

Khảo sát ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành và tăng sinh của rễ bất định dứa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)

- Trương Quỳnh Như
- Võ Thanh Phúc
- Lê Thị Thủy Tiên

Trường Đại Học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bản nhận ngày 15 tháng 5 năm 2015, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 24 tháng 8 năm 2015)

TÓM TẮT

Sự hình thành và tăng sinh của rễ bất định dứa cạn in vitro dưới tác động của hai loại auxin là IBA và NAA được khảo sát. Kết quả cho thấy sự cảm ứng tạo rễ xảy ra tốt nhất từ vật liệu lá mầm trên môi trường có IBA 0,7 mg/L và từ lá của chồi in vitro trên môi trường có IBA 0,7 mg/L hoặc NAA 0,5 mg/L. Nồng độ auxin thích hợp cho sự tăng sinh của rễ thấp hơn nồng độ auxin sử

dụng trong giai đoạn cảm ứng tạo rễ từ mẫu cấy. Môi trường ¼ MS lỏng kết hợp với IBA 0,3 mg/L hoặc NAA 0,1 mg/L thích hợp nhất cho sự tăng sinh rễ bất định. Các nồng độ cao hơn dẫn đến sự phát triển mạnh và chiếm ưu thế của mô sẹo. Sau 28 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng, sinh khối thu nhận được xác định có khả năng tích lũy ajmalicine với hàm lượng cao.

Từ khóa: ajmalicine, *Catharanthus roseus*, dứa cạn, rễ bất định.

Chữ viết tắt: BA: benzyladenine; IBA: indole-3-butyric acid; MS: Murashige và Skoog; NAA: 1-naphthaleneacetic acid; TLK: trọng lượng khô.

1. MỞ ĐẦU

Dứa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) là một trong những loài cây dược liệu phổ biến và quan trọng nhờ khả năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học. Đến nay, các nghiên cứu đã cho thấy loài thực vật này có khả năng tổng hợp hơn 130 loại terpenoid indole alkaloid với khoảng 30 phân

ứng được xúc tác bởi enzyme, gồm tối thiểu 35 hợp chất trung gian xác định [1]. Trong các hợp chất tự nhiên được tạo thành ở dứa cạn, một số alkaloid đã được chứng nhận có giá trị cao trong y học như vinblastine và vincristine dùng trong điều trị ung thư, ajmalicine và serpentine là các tác nhân chống tăng huyết áp và giúp giảm đau [2], [3], [4], [5].

Rễ bất định được tạo thành trong môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật thích hợp ở điều kiện vô trùng có tốc độ tăng trưởng cao và có khả năng hoạt hóa các con đường biến dưỡng thứ cấp, là nguyên liệu sinh học có tiềm năng lớn trong sản xuất thương mại các hợp chất tự nhiên có giá trị một cách ổn định mà không cần sự có mặt của gen ngoại lai [6]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát sự hình thành và tăng trưởng của rễ bất định từ chồi (*C. roseus* (L.) G. Don) *in vitro* có khả năng tổng hợp ajmalicine dưới tác động của hai loại auxin IBA và NAA.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Lá mầm và thân mầm của cây mầm *in vitro* 14 ngày tuổi và lá của chồi *in vitro* 5 tuần tuổi được dùng làm vật liệu tạo rễ bất định.

Phương pháp

Tạo nguyên liệu *in vitro*

Hạt được lãc trong xà phòng 5 phút, khử trùng bằng dung dịch NaOCl 5% (v/v) trong 10 phút và gieo trên bông gòn ẩm ở điều kiện không có ánh sáng. Hạt nảy mầm được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường MS [7] trong 14 ngày để thu lá mầm và thân mầm làm nguyên liệu tạo rễ bất định. Đốt thân từ cây con 6 – 7 tuần tuổi được sử dụng làm nguyên liệu tạo chồi trên môi trường MS bổ sung BA 0,3 mg/L. Lá từ chồi *in vitro* 5 tuần tuổi được dùng làm vật liệu cho sự tạo rễ bất định. Môi trường nuôi cấy đặc có nồng độ agar 7,5 g/L.

Tạo rễ bất định

Thân mầm được cắt thành từng đoạn dài 1 cm. Mẫu cấy lá mầm có kích thước 2 x 4 mm và mẫu cấy lá có kích thước 5 x 5 mm được tạo vết

thương ở hai đầu. Mẫu cấy được đặt trên môi trường MS đặc có hàm lượng khoáng đa lượng giảm còn $\frac{1}{2}$, agar 7,5 g/L, đồng thời với sự bổ sung riêng lẻ IBA hoặc NAA ở các nồng độ 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 và 1,0 mg/L để tạo rễ bất định. Điều kiện nuôi cấy không có ánh sáng, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tăng sinh rễ bất định

Rễ bất định từ lá của chồi *in vitro* sau 25 ngày nuôi cấy được chuyển vào môi trường lỏng $\frac{1}{4}$ MS kết hợp với IBA nồng độ thay đổi 0,1; 0,3; 0,5 và 0,7 mg/L hoặc NAA nồng độ 0,1; 0,2 và 0,3 mg/L. Trọng lượng rễ sử dụng là 0,5 g trong 20 ml môi trường nuôi cấy. Mẫu cấy được nuôi trên máy lắc vòng với tốc độ lắc 90 vòng/phút, trong điều kiện tối, ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Sự tăng sinh của rễ được xác định bằng chỉ số tăng trưởng tính theo công thức:

$$\text{Chỉ số tăng trưởng} = \frac{\text{Trọng lượng sau} - \text{Trọng lượng đầu}}{\text{Trọng lượng đầu}}$$

Định lượng ajmalicine

Phương pháp sắc kí lỏng cao áp (HPLC) được sử dụng để xác định hàm lượng ajmalicine.

Xử lý số liệu

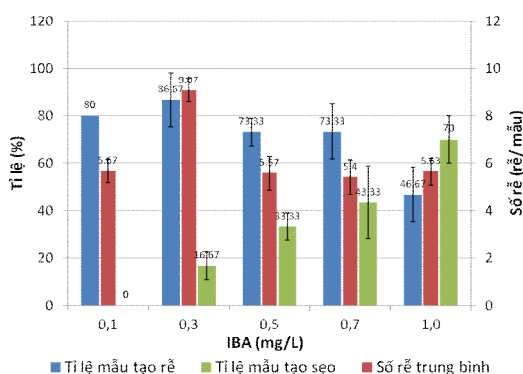
Số liệu được xử lý thống kê với phần mềm SPSS phiên bản 19 dành cho Windows, phương pháp ANOVA một chiều và Duncan test.

3. KẾT QUẢ

Sự hình thành rễ bất định từ thân mầm dưới tác động của IBA

Trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung IBA, sự xuất hiện rễ bất định từ thân mầm được ghi nhận

sau 7 ngày nuôi cấy. Sau 14 ngày, rễ bất định phát triển mạnh chủ yếu ở các nghiệm thức sử dụng IBA nồng độ 0,1 – 0,7 mg/L, trong khi mô sẹo phát triển mạnh ở nồng độ 1,0 mg/L. Sau 25 ngày nuôi cấy, rễ bất định hình thành và phát triển tốt nhất trên môi trường có nồng độ IBA 0,3 mg/L. Tỷ lệ mẫu cấy tạo rễ và số rễ trung bình trên mỗi mẫu cấy tương ứng là 86,67% và 9,07 rễ/mẫu cấy. Tỷ lệ mẫu cấy tạo sẹo gia tăng đáng kể khi nồng độ IBA tăng dần (Hình 1). Ở nồng độ IBA cao (1,0 mg/L), mô sẹo dạng bờ phát triển mạnh từ mẫu cấy và chiếm ưu thế, đồng thời phần gốc của một số rễ bất định đã hình thành từ trước cũng tạo mô sẹo (Hình 3).

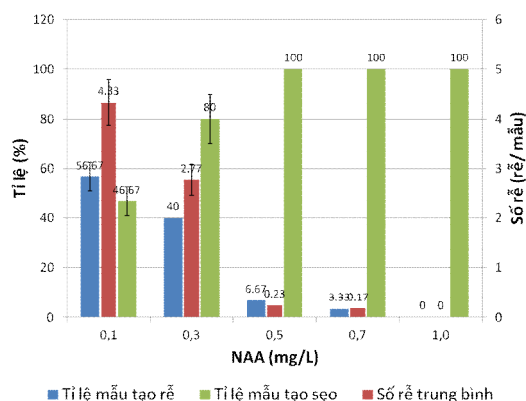


Hình 1. Tỷ lệ mẫu cấy từ thân mầm tạo rễ bất định sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung IBA.

Sự hình thành rễ bất định từ thân mầm dưới tác động của NAA

Nồng độ NAA cao (0,5 – 1,0 mg/L) hầu như chỉ kích thích sự hình thành và phát triển của mô sẹo bờ sau 14 ngày nuôi cấy, trong khi rễ bất định hình thành và phát triển tốt hơn ở các môi trường có NAA nồng độ thấp (0,1 và 0,3 mg/L). Sau 25 ngày nuôi cấy, tỉ lệ mẫu cấy từ

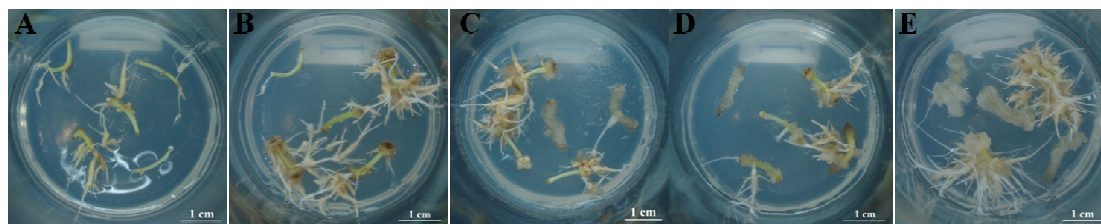
thân mầm tạo rễ bất định và số lượng rễ trung bình trên mỗi mẫu cấy cao nhất ở nồng độ NAA 0,1 mg/L (lần lượt 56,67% và 4,33 rễ/ mẫu), trong khi mô sẹo chiếm ưu thế ở các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, tỉ lệ mẫu cấy tạo thành mô sẹo vẫn khá cao (46,67%) ngay cả khi sử dụng NAA nồng độ 0,1 mg/L (Hình 2 và 4).



Hình 2. Tỷ lệ mẫu cấy từ thân mầm tạo rễ bất định sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA.

Sự hình thành rễ bất định từ lá mầm dưới tác động của IBA

Sự xuất hiện của rễ bất định đầu tiên được ghi nhận ở các nghiệm thức có bổ sung IBA nồng độ 0,5; 0,7 và 1,0 mg/L sau 5 – 6 ngày nuôi cấy. Sau 14 ngày nuôi cấy trên các môi trường có IBA nồng độ cao (0,5 – 1,0 mg/L), rễ bất định hình thành nhiều và phát triển mạnh hơn so với môi trường có IBA nồng độ thấp (0,1 và 0,3 mg/L). Sau 25 ngày nuôi cấy, sự hình thành và phát triển của rễ bất định xảy ra tốt nhất khi sử dụng IBA nồng độ 0,7 mg/L, với 100% mẫu cấy tạo rễ và số rễ trung bình đạt 19,23 rễ/ mẫu (Hình 5).

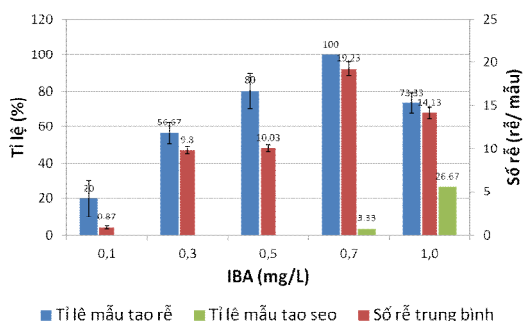


Hình 3. Rễ bất định và mô sẹo từ thân mầm dừa cạn sau 25 ngày nuôi cấy trên các môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung IBA nồng độ thay đổi (A: 0,1 mg/L; B: 0,3 mg/L; C: 0,5 mg/L; D: 0,7 mg/L; E: 1,0 mg/L).

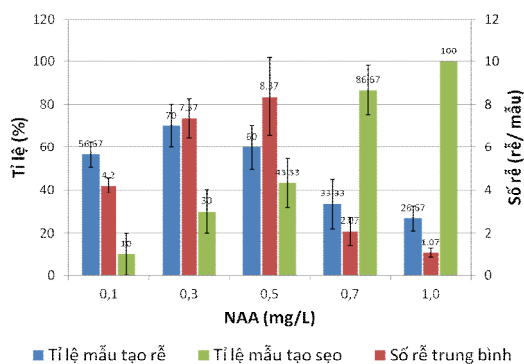


Hình 4. Rễ bất định và mô sẹo từ thân mầm dừa cạn sau 25 ngày nuôi cấy trên các môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA nồng độ thay đổi (A: 0,1 mg/L; B: 0,3 mg/L; C: 0,5 mg/L; D: 0,7 mg/L; E: 1,0 mg/L).

Sợi rễ có dạng mảnh, màu trắng, rễ chính dài 11 – 15 mm, các rễ bên và rễ mọc sau dài 5 – 6 mm. Trong môi trường có nồng độ IBA 1,0 mg/L, sự hình thành và phát triển của mô sẹo từ mẫu cấy lá mầm và từ rễ bất định gia tăng rõ rệt (Hình 5 và 7).



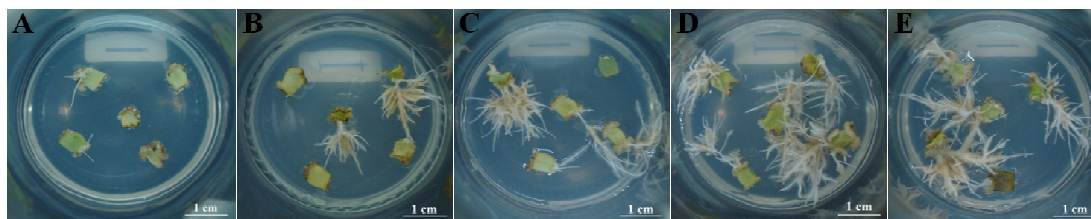
Hình 5. Ti lệ mẫu cấy từ lá mầm tạo rễ bất định sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung IBA.



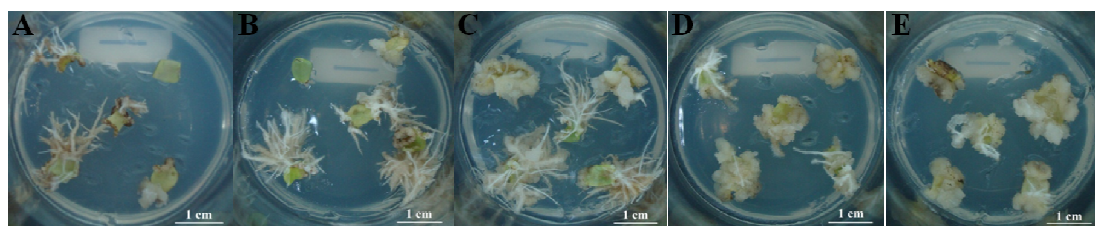
Hình 6. Ti lệ mẫu cấy từ lá mầm tạo rễ bất định sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA.

Sự hình thành rễ bất định từ lá mầm dưới sự tác động của NAA

NAA kích thích sự tạo mô sẹo từ rễ bất định ở hầu hết các nghiệm thức. Ở ngày thứ 14 của quá trình nuôi cấy, ở các nghiệm thức có nồng độ NAA cao (0,5 – 1,0 mg/L), chúng tôi ghi nhận hiện tượng rễ bất định sau khi hình thành đã chuyển sang màu trắng trong và tạo mô sẹo.



Hình 7. Rễ bất định và mô sẹo từ lá mầm dừa cạn sau 25 ngày nuôi cấy trên các môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung IBA nồng độ thay đổi (A: 0,1 mg/L; B: 0,3 mg/L; C: 0,5 mg/L; D: 0,7 mg/L; E: 1,0 mg/L).



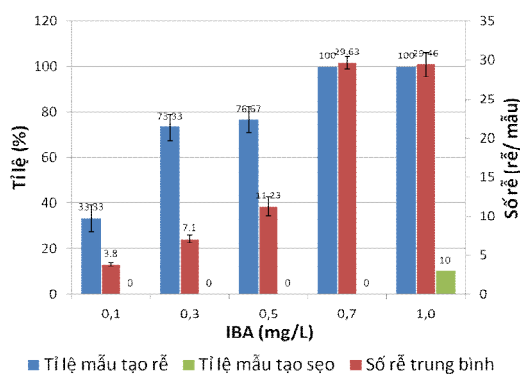
Hình 8. Rễ bất định và mô sẹo từ lá mầm dừa cạn sau 25 ngày nuôi cấy trên các môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA nồng độ thay đổi (A: 0,1 mg/L; B: 0,3 mg/L; C: 0,5 mg/L; D: 0,7 mg/L; E: 1,0 mg/L).

Sau 25 ngày nuôi cấy, trên môi trường sử dụng NAA 0,3 mg/L có 70% mẫu cấy tạo rễ và số rễ trung bình đạt 7,37 rễ/ mẫu, cao hơn các nồng độ NAA còn lại (Hình 6). Rễ trắng, dài 10 – 12 mm và có xu hướng tạo mô sẹo ở vị trí cổ rễ (Hình 8).

Sự hình thành rễ bất định từ lá của chồi *in vitro* dưới tác động của IBA

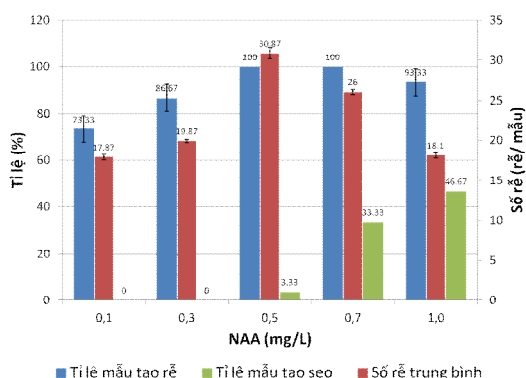
Sau 14 ngày nuôi cấy mẫu lá, rễ bất định hình thành nhiều và phát triển nhanh trên môi trường có IBA nồng độ cao (0,7 và 1,0 mg/L), sự tạo rễ xảy ra kém ở các môi trường có nồng độ IBA thấp hơn (0,1 – 0,5 mg/L). Kết quả ở hình 9 và 11 cho thấy sau 25 ngày nuôi cấy, nồng độ IBA thích hợp nhất để tạo rễ bất định từ lá của chồi *in vitro* là 0,7 mg/L với tỉ lệ mẫu cấy tạo rễ và số rễ trung bình tương ứng là 100% và

29,63 rễ/ mẫu. Khi nồng độ IBA tăng đến 1,0 mg/L, sự tạo rễ bất định vẫn xảy ra mạnh với tỉ lệ 100% mẫu tạo rễ và số rễ trung bình đạt 29,46 rễ/ mẫu, nhưng tỉ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo cũng tăng theo.



Hình 9. Tỉ lệ mẫu cấy từ lá của chồi tạo rễ bất định sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung IBA.

Sự hình thành rễ bất định từ lá của chồi *in vitro* dưới tác động của NAA



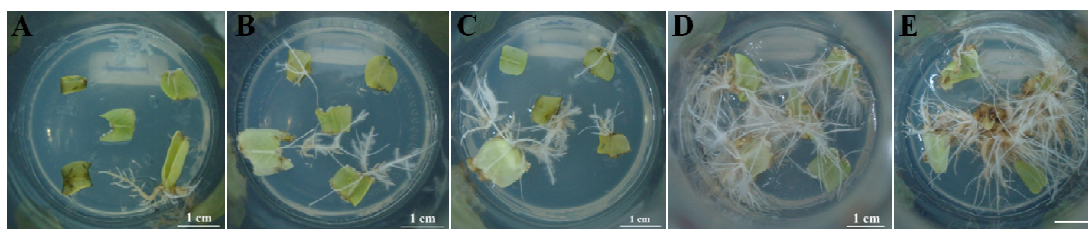
Hình 10. Tỉ lệ mẫu cấy từ lá của chồi tạo rễ bất định sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA.

Trong thí nghiệm khảo sát sự hình thành rễ bất định từ lá của chồi *in vitro* 5 tuần tuổi với tác

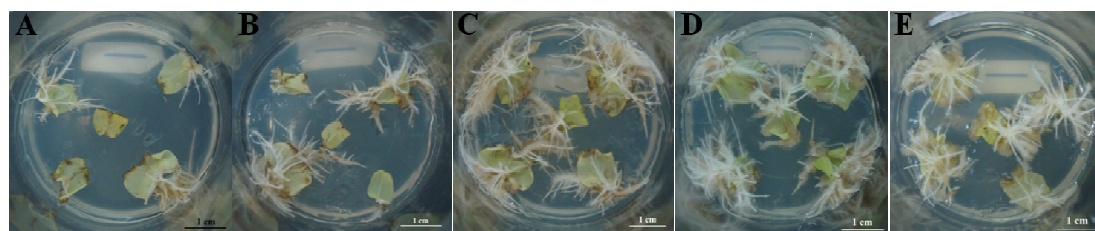
động của NAA, chúng tôi nhận thấy sau 25 ngày nuôi cấy, tỉ lệ mẫu cấy tạo rễ đạt 100% ở cả hai nồng độ 0,5 và 0,7 mg/L (Hình 10). Ở các nồng độ NAA cao (0,7 mg/L và 1,0 mg/L) có sự gia tăng đáng kể tỉ lệ mẫu cấy tạo sẹo và sự hình thành mô sẹo từ các rễ bất định đã được tạo thành trước đó (Hình 12). Nồng độ NAA 0,5 mg/L được ghi nhận là thích hợp nhất cho sự tạo rễ bất định từ lá của chồi *in vitro* với số rễ trung bình trên mỗi mẫu cấy là 30,87 rễ/mẫu.

Sự tăng sinh rễ bất định trong môi trường lỏng dưới tác động của IBA và NAA

Rễ bất định từ lá của chồi *in vitro* sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường đặc bổ sung IBA 0,7 mg/L hoặc NAA 0,5 mg/L được chuyển sang môi trường lỏng $\frac{1}{4}$ MS để tăng sinh. Ảnh hưởng của nồng độ IBA và NAA trên sự tăng sinh rễ được ghi nhận sau 28 ngày nuôi cấy (Bảng 1).



Hình 11. Rễ bất định dựa cạn từ lá của chồi *in vitro* 5 tuần tuổi sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung IBA nồng độ thay đổi (A: 0,1 mg/L; B: 0,3 mg/L; C: 0,5 mg/L; D: 0,7 mg/L; E: 1,0 mg/L).



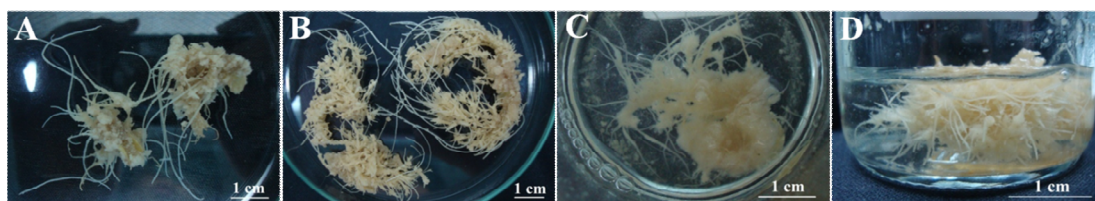
Hình 12. Rễ bất định dựa cạn từ lá của chồi *in vitro* 5 tuần tuổi sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA nồng độ thay đổi (A: 0,1 mg/L; B: 0,3 mg/L; C: 0,5 mg/L; D: 0,7 mg/L; E: 1,0 mg/L).

Bảng 1. Ảnh hưởng của IBA và NAA lên sự tăng sinh rễ bất định của cành sau 28 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng.

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Chỉ số tăng trưởng
IBA	0,1	$1,93 \pm 0,06^a$
	0,3	$3,58 \pm 0,05^b$
	0,5	$3,62 \pm 0,05^b$
	0,7	$3,67 \pm 0,04^b$
NAA	0,1	$2,36 \pm 0,05^a$
	0,2	$2,40 \pm 0,04^a$
	0,3	$2,50 \pm 0,05^b$

Các kí hiệu mẫu tự khác nhau thể hiện mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Với IBA, nồng độ 0,1 mg/L kích thích sự tăng sinh của rễ kém nhất. Sự gia tăng nồng độ IBA dẫn đến sự gia tăng chỉ số tăng trưởng, nhưng sự gia tăng này không đáng kể về mặt thống kê giữa các nghiệm thức 0,3; 0,5 và 0,7 mg/L (Bảng 1). Tuy nhiên, sự khác biệt về hình thái rễ và sự phát triển của mô sẹo được ghi nhận. Rễ phát triển trong môi trường có IBA 0,3 mg/L có dạng sợi mảnh và dài hơn rất nhiều so với rễ trong các môi trường có nồng độ IBA cao hơn. Mô sẹo hình thành từ rễ ở tất cả các nghiệm thức và phát triển mạnh ở môi trường có IBA nồng độ cao (0,5 và 0,7 mg/L) (Hình 13). Như vậy, nồng độ IBA 0,3 mg/L thích hợp nhất cho sự tăng sinh của rễ bất định của cành nuôi cấy trong môi trường lỏng.

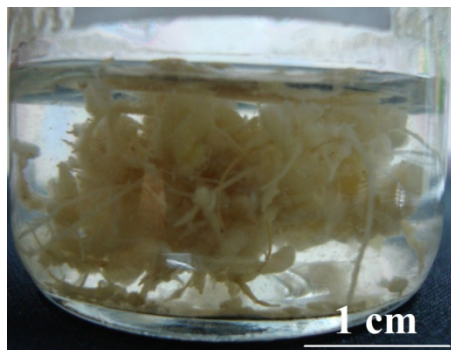


Hình 13. Rễ bất định và mô sẹo của cành dừa cạn sau 28 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng 1/4 MS bổ sung IBA nồng độ thay đổi (A: 0,1 mg/L; B: 0,3 mg/L; C: 0,5 mg/L; D: 0,7 mg/L).



Hình 14. Rễ bất định và mô sẹo của cành dừa cạn sau 28 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng 1/4 MS bổ sung NAA nồng độ thay đổi (A: 0,1 mg/L; B: 0,2 mg/L; C: 0,3 mg/L).

Tương tự, việc tiếp tục sử dụng nồng độ NAA bằng hoặc cao hơn nồng độ cảm ứng cũng gây ra hiện tượng mô sẹo hình thành và phát triển mạnh khi rễ bất định được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường lỏng (Hình 15).



Hình 15. Rễ bất định của cây sau 28 ngày nuôi cấy trong môi trường 1/4 MS lỏng bổ sung NAA 0,5 mg/L.

Do đó, trong thí nghiệm khảo sát sự tăng sinh dưới tác động của NAA, nồng độ auxin này được giảm xuống thấp hơn nồng độ cảm ứng tạo rễ ban đầu. Sinh khối trong môi trường có NAA 0,3 mg/L có chỉ số tăng trưởng cao hơn ở các nồng độ 0,1 và 0,2 mg/L nhưng sự phát triển của mô sẹo chiếm ưu thế. Chỉ số tăng trưởng của sinh khối trong môi trường có NAA 0,1 và 0,2 mg/L khác nhau không đáng kể (Bảng 1), nhưng rễ trong nghiệm thức NAA 0,1 mg/L có khả năng kéo dài và có hình thái rễ ổn định hơn so với rễ trong nghiệm thức NAA 0,2 mg/L, đồng thời sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo cũng giảm (Hình 14).

Hàm lượng ajmalicine trong sinh khối rễ bất định dựa cạn

Hàm lượng ajmalicine thu nhận được từ sinh khối sau 28 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng 1/4 MS bổ sung IBA 0,3 mg/L hoặc NAA 0,1 mg/L được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng ajmalicine trong sinh khối rễ bất định dựa cạn sau 28 ngày tăng sinh trong môi trường lỏng.

Loại mẫu/ Môi trường nuôi cấy	Hàm lượng ajmalicine (µg/g TLK)
1/4 MS + IBA 0,3 mg/L	750,3
1/4 MS + NAA 0,1 mg/L	804,6
Rễ cây trong tự nhiên	421,6
Lá cây trong tự nhiên	1,8

4. THẢO LUẬN

Việc bổ sung auxin để cảm ứng sự hình thành rễ bất định là điều cần thiết ở nhiều loài thực vật, trong đó IBA và NAA được dùng phổ biến [8]. Tuy nhiên, loại và độ tuổi của vật liệu nuôi cấy đáp ứng khác nhau với loại auxin khác nhau và với các nồng độ khác nhau của cùng một loại auxin. Trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của IBA lên sự tạo rễ bất định dựa cạn từ các vật liệu khác nhau, nồng độ 0,7 mg/L thích hợp nhất đối với lá mầm 14 ngày tuổi và lá của chồi 5 tuần tuổi (100% mẫu tạo rễ, số lượng rễ hình thành lần lượt là 19,23 rễ/ mẫu và 29,63 rễ/ mẫu), nhưng nồng độ này lại chủ yếu kích thích sự tạo mô sẹo với vật liệu thân mầm. Đối với vật liệu thân mầm, loại và nồng độ auxin thích hợp là IBA 0,3 mg/L, nhưng tỉ lệ mẫu cấy tạo rễ và số rễ hình thành (86,67% và 9,07 rễ/ mẫu) thấp hơn đáng kể so với khi sử dụng lá mầm và lá của chồi *in vitro*. Với NAA, nồng độ thích hợp nhất để kích thích sự tạo rễ là 0,5 mg/L trên vật liệu là lá của chồi 5 tuần tuổi, nhưng không thích hợp để cảm ứng rễ từ các vật liệu thân mầm và lá mầm. IBA và NAA có tác động khác nhau trong sự hình thành rễ bất định dựa cạn,

NAA dường như thích hợp cho sự kích thích hình thành mô sẹo hơn là tạo rễ. Tác động khác nhau giữa hai loại auxin này cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đây. Trong khảo sát nuôi cấy rễ bất định *Panax ginseng* C. A. Meyer, Nguyễn Trung Thành và cộng sự (2008) cho rằng IBA thích hợp cho sự hình thành và tăng trưởng của rễ bất định, số rễ hình thành trên môi trường bổ sung IBA cao hơn nhiều so với khi sử dụng NAA [9]. Như vậy, loại và nồng độ auxin có ảnh hưởng lớn đến các hoạt động biến dưỡng của các dòng/ kiểu tế bào khác nhau [10].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi cấy chuyển rễ bất định sang môi trường có nồng độ IBA và NAA không đổi thì rễ dường như ngừng phát triển, mô sẹo hình thành ở gốc rễ và phát triển mạnh gần như lan hết chiều dài của rễ, từ mô sẹo có sự hình thành rễ bất định nhưng những rễ này kém phát triển. Một số trường hợp có sự phóng thích tế bào ra môi trường. Khi môi trường tăng sinh rễ bất định chứa auxin nồng độ thấp hơn nồng độ cảm ứng tạo rễ thì hiện tượng xuất hiện mô sẹo trên rễ giảm, đồng thời rễ có khả năng kéo dài và phân nhánh tốt hơn. Kết quả này thích hợp với lý thuyết về sự tác động của auxin lên sự hình thành và phát triển rễ. Các nhà nghiên cứu cho rằng nồng độ auxin thích hợp cho sự cảm ứng ra rễ có tác động ngăn cản sự phát triển của rễ [8]. Nghiên cứu của Gorst và cộng sự (1983) về ảnh hưởng của IBA và riboflavin lên sự phát sinh hình thái rễ bất định *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. *in vitro* cũng chỉ ra tác động của việc giảm nồng độ IBA. Trong nghiên cứu này, môi trường nuôi cấy có IBA nồng độ $10^{-4} - 10^{-6}$ M thúc đẩy sự hình thành hệ thống rễ loại II gồm mô sẹo và nhiều rễ ngắn, nhưng trong trường hợp IBA bị oxy hóa bởi riboflavin dưới tác động của ánh sáng làm nồng

độ IBA giảm xuống còn 10^{-8} M hoặc thấp hơn thì hệ thống rễ loại I phát triển, bao gồm các rễ dài và chỉ có một ít mô sẹo [11].

Hàm lượng ajmalicine trong sinh khối có sự khác biệt đáng kể so với kết quả của một số nghiên cứu trước đây, điều này có thể do nhiều nguyên nhân như khác giống, thành phần môi trường khoáng hoặc cũng có thể do ảnh hưởng của nồng độ auxin sử dụng. Rễ thứ cấp dừa cạn nuôi trong môi trường $\frac{1}{2}$ B5 trong nghiên cứu của Ciau-Uitz và cộng sự (1994) có hàm lượng ajmalicine 90 – 380 $\mu\text{g/g}$ TLK sau 30 ngày nuôi cấy [12], trong nghiên cứu của Pietrosiuk và cộng sự (2001) thì ajmalicine chỉ đạt 53 $\mu\text{g/g}$ TLK từ rễ nuôi cấy trong môi trường $\frac{1}{2}$ B5 bổ sung NAA 0,5 mg/L [13]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng ajmalicine tích lũy trong sinh khối (lần lượt là 750,3 và 804,6 $\mu\text{g/g}$ TLK tương ứng với môi trường $\frac{1}{4}$ MS kết hợp với IBA 0,3 mg/L và NAA 0,1 mg/L) cao hơn nhiều so với mẫu rễ và lá từ cây mẹ sống lâu năm trong tự nhiên (lần lượt là 421,6 và 1,8 $\mu\text{g/g}$ TLK), mở ra triển vọng trong việc tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất rễ bất định dừa cạn *in vitro* nhằm thu nhận ajmalicine phục vụ cho ngành dược phẩm.

5. KẾT LUẬN

Sự tạo rễ bất định dừa cạn xảy ra tốt nhất trên các môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung IBA 0,7 mg/L đối với lá mầm và lá của chồi *in vitro*, hoặc NAA 0,5 mg/L từ lá của chồi *in vitro*. Tỷ lệ mẫu cấy hình thành mô sẹo và xu hướng rễ bất định tạo sẹo trong các môi trường có NAA phổ biến hơn IBA. Trong môi trường tăng sinh (lông), nồng độ auxin cần được giảm xuống thấp hơn so với nồng độ cảm ứng sự tạo rễ. Trong môi trường lông $\frac{1}{4}$ MS, nồng độ auxin thích hợp cho sự tăng sinh rễ bất định dừa cạn là IBA 0,3

mg/L hoặc NAA 0,1 mg/L. Sinh khối bao gồm chủ yếu rễ bất định và một ít mô sẹo được xác định có khả năng tích lũy ajmalicine với hàm lượng cao.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi trường Đại học Bách Khoa – Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh – trong khuôn khổ đề tài mã số T-KTHH-2015-70.

Effects of auxin on the initiation and proliferation of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don adventitious roots

- **Truong Quynh Nhu**
- **Vo Thanh Phuc**
- **Le Thi Thuy Tien**

Ho Chi Minh city University of Technology, VNU-HCMC

ABSTRACT

The influence of exogenous auxins such as IBA and NAA on the initiation and proliferation of Catharanthus roseus (L.) G. Don adventitious roots was investigated. The results showed that adventitious roots were successfully established from cotyledons on ½ MS medium supplemented with IBA 0,7 mg/L and from leaves of in vitro shoots with IBA 0,7 mg/L or NAA 0,5

mg/L. The reduction of auxin concentration was required for root proliferation. The growth of adventitious roots cultured in shake flasks was better with IBA 0,3 mg/L or NAA 0,1 mg/L, while higher auxin concentrations led to significant development of callus. Biomass after 28 days of proliferation was proved of ajmalicine accumulation.

Keywords: Adventitious roots, ajmalicine, *Catharanthus roseus*, Madagascar periwinkle.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Priyanka Verma, Ajay Kumar Mathur, Alka Srivastava, Archana Mathur. Emerging trends in research on spatial and temporal organization of terpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*: a literature update. *Protoplasma*, 249, 255-268 (2012).
- [2]. Paulo R. H. Moreno, Robert van der Heijden, Robert Verpoorte. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey. *Plant Cell, tissue and Organ Culture*, 42, 1-25 (1995).
- [3]. Ajaswata Dutta, Jyoti Batra, Sashi Pandey-Rai, Digvijay Singh, Sushil Kumar, Jayanti Sen. Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Planta*, 220, 376-383 (2005).
- [4]. Mariana Sottomayor and Alfonso Ros Barceló. The Vinca alkaloids: From biosynthesis and accumulation in plant cells, to uptake, activity and metabolism in animal cells. In: *Studies in natural products chemistry*, vol. 33. Atta-ur-Rahman, ed. Elsevier, The Netherlands (2006).
- [5]. Lorena Almagro, Francisco Fernández-Pérez, Maria Angeles Pedreño. Review: Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human health. *Molecules*, 20, 2973-3000 (2015).
- [6]. Md. Abdullahil Baque, Sang-Hyun Moh, Eun-Jung Lee, Jian-Jiang Zhong, Kee-Yoeup Paek. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*, 30, 1255-1267 (2012).
- [7]. Toshio Murashige, Folke Skoog. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497 (1962).
- [8]. Geert-Jan De Klerk, Wim Van Der Krieken, Joke C. De Jong. Review: The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Bio Plant*, 35, 189-199 (1999).
- [9]. Nguyễn Trung Thành, Paek Kee Yoeup. Nhân nhanh rễ bất định nhân sâm *Panax ginseng* C. A. Meyer: ảnh hưởng của một số nhân tố hóa lý lên sự tăng trưởng sinh khối và sản phẩm trao đổi chất ginsenosides. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 24, 318-323 (2004).
- [10]. Yew Lee, Dong-Eun Lee, Hak-Soo Lee, Seong-Ki Kim, Woo Sung Lee, Soo-Hwan Kim, Myoung-Won Kim. Influence of auxins, cytokinins and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 105, 9-19 (2011).
- [11]. J. R. Gorst, M. Slaytor, R. A. De Fossard. The effect of indole-3-butyric acid and riboflavin on the morphogenesis of adventitious roots of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. grown in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 34 (148), 1503-1515 (1983).

- [12].R. Ciau-Uitz, M. L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, B. Chí, L. M. Pacheco, V. M. Loyola-Vargas. Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell. Dev. Bio.*, 30, 84-88 (1994).
- [13].Agnieszka Pietrosiuk, Mirosława Furmanowa. Preliminary results of indole alkaloids production in different roots of *Catharanthus roseus* cultured *in vitro*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 70, 4, 261-265 (2001).