

ẢNH HƯỞNG CỦA NAA, MÔI TRƯỜNG KHOÁNG VÀ NGUỒN CARBOHYDRATE LÊN NUÔI CẤY TẾ BÀO HUYỀN PHÙ CÂY XẠ ĐEN (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.)

Nguyễn Võ Thu Thảo^{1,2}, Đỗ Đức Thắng², Nguyễn Thị Huyền Trang²,

Đỗ Đăng Giáp², Nguyễn Hoàng Dũng²,

Trịnh Thị Hương³, Trần Trọng Tuấn^{2*}

TÓM TẮT

Xạ đen (*Ehretia asperula*) là một vị thuốc quý từ lâu đã được sử dụng trong y học cổ truyền, ngày nay nhiều nghiên cứu cũng đã cho thấy Xạ đen chứa nhiều hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học quan trọng. Nuôi cấy huyền phù là phương pháp hiệu quả để sản xuất sinh khối và thu nhận các hợp chất thứ cấp. Trong nghiên cứu này, vai trò của NAA, môi trường khoáng và nguồn carbohydrate trong quá trình sinh trưởng của tế bào huyền phù cũng đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy mẫu (TCL) thân non cảm ứng tạo mô sẹo xốp bở trong môi trường có bổ sung 2,4 D, thích hợp làm nguyên liệu cho nuôi cấy tế bào huyền phù. Mô sẹo này được nuôi cấy vào môi trường MS lỏng bổ sung NAA (0,5 – 2,0 mg/L) trong điều kiện lỏng lác, sau 15 ngày nuôi cấy huyền phù tăng sinh tốt nhất trong môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L NAA. Bên cạnh đó các loại môi trường cũng như nguồn carbohydrate khác nhau cũng được khảo sát để xác định được loại môi trường tốt nhất cho sự sinh trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen. Sau 15 ngày nuôi cấy kết quả cho thấy môi trường B5 bổ sung 30 g/L sucrose là môi trường thích hợp nhất cho việc nuôi cấy tế bào huyền phù cây Xạ đen. Từ các kết quả trên, môi trường B5 bổ sung 1,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose được xem là môi trường tối ưu cho nuôi cấy tế bào huyền phù Xạ đen (BM). Sinh khối tế bào thu nhận trên môi trường BM được xác định có chứa các hợp chất thứ cấp, hàm lượng các chất thứ cấp này cũng thay đổi theo thời gian nuôi cấy. Kết quả ghi nhận tại điểm cực đại của đường cong tăng trưởng cho thấy hàm lượng phenolic đạt 47,74 mg GAE/g DW và hàm lượng rosmarinic acid (RA) đạt 43,61 mg/g DW.

Từ khóa: *Acid rosmarinic, xạ đen, tế bào huyền phù, môi trường B5, phenolic.*

1. GIỚI THIỆU

Cây Xạ đen có tên khoa học là *Ehretia asperula* Zoll. & Mor., họ Vòi voi (Boraginaceae) [19]. Loại cây này là một vị thuốc quý được dùng trong y học cổ truyền để chữa mụn nhọt, ung bướu, tiêu viêm, giải độc. Cây phân bố ở nhiều vùng châu Á và Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam. Một số nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng *C. hindsii* chứa các hợp chất thứ cấp như sesquiterpenes (Huang và cộng sự, 2000; Kuo và cộng sự, 1996) [6], [10], triterpenes (Huang và cộng sự, 2000; Kuo và Yang-Kuo, 1997) [6], [8], alkaloids (Huang và cộng sự, 2000; Wang và cộng sự, 2006; Kuo và cộng sự, 1995) [6], [32], [9] và flavonoids, polyphenols (Ly và cộng sự, 2006) [15], tannins,

amino acids và cyanoglycosides. Các hợp chất này đã được chứng minh là chống oxy hóa (Ly và cộng sự, 2006) [15], chống lại một số dòng tế bào ung thư (Kuo và Yang-Kuo, 1997; Hua và cộng sự, 2014) [8], [5] và khả năng chống lại hoạt động tái bản của virus HIV (Kuo và Yang-Kuo, 1997) [8].

Nhiều phương pháp được áp dụng để cải thiện chất lượng và số lượng của hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy tế bào bao gồm lựa chọn các dòng tế bào phù hợp, cố định tế bào, thay đổi các hợp chất của môi trường nuôi cấy, các ứng suất vật lý và hóa học khác nhau... (Tahsili và cộng sự, 2014) [30]. Hơn nữa, phương pháp này có thể được triển khai ở cả quy mô phòng thí nghiệm và quy mô công nghiệp, vì vậy nó được coi là phương pháp thích hợp để nuôi cấy sinh khối tế bào và thu nhận hợp chất thứ cấp với năng suất lớn. Các nghiên cứu về nuôi cấy tế bào huyền phù của *Melastoma malabathricum* thu được anthocyanin (See và cộng sự, 2010) [25], nuôi cấy tế bào huyền phù của *Withania somnifera* (L.) Dunal thu được withanolide A (Sivanandhan và cộng sự, 2013) [27], nuôi cấy tế bào

¹ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

² Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh

Email: trantrongtuan.itb@gmail.com

huyền phù của *Spilanthes acmella* Murr. thu nhận spilanthal (Singh và Chaturvedi 2012) [26].

Cho đến nay, các nghiên cứu về *E. asperula* chủ yếu tập trung vào phân tích các hợp chất hóa học, các nghiên cứu về nuôi cấy *in vitro* chủ yếu là vi nhân giống (Vũ Quang Nam và cộng sự, 2013; Tran Trong Tuan và cộng sự, 2016; Trần Thị Mỹ Trâm và cộng sự, 2018) [31], [30], [29]. Gần đây, Phạm Thị Mỹ Trâm và cộng sự (2020) đã bước đầu nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy tế bào Xạ đen từ các mẫu cấy mô sẹo [21]. Trong nghiên cứu này, bên cạnh việc xác định một số yếu tố ảnh hưởng lên quá trình nuôi cấy tế bào huyền phù Xạ đen, còn tập trung nghiên cứu sự sinh trưởng và khả năng tích lũy hợp chất thứ cấp của tế bào huyền phù theo thời gian nuôi cấy.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nguồn vật liệu nghiên cứu là cây Xạ đen hai năm tuổi được trồng trong nhà lưới Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới, giống cây Xạ đen được thu nhận tại tỉnh Hòa Bình.

2.2. Bố trí thí nghiệm

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của NAA và 2,4D lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu cấy thân non của cây Xạ đen

Mẫu cấy thân non được lacer trùng với $HgCl_2$ trong 10 phút, sau đó mẫu được cắt thành các lớp mỏng theo tiết diện ngang (từ 0,2 – 0,5 mm) và cấy vào môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) [17] bổ sung riêng lẻ NAA (Duchefa, Hà Lan) và 2,4D (Duchefa, Hà Lan) với nồng độ từ 0,5 đến 5,0 mg/L, kết quả được ghi nhận sau 40 ngày nuôi cấy (Hình 4a).

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NAA lên sự tăng trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen

Mô sẹo với khối lượng 1,2 g được cấy vào các bình tam giác chứa 50 mL môi trường MS lỏng có bổ sung 30 g/L sucrose và NAA (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L). Sự tăng trưởng của tế bào huyền phù được đánh giá qua sự thay đổi của các chỉ tiêu khối lượng tươi (mg/mL) và khối lượng khô (mg/mL) của tế bào huyền phù.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự tăng trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen

Sinh khối tế bào với khối lượng tươi ban đầu là 1,5 g, được cấy vào bình tam giác chứa 50 mL của các loại môi trường khoáng là MS, 1/2MS (Môi trường MS có thành phần khoáng đa lượng giảm đi 1/2), SH (Schenk và Hildebrand, 1972) [24], B5 (Gamborg,

1968) [4], WPM (Lloyd và McCown, 1980) [14], bổ sung 30 g/L sucrose và 1,0 mg/L NAA. Sinh khối tế bào của mỗi nghiệm thức được thu nhận sau 15 ngày nuôi cấy.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon lên sự tăng trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen

1,5 g sinh khối tế bào nuôi cấy trong môi trường khoáng thích hợp bổ sung 1,0 mg/L NAA có bổ sung các loại đường sucrose, glucose, fructose với nồng độ đường thay đổi từ 10 – 50 g/L. Sinh khối tế bào của mỗi nghiệm thức được thu nhận sau 15 ngày nuôi cấy.

2.2.5. Xây dựng đường cong tăng trưởng và xác định hàm lượng hợp chất thứ cấp (HCTC) tích lũy trong sinh khối tế bào Xạ đen trên môi trường tối ưu vừa xác định được

Sau khi xác định môi trường khoáng, loại đường và nồng độ đường thích hợp cho sự sinh trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen, môi trường mới này được ký hiệu là BM. 1,5 g sinh khối tế bào Xạ đen được nuôi cấy trong môi trường BM. Đường cong tăng trưởng của huyền phù trong môi trường này được thiết lập dựa trên sự biến thiên của khối lượng tươi và khối lượng khô của huyền phù ghi nhận sau mỗi 3 ngày nuôi cấy, thời gian khảo sát được thực hiện trong 3 tuần.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Phương pháp xác định sinh khối (sử dụng cho thí nghiệm 2)

Sinh khối tế bào được xác định theo phương pháp được mô tả trong báo cáo của Lê Kim Cương và cộng sự, 2012) [11]. Theo dõi và ghi nhận kết quả sau mỗi 3 ngày nuôi cấy, sự biến thiên của khối lượng sinh khối tế bào Xạ đen theo thời gian được sử dụng để dựng đường cong tăng trưởng cho tế bào huyền phù.

2.3.2. Xác định hàm lượng phenolic

Hàm lượng phenolic được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu (Folin và Ciocalteu, 1927) [3]. Hòa tan 1 mg cao chiết thô trong 1 mL nước cất, sau đó lấy 100 μ L dung dịch mẫu đã pha loãng cho vào ống eppendorf. Thêm 500 μ L dung dịch Folin-Ciocalteu 10% và trộn đều, ủ hỗn hợp để phản ứng trong 5 phút. Sau đó thêm 400 μ L dung dịch Na_2CO_3 7,5% và trộn đều. Ủ dung dịch ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, sau đó đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 765 nm.

2.3.3. Xác định hàm lượng Rosmarinic acid

Hàm lượng Rosmarinic acid (RA) trong cao chiết ethanol được xác định bằng phương pháp đo quang phổ được mô tả trong báo cáo của Öztürk và cộng sự (2010) [20].

2.4. Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, không chiếu sáng, các bình nuôi cấy lỏng được nuôi trên máy lắc với tốc độ 110 rpm.

2.5. Xử lý thống kê số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI, biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excell 2010.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của NAA và 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu thân non cây Xạ đen

Kết quả sau 40 ngày nuôi cấy, ở hầu hết các nghiệm thức bổ sung 2,4-D mẫu cấy đều có khả năng tạo mô sẹo, sau khoảng 7 ngày nuôi cấy mô sẹo bắt đầu hình thành, sau ngày thứ 30 mẫu cấy không có sự gia tăng thêm về tỷ lệ mô sẹo hình thành, chủ yếu gia tăng về kích thước mô sẹo tuy nhiên sự gia tăng này khá chậm. Ở các nghiệm thức bổ sung NAA mô sẹo bắt đầu hình thành sau khoảng 10 ngày nuôi cấy, chậm hơn so với các nghiệm thức có bổ sung 2,4-D. Sau 40 ngày nuôi cấy, nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L 2,4-D có tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất (65,08%), kế đó là nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L NAA (61,90%). Khối lượng tươi mô sẹo ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L 2,4-D chỉ đạt 38,76 mg, chỉ tiêu này cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L NAA (72,16 mg).

Tuy kết quả nghiên cứu cho thấy, NAA cho kết quả cảm ứng tạo sẹo thích hợp hơn 2,4-D nhưng những mô sẹo được tạo thành ở các nghiệm thức bổ sung NAA là mô sẹo xanh, cấu trúc mô sẹo cứng chắc (Hình 4b), điều này xét về chỉ tiêu hình thái mô sẹo là không phù hợp cho nuôi cấy tạo tế bào huyền phù. Trong khi đó, ở các nghiệm thức bổ sung 2,4-D, mẫu cấy thân non cây xạ đen cho mô sẹo xốp, màu trắng đến trắng ngà, nhờ có cấu trúc xốp bởi các mô sẹo này sẽ dễ dàng phân tán vào môi trường lỏng vì vậy đây là loại mô sẹo thích hợp cho nuôi cấy tạo tế bào huyền phù (Hình 4c). Nghiên cứu của Mahmood và cộng sự (2010) trong cảm ứng tạo mô sẹo từ các loại mẫu cấy khác nhau trên đối tượng cây Bá bệnh (*Eurycoma longifolia*) cho thấy loại mẫu cấy thân cây Bá bệnh, 2,4-D cho tỷ lệ mô sẹo hình thành cao nhất (88,33%, 2,0 mg/L), NAA chỉ cho tỷ lệ mô sẹo hình thành cao

thứ 4 (76,67% ở mức 1,0 mg/L) trong tất cả các auxin đã khảo sát [16]. Ngoài ra, hình thái mô sẹo ở các mẫu cấy trên cả hai môi trường bổ sung 2,4-D và NAA trong nghiên cứu nói trên đều cho mô sẹo xốp trắng đến hơi vàng.

Bảng 1. Ảnh hưởng của 2,4-D và NAA lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu cấy lớp thân non cây Xạ đen sau 40 ngày nuôi cấy

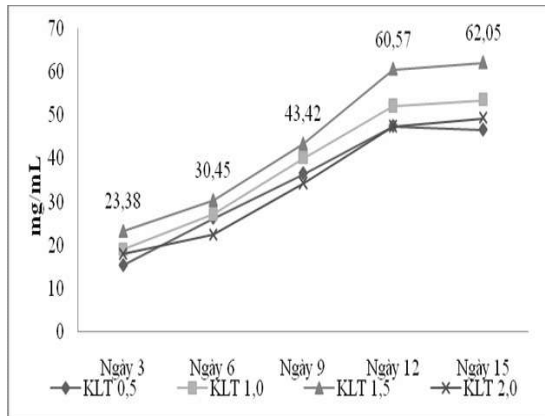
Nghiệm thức	Loại auxin	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Khối lượng tươi (mg)
T-D1	2,4-D	0,5	34,92 ^{ef}	16,82 ^{defg}
T-D2		1,0	39,68 ^{def}	23,88 ^{cdef}
T-D3		1,5	65,08 ^a	38,76 ^{bcd}
T-D4		2,0	58,73 ^{ab}	34,43 ^{bcde}
T-D5		2,5	34,92 ^{ef}	17,68 ^{defg}
T-D6		3,0	25,40 ^{gh}	16,94 ^{defg}
T-D7		3,5	20,64 ^h	12,00 ^{efg}
T-D8		4,0	6,35 ⁱ	7,20 ^{fg}
T-D9		4,5	0,00 ⁱ	0,00 ^g
T-D10		5,0	0,00 ⁱ	0,00 ^g
T-N1	NAA	0,5	47,62 ^{cd}	39,23 ^{bcd}
T-N2		1,0	55,55 ^{bc}	56,15 ^{ab}
T-N3		1,5	61,90 ^{ab}	72,16 ^a
T-N4		2,0	42,86 ^{de}	54,46 ^{ab}
T-N5		2,5	31,75 ^{fg}	46,35 ^{bc}
T-N6		3,0	22,22 ^h	26,79 ^{cdef}
T-N7		3,5	17,46 ^h	22,46 ^{defg}
T-N8		4,0	0,00 ⁱ	0,00 ^g
T-N9		4,5	0,00 ⁱ	0,00 ^g
T-N10		5,0	0,00 ⁱ	0,00 ^g

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c,... thể hiện sự khác biệt của các kết quả ở cả 2 chỉ tiêu tỷ lệ mô sẹo hình thành và khối lượng tươi mô sẹo có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ trong phép thử LSD.

3.2. Ảnh hưởng nồng độ NAA lên sự tăng trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen

Thời gian thích nghi của tế bào trong môi trường phụ thuộc vào nhiều yếu tố như tuổi mẫu, khối lượng mẫu cấy và điều kiện nuôi cấy. Khác với huyền phù của một vài đối tượng đã được nghiên cứu trước đó, tế bào huyền phù Xạ đen có thời gian thích nghi với môi trường lỏng lắc ngắn. Dựa vào đường cong tăng trưởng trong hình 1 cho thấy từ ngày thứ 3 sau nuôi cấy, ở ba nghiệm thức đầu (0,5; 1,0; 1,5 mg/L NAA) tế bào huyền phù đã bước vào phase log, riêng nghiệm

thức 2,0 mg/L NAA có thời gian phase lag kéo dài đến ngày thứ 6 sau nuôi cấy. Trong phase log, tế bào tăng sinh nhanh chóng khiến đường cong tăng trưởng của phase log khá dốc ở cả 4 nghiệm thức khảo sát. Từ ngày thứ 12 sau nuôi cấy tốc độ gia tăng sinh khối tế bào chậm lại, huyền phù bắt đầu bước vào phase cân bằng. Riêng với nghiệm thức 2,0 mg/L NAA phase log bắt đầu muộn hơn từ ngày thứ 6 và cũng kéo dài đến ngày thứ 12, từ sau ngày thứ 12 huyền phù cũng bắt đầu bước vào phase cân bằng. Kết quả ghi nhận tại thời điểm kết thúc phase log (ngày 12) cho thấy nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/mL NAA cho kết quả gia tăng sinh khối tế bào tốt nhất trong cả bốn nghiệm thức khảo sát, khối lượng tươi đạt 60,57 mg/mL (Hình 4d).



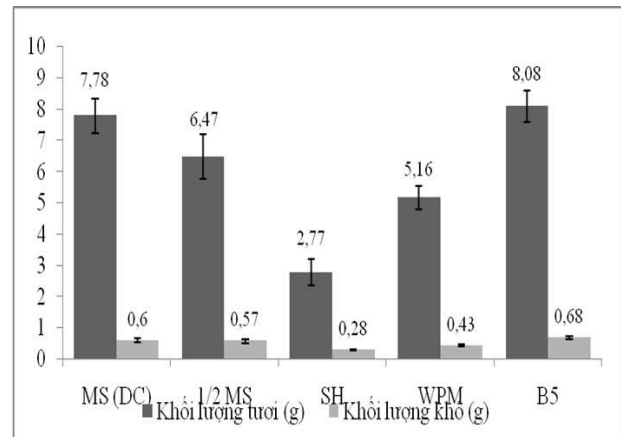
Hình 1. Đường cong tăng trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen được xây dựng bởi sự gia tăng sinh khối tươi theo ngày của các nghiệm thức khảo sát

Trong nghiên cứu này tốc độ tăng trưởng của huyền phù Xạ đen là nhanh hơn so với một số nghiên cứu trước đây trên các đối tượng khác. Đường cong tăng trưởng của tế bào huyền phù *Orthosiphon stamineus* có phase lag ngắn (6 ngày), kế đó là phase log kéo dài đến ngày thứ 18 của quá trình nuôi cấy, sau ngày thứ 18 huyền phù bước vào pha cân bằng (Lee và Chan, 2004) [12]. Trong nuôi cấy huyền phù *Spilanthes acmella* Murr., sinh khối chuyển sang phase log sau 6 ngày, phase log của sinh khối kéo dài đến ngày thứ 18 (Singh và Chaturvedi, 2012) [26]. Trong nuôi cấy tế bào huyền phù *Halodule pinifolia* cho thấy phase lag kéo dài đến ngày thứ 12 và pha log từ ngày thứ 12 đến ngày thứ 24 (Subhashini và cộng sự, 2014) [28]. Trong tế bào huyền phù *Panax vietnamensis*, phase lag kéo dài đến ngày thứ 7 nuôi cấy, từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 12 sinh khối chuyển sang phase log, sinh khối cao nhất vào ngày thứ 14

(23,67 mg/L) (Lê Kim Cương và cộng sự, 2012) [11]. Trong nghiên cứu trên *Taxus wallichiana* Zucc., phase lag của huyền phù kéo dài trong khoảng 8 ngày, đến ngày thứ 24 của quá trình nuôi cấy, sinh khối tế bào vẫn chưa chuyển sang pha cân bằng (Dương Tấn Nhựt và cộng sự, 2007) [2].

3.3. Ảnh hưởng của loại môi trường khoáng lên sự tăng trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen

Trong nuôi cấy tế bào huyền phù, môi trường khoáng đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng ở tế bào. Theo nghiên cứu của Rothstein và Cregg (2005) đã cho thấy tỷ lệ $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến hầu hết các loại cây được nuôi cấy thể hiện ở các thông số tăng trưởng đo được ở cây [23]. Thành phần các loại môi trường được khảo sát như MS, B5, WPM, 1/2MS và SH có tỷ lệ này khác nhau. Kết quả nghiên cứu (Hình 2) cũng đã cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa của sinh khối Xạ đen được nuôi trong các loại môi trường khoáng khác nhau. Sinh khối tế bào Xạ đen đạt cao nhất trong môi trường B5 (8,08 g khối lượng tươi; 0,68 g khối lượng khô) và môi trường MS (7,78 g khối lượng tươi; 0,60 g khối lượng khô) và thấp nhất ở môi trường SH (2,77 g khối lượng tươi; 0,28 g khối lượng khô).



Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự tăng trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen

3.4. Ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên sự tăng trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen

Nguồn carbohydrate cũng là thành phần quan trọng của môi trường nuôi cấy in vitro. Đường không chỉ đã được chứng minh là phân tử hoạt động như các nguồn năng lượng mà còn có thể hoạt động như các phân tử tín hiệu ảnh hưởng đến sự tăng trưởng, phát

triển và chuyển hóa của các tế bào nuôi cấy (Rolland và cộng sự, 2006; Wang và Weathers, 2007) [22], [33]. Trong nghiên cứu này sucrose, glucose hoặc fructose được sử dụng để đánh giá tác động của nguồn carbohydrate lên sự sinh trưởng của tế bào huyền phù cây Xạ đen.

Từ kết quả ở bảng 2 có thể thấy các loại nguồn carbohydrate khác nhau khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào huyền phù cây Xạ đen đã cho thấy những tác động khác nhau lên khả năng tăng sinh của tế bào. Sinh khối tế bào Xạ đen có sự thay đổi rõ rệt theo sự biến thiên của loại và nồng độ đường được bổ sung vào môi trường. Nghiệm thức có sự gia tăng sinh khối tế bào cây Xạ đen mạnh nhất là bổ sung 20 g/L sucrose (7,58 g), kế đó là nghiệm thức bổ sung 30 g/L sucrose (7,02 g). Các nghiệm thức bổ sung glucose chỉ cho kết quả gia tăng sinh khối ở mức trung bình, nghiệm thức bổ sung glucose cho kết quả tốt nhất là 20 g/L (5,17 g). Nghiên cứu cũng cho thấy fructose không thích hợp cho sự phát triển của tế bào huyền phù cây Xạ đen, khối lượng sinh khối tế bào ghi nhận được ở các nghiệm thức bổ sung đường fructose rất thấp so với đường sucrose hoặc glucose. Song song đó, kết quả bảng 2 cũng cho thấy sự gia tăng sinh khối khô của tế bào Xạ đen tỷ lệ thuận với sự gia tăng nồng độ đường trong môi trường nuôi cấy. Nghiệm thức có sự gia tăng sinh khối khô tế bào cây Xạ đen mạnh nhất là nghiệm thức bổ sung 40 g/L sucrose (0,45 g) và bổ sung 30 g/L sucrose (0,44 g), trong khi sinh khối khô của nghiệm thức bổ sung 20 g/L chỉ đạt 0,39 g. Từ những kết quả này cho thấy, khi nồng độ đường trong môi trường tăng cao một mặt đã ức chế sự tăng sinh của tế bào do sự gia tăng áp suất thẩm thấu trong môi trường, mặt khác chính việc chậm tăng về số lượng cùng với hàm lượng cao của carbohydrate đã tạo điều kiện tốt cho tế bào tích lũy chất khô.

Từ mối tương quan giữa sự gia tăng của sinh khối tươi và khô của tế bào Xạ đen có thể kết luận rằng môi trường bổ sung 30 g/L sucrose là thích hợp cho nuôi cấy tế bào huyền phù cây Xạ đen. Kết quả của nghiên cứu này tương tự với kết quả nghiên cứu của Zhang và cộng sự (2018) nuôi cấy tế bào huyền phù cây *Angelica sinensis*, tế bào huyền phù tăng sinh về khối lượng tươi tốt nhất trong môi trường bổ sung 30 g/L sucrose trong khi đó khối lượng khô sinh khối đạt cao nhất ở nồng độ 40 g/L sucrose [35]. Nghiên cứu của Karwasara và Dixit (2013) đã chứng minh rằng, tế bào huyền phù cây *Nothapodytes nimmoniana* nuôi trong

môi trường bổ sung sucrose có tốc độ tăng trưởng nhanh hơn so với môi trường bổ sung glucose và fructose ở cùng nồng độ 30 g/L [7]. Một nghiên cứu khác của Nagella và Murthy (2010) trong nuôi cấy tế bào cây *Withania somnifera* chứng minh rằng môi trường chỉ sử dụng một nguồn đường là sucrose cho kết quả gia tăng sinh khối cao hơn so với môi trường bổ sung các loại đường khác ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp [19]. Tương tự, nghiên cứu của Liu và cộng sự (2018) đã cho thấy môi trường nuôi cấy bổ sung 30 g/L sucrose là tối ưu cho sự tăng trưởng tế bào ở tế bào huyền phù cây *Cistanche tubulosa* [13].

Bảng 2. Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường nuôi cấy đến sự sinh trưởng của tế bào huyền phù cây Xạ đen sau 15 ngày nuôi cấy

Loại đường	Nghiệm thức	Nồng độ (g/L)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
Sucrose	S1	10	5,03 ^{cd}	0,20 ^c
	S2	20	7,58 ^a	0,39 ^b
	S3	30	7,02 ^{ab}	0,44 ^a
	S4	40	6,44 ^b	0,45 ^a
	S5	50	5,57 ^c	0,39 ^b
Glucose	G1	10	3,88 ^{ef}	0,13 ^d
	G2	20	5,17 ^c	0,20 ^c
	G3	30	4,83 ^{cd}	0,21 ^c
	G4	40	4,31 ^{de}	0,21 ^c
	G5	50	3,13 ^{fg}	0,20 ^c
Fructose	F1	10	2,86 ^{gh}	0,11 ^{de}
	F2	20	2,20 ^{hi}	0,07 ^e
	F3	30	1,77 ⁱ	0,07 ^e
	F4	40	1,75 ⁱ	0,07 ^e
	F5	50	1,68 ⁱ	0,07 ^e

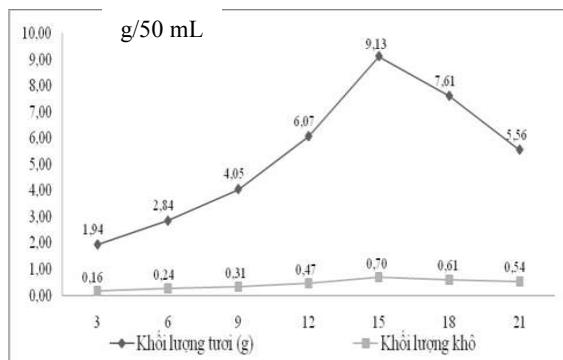
Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... thể hiện sự khác biệt của các kết quả ở cả 2 chỉ tiêu khối lượng tươi và khối lượng khô có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ trong phép thử LSD.

3.5. Xây dựng đường cong tăng trưởng của huyền phù Xạ đen trên môi trường tối ưu.

Môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu thực vật *in vitro*, một môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tăng sinh của huyền phù sẽ tạo tiền đề cho các nghiên cứu về sau. Từ kết quả nghiên cứu này, môi trường khoáng B5 bổ sung 1,5 mg/L NAA và 30 g/L sucrose được chứng minh là môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng của tế bào huyền phù Xạ đen (được kí hiệu là BM), đường cong tăng

trưởng của huyền phù trong môi trường BM được mô tả trong hình 3.

Quan sát đường cong tăng trưởng của huyền phù có thể thấy từ ngày đầu tiên đến ngày thứ 6 là giai đoạn mẫu cấy thích ứng với môi trường nuôi cấy. Từ ngày nuôi cấy thứ 6 đến khoảng ngày thứ 15 các tế bào bước vào phase log, sinh khối tế bào đạt cao nhất được ghi nhận vào ngày thứ 15 (9,13 g khối lượng tươi, 0,70 g khối lượng khô), sau ngày 15 sinh khối tế bào giảm, bên cạnh đó, đường cong tăng trưởng của huyền phù có đỉnh hẹp, điều này cho thấy phase cân bằng của huyền phù rất ngắn, thời gian cấy chuyển mẫu tốt nhất dao động trong khoảng ngày 14 – 15. Từ kết quả này cho thấy, tế bào huyền phù Xạ đen nuôi cấy trong môi trường BM có chu kì thu nhận sinh khối ngắn, chỉ sau 15 ngày nuôi cấy có thể thu được 9,13 g sinh khối tươi từ 50 mL môi trường. Tùy theo các điều kiện nuôi cấy và trạng thái tế bào huyền phù, trên cùng đối tượng tế bào Xạ đen, nghiên cứu của Phạm Thị Mỹ Trâm và cộng sự (2020) cho thấy sinh khối tế bào huyền phù nuôi trong điều kiện tối cho lượng sinh khối cao nhất đạt 149,933 g/L (tương đương 7,49 g/50 mL) sau 4 tuần nuôi cấy, chu kỳ sinh trưởng của các dòng tế bào trong nghiên cứu của Phạm Thị Mỹ Trâm và cộng sự dài hơn so với nghiên cứu này [21].



Hình 3. Đường cong tăng trưởng của sinh khối Xạ đen trong môi trường BM

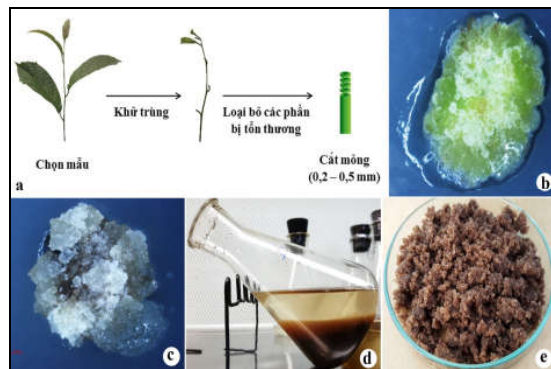
Từ đường cong tăng trưởng ở hình 3 cho thấy, ba mốc thời gian có khối lượng sinh khối cao nhất nằm trong khoảng thời gian từ ngày 12 đến ngày 18, hàm lượng phenolic và rosmarinic acid (RA) tích lũy theo thời gian nuôi cấy được trình bày trong bảng 3.

Kết quả hàm lượng phenolic được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn $y = 0,0045x + 0,0404$ với $R^2 = 0,9984$. Trong ba mốc thời gian được khảo sát, thì ngày nuôi cấy thứ 12 hàm lượng phenolic tích lũy

thu được là thấp nhất (24,68 mg GAE/g mẫu khô) điều này có thể do ngày nuôi cấy thứ 12 vẫn còn trong phase lag, các tế bào đang trong giai đoạn tăng trưởng mạnh, tế bào chủ yếu tổng hợp các hợp chất sơ cấp cần thiết để chuẩn bị cho sự phân chia liên tục nên hàm lượng phenolic tích lũy được thấp hơn ngày 15 và 18. Ở ngày nuôi cấy thứ 15, hàm lượng phenolic thu được đạt cao nhất lên đến 47,74 mg GAE/g mẫu khô.

Bảng 3. Hàm lượng hợp chất thứ cấp tích lũy trong sinh khối Xạ đen trên môi trường BM

Thời gian nuôi cấy (Ngày)	Phenolic (mg GAE/g mẫu khô)	RA (mg/g mẫu khô)
12	24,68	20,36
15	47,74	43,61
18	31,93	24,59



Hình 4. a) Quy trình tạo mẫu cấy tTCL (transverse thin cell layer) từ mẫu cấy thân non cây Xạ đen. b) Mô sẹo Xạ đen trên môi trường MS + 1,5 mg/L NAA. c) Mô sẹo Xạ đen trên môi trường MS + 1,5 mg/L 2,4-D. d) Huyền phù Xạ đen trên môi trường BM ở ngày nuôi cấy thứ 15. e) Sinh khối tươi tế bào huyền phù Xạ đen

Bên cạnh khả năng tích lũy phenolic, nồng độ RA của các mẫu cao chiết cũng được nghiên cứu. Kết quả RA được tính toán theo phương trình đường chuẩn $y = 0,0011x - 0,0073$ với $R^2 = 0,9989$. Kết quả ghi nhận được cho thấy ngày nuôi cấy thứ 15 có hàm lượng RA cao nhất (43,61 mg/g mẫu khô). Nghiên cứu của Bandoniense và cộng sự (2005) khi xác định hàm lượng rosmarinic acid trong lá các loài cây thuộc họ cây xô thơm và cây lưu ly bằng HPLC cho thấy nồng độ của RA nằm trong khoảng từ 13,3 đến 47,3 mg/gam lá khô của tất cả các cây được thử nghiệm. Trong đó *S. glutinosa* và *S. sclarea* có nồng độ RA cao nhất (47,3 và 41,1 mg/g mẫu khô). Kết quả của Xu và cộng sự (2008) trong nuôi cấy tế bào của *Agastache rugosa* cho thấy sản lượng RA cao nhất

(11,5 mg/g) đạt được trong môi trường B5 lỏng bổ sung 2,0 mg/L 2,4-D và 0,1 mg/L BAP ở 10 ngày sau khi nuôi cấy [34]. Kết quả này đã chứng minh sinh khối của tế bào *E. asperula* được nuôi cấy trong BM lỏng vẫn có khả năng tạo ra các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học.

4. KẾT LUẬN

Mô sẹo xốp Xạ đen được tạo từ mẫu cây tTCL thân non xạ đen trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L 2,4-D.

Mô sẹo xốp Xạ đen được nuôi cấy lỏng lác, trong môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L NAA cho kết quả tăng sinh huyền phù tốt nhất.

Môi trường khoáng B5 được xác định là môi trường khoáng thích hợp nhất cho việc nuôi cấy tế bào huyền phù cây Xạ đen.

Nồng độ sucrose 30 g/L là thích hợp nhất cho nuôi cấy tế bào huyền phù Xạ đen.

Từ các kết quả trên, môi trường B5 bổ sung 1,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose được xem là môi trường tối ưu cho nuôi cấy tế bào huyền phù Xạ đen (BM).

Sinh khối tế bào thu nhận có chứa các hợp chất thứ cấp. Kết quả ghi nhận tại điểm cực đại của đường cong tăng trưởng cho thấy hàm lượng phenolic đạt 47,74 mg GAE/g mẫu khô và hàm lượng rosmarinic acid (RA) đạt 43,61 mg/g mẫu khô.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm Quốc gia về Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới đã hỗ trợ trang thiết bị để thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bandoniene D., Murkovic M. and Venskutonis P. R., 2005. Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by High-Performance Liquid Chromatography with different detection methods. *Journal of Chromatographic Science*. 43(7): 372-376.
2. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Trịnh Đôn, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Đinh Văn Khiêm và Phan Xuân Huyền, 2007. Nuôi cấy tế bào và tái tạo mô sẹo từ tế bào huyền phù cây Thông đỏ Himalaya (thông đỏ Lâm Đồng) (*Taxus wallichiana* Zucc.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 5(2): 243-253.

3. Folin O. and Ciocalteu V., 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 73: 627-650.

4. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., 1968. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*. 50: 151.

5. Hua X. Q., Han W., Han Z. Z., Liu Q. X., Xu X. K., Fu P. and Li H. L., 2014. A new macrocyclic lactone and a new quinoflavan from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry Letters*. 7: 169-172.

6. Huang H. C., Shen C. C., Chen C. F., Wu Y. C. and Kuo Y. H., 2000. A novel agarofuran sesquiterpene, celahin D from *Celastrus hindsii* Benth. *Chem Pharm Bull*. 48: 1079-1080.

7. Karwasara V. S. and Dixit V. K., 2013. Culture medium optimization for camptothecin production in cell suspension cultures of *Nothapodytes nimmoniana* (J. Grah.) Mabblerley. *Plant Biotechnol Rep*. 7: 357-369.

8. Kuo Y. H. and Yang-Kuo L. M., 1997. Antitumour and anti-AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*. 44: 1275-1281.

9. Kuo Y. H., Chen C. F. and Yang-Kuo L. M., 1995. Celahinine A, a new sesquiterpene pyridine alkaloid from *Celastrus hindsii*. *Journal of Natural Product*. 58: 1735-1738.

10. Kuo Y. H., Chou C. J., Yang-Kuo L. M., Hu Y. Y., Chen Y. C., Chen C. F. and Lee K. H., 1996. A sesquiterpene ester from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*. 41: 549-551.

11. Lê Kim Cương, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Trịnh Thị Hương và Dương Tấn Nhựt, 2012. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng tăng sinh mô sẹo "xốp" và bước đầu nuôi cấy tế bào huyền phù sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Sinh học*. 34: 265-276.

12. Lee W. L., Chan L. K., 2004. Establishment of *Orthosiphon stamineus* Benth. cell suspension culture for cell growth. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 78: 101-106.

13. Liu X., Yaru Y., Yuyu L., Ting M., Xiaohui W., Yuelin S., Chen Q., Zhao Y., Shepo S. and Tu P., 2018. Cell culture establishment and regulation of two phenylethanoid glycosides accumulation in cell suspension culture of desert plant *Cistanche tubulosa*. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 134: 107-118.

14. Lloyd G. and McCown B., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings, Int Plant Prop Soc.,30: 421-427.
15. Ly T. N., Shimoyamada M. and Yamauchi R., 2006. Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 3786-3793.
16. Mahmood M., R. Normi and S. Subramaniam., 2010. Optimization of suitable auxin application in arecalcitrant woody forest plant of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) for callus induction. African Journal of Biotechnology. 9: 8417-8428.
17. Murashige T. và Skoog F., 1992. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. Physiologia plantarum. 15: 473-497.
18. Nagella P. and Murthy H. N., 2010. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. Bioresource Technology. 101: 6735-6739.
19. Nguyễn Thị Vân Khanh, Triệu Duy Diệt, Nguyễn Văn Minh, Vũ Bình Dương, Nguyễn Tuấn Quang, Lương Quang Anh và Phạm Quốc Long, 2007. Kết quả ban đầu về nghiên cứu cấu trúc hóa học của chất phân lập từ cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.). Hội nghị Khoa học và Công nghệ hóa hữu cơ toàn quốc lần thứ IV. 422-425.
20. Öztürk M., Duru M.E., Ince B., Harmandar M. and Topçu G., 2010. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. Food Chem. 123: 1352-1356.
21. Phạm Thị Mỹ Trâm, Ngô Kế Sương, Lê Thị Thủy Tiên, 2020. Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến quá trình nuôi cấy tế bào xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.). Tạp chí Khoa học - Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên. 129 (1A): 31-41.
22. Rolland F., Baena-Gonzalez E. and Sheen J., 2006. Sugar Sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu Rev Plant Biol. 57:675-709.
23. Rothstein D. E. and Cregg B. M., 2005. Effects of nitrogen form on nutrient uptake and physiology of Fraser fir (*Abies fraseri*). Forest Ecology and Management. 219: 69-80.
24. Schenk R. U. and Hildebrandt A. C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot. 50: 199-204.
25. See K. S., Bhatt A. and Keng C. L., 2010. Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum* (Melastomaceae). Revista de Biologia Tropical. 59(2): 597-606.
26. Singh M. and Chaturvedi R., 2012. Evaluation of nutrient uptake and physical parameters on cell biomass growth and production of spilanthol in suspension cultures of *Spilanthes acmella* Murr. Bioprocess Biosyst Eng. 35: 943-951.
27. Sivanandhan G., Dev G. K., Jeyaraj M., Rajesh M., Muthuselvam M., Selvaraj N., Manickavasagam M. and Ganapathi A., 2013. A promising approach on biomass accumulation and withanolides production in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Protoplasma. 250:885-898.
28. Subhashini P., Raja S. and Thangaradjou T., 2014. Establishment of cell suspension culture protocol for a seagrass (*Halodule pinifolia*) characterization: Growth kinetics and histomorphological. Aquat Bot. 117: 33-40.
29. Trần Thị Mỹ Trâm, Trịnh Thị Hương, Lê Quỳnh Loan, Nguyễn Hoàng Dũng, Trần Trọng Tuấn, 2018. Khảo sát sự sinh trưởng, khả năng kháng oxy hóa và hàm lượng phenolic của cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.) *in vitro* dưới tác động của đèn led. Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm. 16 (1): 38-48.
30. Tran Trong Tuan, Nguyen Thi Kim Loan, Pham Thi Thanh Thuy, Nguyen Thi Thu Hang, Nguyen Thi Huyen Trang, Nguyen Vo Thu Thao, Do Dang Giap, Nguyen Truong Giang, Nguyen Huu Ho, 2016. Quantitative rosmarinic acid content in *ex vitro* plant and initial micropropagation of (*Celastrus hindsii* Benth.). Journal of Biotechnology 14(1A): 283-290.

31. Vũ Quang Nam, Bùi Văn Thắng, Nguyễn Thị Thơ, 2013. Nhân giống cây Xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.) bằng phương pháp nuôi cấy mô. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp. 2: 11-16.
32. Wang K. W., Mao J. S., Tai Y. P., and Pan Y. J., 2006. Nine 1 skeleton terpenes from *Celastrus hypoleucus* with anti-tumor activities. Bioorg Med Chem Lett, 16: 2274.
33. Wang Y. and Weathers P. J., 2007. Sugars proportionately affect artemisinin production. Plant Cell Rep. 26:1073-1081.
34. Xu H., Kim Y. K., Jin X., Lee S. Y. and Park S. U., 2008. Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. J Med Plants Res. 2(9): 237-241.
35. Zhang Y. H., Lu Y. Y., He C. Y. and Gao S. F., 2018. A method for cell suspension culture and plant regeneration of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. Plant Cell Tiss Org Cult. 136: 313-322

EFFECT OF NAA, MEDIUM AND CARBOHYDRATE ON THE PROCESS OF *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. CELL SUSPENSION CULTURE

**Nguyen Vo Thu Thao, Do Duc Thang, Nguyen Thi Huyen Trang,
Do Dang Giap, Nguyen Hoang Dung,
Trinh Thi Huong, Tran Trong Tuan**

Summary

Ehretia asperula is a precious medicine that has long been used in traditional medicine, modern studies have shown that *E. asperula* contains many secondary compounds with important biological activity. Cell suspension culture is an effective method for biomass and secondary compound production. In this study, the role of NAA, mineral medium, and carbohydrate source in the growth of the cell suspension was also studied. The results showed that the young stem (TCL) explants induced friable callus in the MS medium supplemented with 2.4 D which suitable as materials for cell suspension culture. This callus was cultured in liquid MS medium supplemented with NAA (0.5 - 2.0 mg/L) under shake condition, after 15 days of cultured the best growth curve was in MS medium supplemented with 1.5 mg/L NAA. Also, different types of mineral medium and sources of carbohydrate are investigated to determine the best condition for the growth of Xa den cell suspension. After 15 days of cultured, the results showed that B5 medium supplemented with 30 g/L sucrose was the best for culturing *E. asperula* cell suspension. From the above results, the B5 medium supplemented with 1.5 mg/L NAA and 30 g/L sucrose was considered to be the optimal medium for the culture of Xa den (BM) cell suspension. The biomass obtained on BM medium was determined to contain secondary compounds, the content of these compounds changes with culture time. Recorded at the maximum point of the growth curve showed that the phenolic content was 47.74 mg GAE/g DW and the rosmarinic acid (RA) content was 43.61 mg/g DW.

Keywords: *Acid rosmarinic, B5 medium, cell suspension, Ehretia asperula, phenolic.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 5/02/2021

Ngày thông qua phản biện: 5/3/2021

Ngày duyệt đăng: 12/3/2021