) được vi nhân giống trên môi trường MS bổ sung BA 0,7 mg/l.

Phương pháp

Sự tạo sẹo dâu tây

Vật liệu dùng để tạo mô sẹo là các mảnh lá non (5 x 5 mm) của cây dâu tây *Fragaria ananassa* L. *in vitro* 6 tuần tuổi. Môi trường tạo sẹo là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) [10] bổ sung inositol 100 mg/l, đường (saccharose) 30 g/l, agar 7,5 g/l, 2,4-D 1,0 mg/l và kinetin (KIN) 0,3 mg/l. Quá trình tạo sẹo được tiến hành trong tối ở nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $70 \pm 2\%$. Sau 4 tuần nuôi cấy, mô sẹo sẽ được cấy chuyển sang môi trường mới. Sau đó, mô sẹo được cấy chuyển sau mỗi 2 tuần.

Sự tạo huyền phù tế bào dâu tây

2 g mô sẹo dâu tây qua 2 lần cấy chuyển (8 tuần tuổi) được cấy vào 20 ml môi trường MS lỏng có thành phần tương tự như thành phần trong môi trường tạo sẹo. Hệ thống tế bào được nuôi trên máy lắc vòng với tốc độ 100 vòng/phút trong điều kiện tối với nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $70 \pm 2\%$. Huyền phù tế bào được nuôi trong 4 tuần sau đó sẽ chuyển sang môi trường mới. Huyền phù tế bào được cấy chuyển sau mỗi 2 tuần. Hình thái tế bào dâu tây được quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Khảo sát ảnh hưởng của mật độ tế bào lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

1 g tế bào huyền phù dâu tây được cấy chuyển vào môi trường MS lỏng với thể tích lần lượt là 10, 20, 30, 40 và 50 ml. Sự tăng trưởng của huyền phù tế bào được đánh giá qua sự thay đổi thể tích tế bào lắng (SCV) của huyền phù tế bào sau mỗi 7 ngày.

Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

Huyền phù tế bào dâu tây cấy chuyển vào môi trường MS lỏng với mật độ tế bào 1 : 20 (g/ml môi trường lỏng) được đặt ở ngoài sáng với cường độ chiếu sáng 2800 ± 200 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày và ở trong tối. Sự thay đổi SCV của huyền phù tế bào được xác định sau 3 tuần nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

Huyền phù tế bào với mật độ tế bào 1 : 20 (g/ml môi trường lỏng) được nuôi trong môi trường MS lỏng bổ sung đường có nồng độ lần lượt là 20, 30, 40 và 50 g/l. Sự thay đổi SCV của huyền phù tế bào được xác định sau 3 tuần.

Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

Huyền phù tế bào với mật độ 1 : 20 (g/ml môi trường lỏng) được nuôi trong môi trường MS lỏng bổ sung đường 30 g/l với 3 chế độ lắc 100, 120 và 150 vòng/phút. Sự thay đổi SCV của huyền phù tế bào được xác định sau 3 tuần.

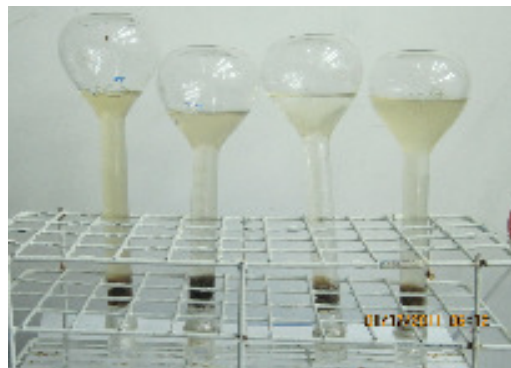
Khảo sát sự sinh tổng hợp anthocyanin của huyền phù tế bào dâu tây

Huyền phù tế bào có mật độ 1 : 20 (g/ml) trong môi trường MS lỏng bổ sung đường 30 g/l với tốc độ lắc 100 vòng/phút và đặt ở điều kiện sáng với cường độ ánh sáng 2800 lux. Sau mỗi tuần, tế bào huyền phù được đem trích ly để xác định hàm lượng anthocyanin thô bằng phương pháp pH vi sai [13].

Phương pháp xác định thể tích tế bào lắng (SCV) của huyền phù tế bào



Huyền phù tế bào trong các bình tam giác của các nghiệm thức được chuyển vào bình cầu có chia vạch. Sau đó, bình cầu được đậy nắp kín, đặt ngược lên giá đỡ, để lắng trong khoảng thời gian cố định (20 phút) và ghi nhận thể tích của tế bào lắng (Hình 1). Qua các tuần đo, chúng tôi sẽ ghi nhận được sự thay đổi thể tích tế bào lắng trong dịch huyền phù.



Hình 1. Bình cầu đo thể tích tế bào lắng

Phương pháp xử lý số liệu

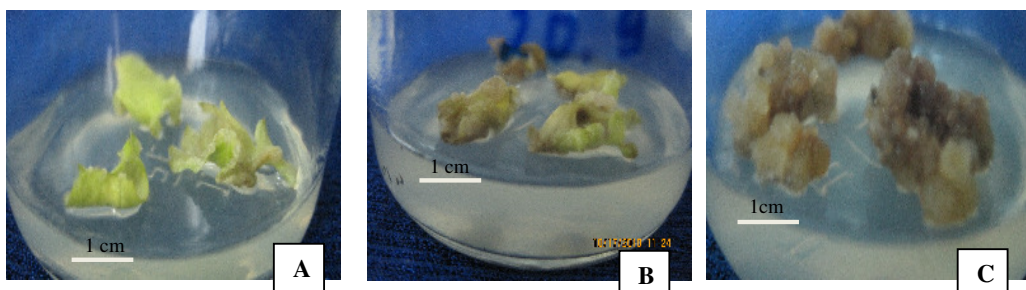
Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự tạo sẹo dâu tây

Mô sẹo bắt đầu hình thành ở các vị trí vết thương của mẫu lá sau ngày thứ 10 nuôi cấy

trong điều kiện tối (Hình 2A). Sau 4 tuần, mô sẹo phát triển hầu hết bề mặt mẫu lá và có dạng bờ (Hình 2B). Sau 2 lần cấy chuyển, mô sẹo có màu vàng cánh gián, tách rời nhau, xốp và rất thích hợp cho việc tạo huyền phù tế bào (Hình 2C).

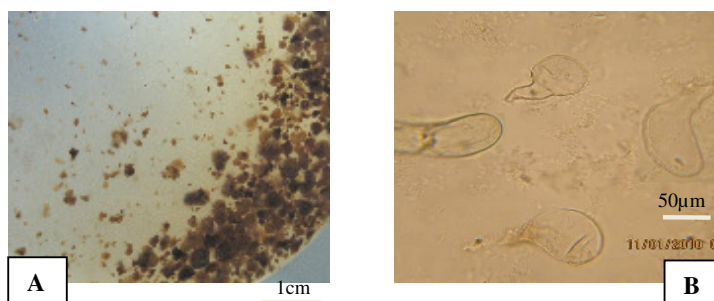


Hình 2. Mô sẹo từ lá dâu tây đặt trong điều kiện tối; A. Mô sẹo 2 tuần tuổi; B. Mô sẹo 4 tuần tuổi; C. Mô sẹo 8 tuần tuổi

Sự tạo huyền phù tế bào dâu tây

Mô sẹo được đặt vào môi trường lỏng trên máy lắc vòng. Sau 14 ngày nuôi cấy, huyền

phù tế bào hình thành bao gồm các tế bào đơn, cụm tế bào nhỏ, màu vàng đậm đến nâu nhạt (Hình 3).



Hình 3. Tế bào huyền phù dâu tây *Fragaria ananassa* L. sau 14 ngày

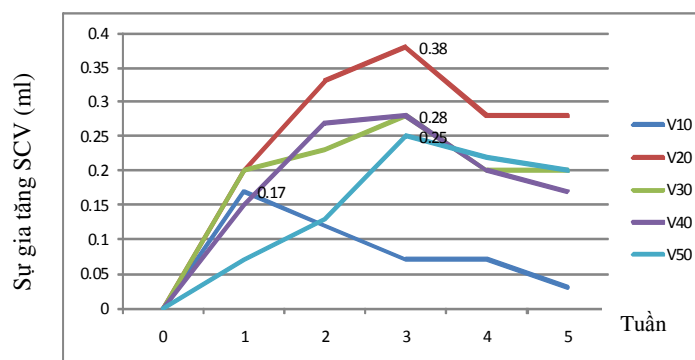
A. Huyền phù tế bào (quan sát bằng mắt thường)

B. Huyền phù tế bào dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 40

Ảnh hưởng của mật độ tế bào lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

Với những kết quả được trình bày trong hình 4, thử nghiệm thức có mật độ tế bào 1 : 10 (g/ml môi trường lỏng), các nghiệm thức khác đều có sự gia tăng sinh khối tối đa ở tuần thứ 3.

Trong đó, sự tăng trưởng của huyền phù tế bào có mật độ 1 : 20 (g/ml môi trường lỏng) tốt nhất với sự gia tăng SCV là 0,38 ml.



Hình 4. Ảnh hưởng của mật độ tế bào lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây. V10, V20, V30, V40, V50 là sự gia tăng SCV của huyền phù tế bào có mật độ 1 : 10; 1 : 20; 1 : 30; 1 : 40; 1 : 50 (g/ml môi trường lỏng).

Mật độ tế bào ban đầu thích hợp có vai trò như một “lớp nuôi” kích thích sự tăng trưởng của huyền phù [9]. Các nghiệm thức có mật độ tế bào 1 : 30, 1 : 40 và 1 : 50 (g/ml môi trường lỏng) có sự gia tăng SCV không cao, có lẽ do mật độ tế bào thấp, thiếu sự tác động tương hỗ giữa các tế bào làm hạn chế sự phân chia tế bào. Tuy nhiên, mật độ khởi đầu cao (1 : 10) lại làm giảm mức độ sinh trưởng của huyền phù do sự cạnh tranh về chất dinh dưỡng cũng như hàm lượng oxy trong môi trường. Ở mật độ tế bào 1 : 20 (g/ml môi trường lỏng), huyền phù tế bào tăng sinh tốt nhất.

Kết quả của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Aly và cộng sự (2010) khi khảo sát mật độ tế bào của huyền phù tế bào *Hyoscyamus muticus*. Các tác giả cho rằng với mật độ 50 g mô sẹo trong 1 lít môi trường (trùng ứng mật độ 1 : 20) giúp huyền phù tế bào tăng sinh tốt nhất. Khi được duy trì ở mật độ tế bào cao, huyền phù tế bào sẽ sớm chuyển sang pha ổn định và giảm sinh khối, có lẽ do sự cạn kiệt nguồn dinh dưỡng và oxy [1].

Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

Kết quả khảo sát sự tăng trưởng của huyền phù tế bào trong hai điều kiện sáng và tối được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Sự gia tăng SCV của huyền phù tế bào ở ngoài sáng và trong tối

Điều kiện chiếu sáng	Sự gia tăng SCV (ml)
Ngoài sáng	0,18 ± 0,03
Trong tối	0,33 ± 0,03

Huyền phù tế bào tăng sinh ở trong tối mạnh hơn ngoài sáng. Huyền phù tế bào trong điều kiện tối phóng thích nhiều tế bào nhỏ, môi trường nuôi cấy có màu vàng. Trong khi đó, huyền phù tế bào ở điều kiện chiếu sáng ít có sự phóng thích tế bào. Sự gia tăng SCV của huyền phù trong tối ở tuần thứ 3 đạt 0,33 ml trong khi ở ngoài sáng chỉ đạt 0,18 ml (Bảng 1).

Đối với nhiều loài thực vật, ngoài tác động lên sự hình thành và tăng sinh của mô sẹo trong quá trình nuôi cấy, ánh sáng còn ảnh hưởng

đến sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp trong tế bào do liên quan đến sự hoạt động của một số enzyme nội bào [6]. Theo nghiên cứu của Lê Thị Thủy Tiên và cộng sự (2010), sự tăng trưởng của mô sẹo và huyền phù tế bào từ thân non cây thông đỏ Lâm Đồng bị cản mạnh khi đặt ở ngoài sáng nhưng hoạt tính của taxol lại cao hơn so với trong tối [11].

Ảnh hưởng của nồng độ đường lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

Huyền phù tế bào được nuôi trong môi trường MS lỏng bổ sung đường ở các nồng độ khác nhau, đặt trong điều kiện tối hoàn toàn để khảo sát sự tăng trưởng. Sự gia tăng SCV của huyền phù tế bào ở các nghiệm thức khảo sát được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Sự gia tăng SCV của huyền phù tế bào ở các nồng độ đường khác nhau

Mật độ tế bào (g/ml)	Nồng độ đường (g/l)	Sự gia tăng SCV (ml)
1 : 20	20	0,18 ± 0,08
	30	0,38 ± 0,03
	40	0,22 ± 0,08
	50	0,2 ± 0,05

Theo các số liệu từ Bảng 2, thể tích tế bào lắng của huyền phù tế bào tăng khi hàm lượng đường tăng từ 20 g/l lên 30 g/l và giảm xuống khi tiếp tục tăng hàm lượng đường lên 40 và 50 g/l. Ở môi trường có nồng độ đường 30 g/l, huyền phù tế bào tăng trưởng mạnh nhất với sự gia tăng SCV là 0,38 ml và tăng ít nhất khi môi trường có bổ sung đường ở nồng độ 20 g/l với sự gia tăng SCV là 0,18 ml.

Đường cung cấp nguồn carbon cần thiết cho các hoạt động trao đổi chất của tế bào, tạo nguyên liệu cho quá trình phân chia tế bào giúp huyền phù tế bào tăng trưởng. Nồng độ đường 30 g/l có lẽ là nồng độ thích hợp nhất cho sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây. Ở nồng độ đường thấp hơn (20 g/l), huyền phù tế bào phát triển chậm, có thể do sự thiếu hụt nguồn năng lượng và sườn carbon cần thiết cho các hoạt động biến dưỡng trong tế bào. Ở các nồng độ đường cao hơn (40 và 50 g/l), sinh khối huyền phù tăng chậm. Nguyên nhân có thể do nồng độ đường cao làm gia tăng áp suất thẩm thấu ảnh hưởng đến hoạt động trao đổi chất của tế bào [4]. Vì vậy, chúng tôi chọn đường có nồng độ 30 g/l để bổ sung vào môi trường tăng sinh huyền phù tế bào dâu tây.

Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sự tăng trưởng của huyền phù tế bào dâu tây

Qua quá trình theo dõi, chúng tôi nhận thấy với các tốc độ lắc khác nhau, sự tăng trưởng của huyền phù tế bào cũng khác nhau.

Bảng 3. Sự gia tăng SCV của huyền phù tế bào ở các tốc độ lắc khác nhau

Tốc độ lắc (vòng/phút)	Sự gia tăng SCV (ml)
100	0,35 ± 0,10
120	0,2 ± 0,09
150	0,18 ± 0,03

Trong đó, huyền phù tế bào ở chế độ lắc 100 vòng/phút tăng trưởng tốt nhất với sự gia tăng SCV là 0,35 ml. Tế bào và các cụm tế bào có màu vàng, kích thước tương đối đều nhau. Khi tăng tốc độ lắc lên 120, 150 vòng/phút thì sự

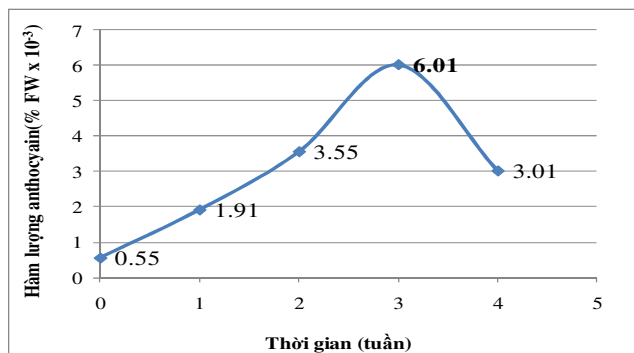
gia tăng SCV của huyền phù tế bào thấp, tương ứng là 0,2 và 0,18 ml). Tế bào huyền phù ở các chế độ lắc 120 và 150 vòng/phút bám dính nhiều trên thành bình, do đó khả năng tiếp xúc của chúng với môi trường dinh dưỡng bị hạn chế, dẫn đến sự tăng trưởng của huyền phù tế bào chậm (Bảng 3).

Khi được nuôi cấy trong môi trường lỏng, các tế bào luôn được tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng. Quá trình thông khí và ngăn cản sự kết dính của các tế bào lại với nhau được thực hiện nhờ một máy lắc vòng. Vì vậy tốc độ lắc phù hợp cũng là một yếu tố rất quan trọng trong nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật [12].

Từ kết quả thực nghiệm, chúng tôi chọn tốc độ lắc 100 vòng/phút để tăng sinh huyền phù tế bào.

Sự sinh tổng hợp anthocyanin của huyền phù tế bào dâu tây

Hàm lượng anthocyanin trong tế bào huyền phù tăng từ tuần 1 đến tuần 3 và đạt giá trị cao nhất ở tuần thứ 3 ($6,01 \cdot 10^{-3}\%$ FW) và giảm ở tuần thứ 4 (Hình 5). Như vậy, sự sinh tổng hợp anthocyanin của tế bào dâu tây diễn ra đồng thời với sự tăng trưởng của huyền phù tế bào. Hàm lượng anthocyanin thu được cao nhất khi sự tăng trưởng của huyền phù tế bào đạt mức cao nhất ở tuần thứ 3 của quá trình nuôi cấy.



Hình 5. Sự biến thiên hàm lượng anthocyanin theo thời gian

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được một số yếu tố thích hợp cho sự tăng sinh huyền phù tế bào dâu tây Đà Lạt (*Fragaria ananassa* L.). Điều kiện thích hợp nhất cho sự tăng trưởng của huyền phù tế bào là môi trường MS lỏng có bổ sung đường 30 g/l ở mật độ tế

bào 1 g tế bào tươi trong 20 ml môi trường lỏng với tốc độ lắc 100 vòng/phút. Điều kiện tối thích hợp cho sự tăng sinh của huyền phù tế bào. Hàm lượng anthocyanin đạt giá trị tối đa ($6,01 \cdot 10^{-3}\%$ FW) là sau 3 tuần nuôi cấy huyền phù tế bào.

STUDYING ON GROWTH OF STRAWBERRY (*FRAGARIA ANANASSA L.*) CELL
SUSPENSION CULTURES FOR ANTHOCYANIN PRODUCTION

Pham Thi My Tram ⁽¹⁾, Le Thi Thuy Tien ⁽²⁾

(1)University of Thu Dau Mot, Binh Duong

(2) University of Technology, VNU-HCM

ABSTRACT: Cell suspension cultures were initiated from calli derived from in vitro strawberry leaves on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 30 g/l sucrose, 1.0 mg/l 2,4-D and 0.3 mg/l kinetin. There were many factors affected on cell suspension cultures growth (it was found that ...). Cell suspension cultures grew better on MS medium with 30 g/l sucrose. 1 g (fresh weight) of cells in 20 ml of medium was the best initial inoculum cell density for cell suspension cultures to grow. A shaking speed of 100 rpm on rotary shaker was suitable for the cells. The growth of cell suspension in dark was better than that under light condition. Anthocyanin in the cells was determined by pH differential method.

Key words: anthocyanin, callus, cell suspension, *Fragaria ananassa L.*, strawberry.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. U. I. Aly, H. M. E. Shabrawi, M. Hanafy, Impact of culture conditions on alkaloid production from undifferentiated cell suspension cultures of Egyptian Henbane, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, 4717-4725 (2010).
- [2]. D. P. Carew, R. J. Krueger, Anthocyanidins of *Catharanthus roseus* callus cultures, *Phytochemistry*, 15, 442 (1976).
- [3]. C. B. Do, F. Cormier, Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera L.*) cell suspensions, *Plant Cell Rep*, 9, 143-146 (1990).
- [4]. T. T. M. Dung, T. T. T. Trà và L. T. T. Tiên, Khảo sát khả năng thu nhận anthocyanin bằng phương pháp nuôi cấy tế bào bắp cải tím *Brassica oleracea L.* Hội nghị Khoa học và Công nghệ lần thứ 10, phân ban Công nghệ Thực phẩm – Sinh học, Đại học Bách Khoa ĐHQG-HCM (2009).
- [5]. . Ei-Sawyand, H. S. Taha, Stimulation of anthocyanin production in strawberry callus cultures, *J. Agric. Sci. Mansoura Uni* 25, 2247-2256(2000).
- [6]. A. G. Fett-Neto, J. J. Pennington, F. DiCosmo, Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata* Sieb and

- Zucc, *J. Plant Physiol* 146, 584-590 (1995).
- [7]. S. M. Hannum, Potential impact of strawberries on human health: a review of the science, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44, 1-17 (2004).
- [8]. F. Kandil, L. Song, J. Pezzuto, D. Seigler, M. A. Smith, Isolation of oligomeric proanthocyanidins from flavonoid - producing cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant Biol Plant* 36, 492 - 500 (2000).
- [9]. N. Đ. Lượng, L. T. T. Tiên, *Công nghệ tế bào*, NXB Đại học Quốc gia Tp.HCM. (2006).
- [10]. T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia. Plantarum*, 15, 473-497 (1962).
- [11]. L. T. T. Tiên, B. T. Việt, N. Đ. Lượng, Khảo sát vài yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp taxol của các hệ thống tế bào *Taxus wallichiana* Zucc. *In vitro*, *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, T3, 67-77 (2010).
- [12]. V. V. Vũ, N. M. Hùng, L. H. Điệp, *Công nghệ sinh học, tập 2 (Công nghệ sinh học tế bào)*, NXB Giáo dục (2005).
- [13]. R. E. Wrolstad, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy), John Wiley & Sons Inc (2001).