

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG ĐẾN QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY TẾ BÀO XẠ ĐEN (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.)

Phạm Thị Mỹ Trâm^{1,2*}, Ngô Kế Suong³, Lê Thị Thuý Tiên²

¹ Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn Ôn, Bình Dương, Việt Nam

² Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG Tp. Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, Q. 10, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

³ Viện Sinh học Nhiệt đới, 9/621 Xa lộ Hà Nội, Q. Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Phạm Thị Mỹ Trâm <tramptm@tdmu.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 24-02-2020; Ngày chấp nhận đăng: 27-03-2020)

Tóm tắt. Xạ đen, tên khoa học là *Ehretia asperula* Zoll. et Mor., thuộc họ Vòi voi (Boraginaceae), có nguồn gốc từ các nước Đông Nam Á. Xạ đen thường được dùng để chữa bệnh như u nhọt (kể cả ung bướu), viêm thũng và giải độc. Khảo sát ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng thực vật và nguồn cung cấp carbon lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ mẫu cấy lá của cây xạ đen *in vitro* nhằm tạo nguyên liệu cho các hệ thống nuôi cấy tế bào để cung cấp các hợp chất có giá trị cho ngành dược liệu. Kết quả cho thấy mô sẹo phát triển tốt trên môi trường B5 bổ sung glucose 30 mg/L và 2,4-D 0,4 mg/L kết hợp với BA 0,1 mg/L. Trên môi trường này, mô sẹo có màu vàng xanh, xốp, mịn và tăng sinh nhanh. Mô sẹo chuyển sang màu trắng sữa sau 10 tuần nuôi cấy và được sử dụng làm nguyên liệu cho nuôi cấy huyền phù tế bào. Huyền phù tế bào trong điều kiện tối phát triển tốt hơn ngoài sáng với lượng sinh khối cao nhất đạt được sau 4 tuần nuôi cấy (149,933 g/L).

Từ khóa: *Ehretia asperula* Zoll. et Mor., huyền phù tế bào, mô sẹo, xạ đen

Effects of medium composition on *Xa den* (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.) cell cultures

Pham Thi My Tram^{1,2*}, Ngo Ke Suong³, Le Thi Thuy Tien²

¹ Thu Dau Mot University, 6 Tran Van On St., Thu Dau Mot, Binh Duong, Vietnam

² VNUHCM – University of Technology, 268 Ly Thuong Kiet St., Dist. 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

³ Institute of Tropical Biology, Ho Chi Minh City, 9/621 Hanoi Road., Dist. Thu Duc, Ho Chi Minh City, Vietnam

* Correspondence to Pham Thi My Tram <tramptm@tdmu.edu.vn>

(Received: 24 February 2020; Accepted: 27 March 2020)

Abstract. *Xa den* (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.) belongs to the Boraginaceae family and appears in Southeast Asian countries. *Xa den* is often used to treat diseases such as tumors, emphysema, and detoxification. The effects of plant growth regulators and carbon sources on the formation and proliferation of callus from *Xa den* leaves *in vitro* were studied. The results show that callus proliferates well on the medium supplemented with 30 mg/L glucose, 0.4 mg/L 2,4-D, and 0.1 mg/L BA. In this medium, the callus is yellowish-green, friable, and rapid proliferating. After the first subculture, the callus is milky white and friable after 10 weeks of culture. This callus is used as a material for cell

suspension cultures. Suspension cells grow in the dark better than in the light with the highest biomass after four weeks of culture (149.933 g/L).

Keywords: callus, cell suspension cultures, *Ehretia asperula* Zoll. et Mor., xạ đen

1 Mở đầu

Theo Tổ chức Y tế Thế giới thì khoảng 80% dân số toàn cầu dựa vào y học cổ truyền để chăm sóc sức khỏe, trong đó thuốc dùng để điều trị chủ yếu từ thực vật. Khoảng 25–28% các loại thuốc hiện tại có nguồn gốc từ thực vật bậc cao và hơn 60% thuốc chống ung thư có nguồn gốc trực tiếp hoặc gián tiếp từ thực vật [1] như taxol chiết xuất từ vỏ cây thủy tùng (*Taxus brevifolia*) [2] và vinblastine được bán tổng hợp từ việc nuôi cấy tế bào lá của cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*) để thu nhận hai hợp chất trung gian là catharanthine và vindoline [3].

Xạ đen trước đây được biết đến với tên khoa học là *Celastrus hindsii*. Năm 2009, tên khoa học chính xác của xạ đen được xác định là *Ehretia asperula* Zol. and Mor. thuộc họ Vòi voi (Boraginaceae), mọc hoang trên các vùng núi cao [4]. Theo **Kuo và Kuo**, maytenfolone-A trong cây xạ đen có khả năng gây độc tế bào ung thư gan với ED₅₀ là 2,3 µg/mL và ung thư biểu mô vòm họng với ED₅₀ là 3,8 µg/mL; celasdin-B có khả năng chống HIV nhân rộng trong các tế bào lymphocyte H9 với EC₅₀ là 0,8 µg/mL [5]. Ly và cs. đã phân lập được tám hợp chất chống oxy hóa từ dịch chiết methanol 50% lá xạ đen khô với thành phần chính là acid rosmarinic và acid lithospermic [6]. Nguyễn Huy Cường đã bước đầu thử nghiệm thành công hoạt tính kháng vi khuẩn kiểm định và hoạt tính gây độc tế bào của các chất phân lập được từ cây xạ đen. Kết quả cho thấy lup-20(29)-en-3β,11β-diol ức chế mạnh sự tăng trưởng của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* với IC₅₀ là 3,2 µg/mL [7]. Năm 2016, Ly đã đưa ra quy trình chiết xuất acid rosmarinic từ cao chiết ethanol 50% của lá xạ đen

khô [8]. Theo Trần Thị Mỹ Trâm và cs., trong cao chiết xạ đen có sự hiện diện của các nhóm hợp chất như carbohydrate, protein, amino acid, chất béo, alkaloid, phenol và tannin [9].

Với mục đích bảo tồn và nhân nhanh cây xạ đen, nhiều nghiên cứu nhân giống *in vitro* đã được thực hiện [9-12]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về việc thu nhận sinh khối từ mô sẹo và huyền phù tế bào xạ đen còn hạn chế [13].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến quá trình nuôi cấy tế bào xạ đen nhằm thu nhận sinh khối tế bào để phục vụ cho các nghiên cứu thu nhận hợp chất có hoạt tính sinh học.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Mẫu cấy là lá xạ đen *in vitro* (12 tuần tuổi), màu xanh đậm, có kích thước khoảng 0,5 × 1 cm và được tạo vết cắt trên bề mặt lá.

2.2 Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của BA (benzyl adenine) kết hợp với 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) lên sự hình thành mô sẹo từ lá xạ đen [11]

Mẫu cấy được đặt trên môi trường B5 [14] bổ sung sucrose 30 g/L, BA 0,1 mg/L kết hợp với 2,4-D nồng độ 0,4–3,0 mg/L.

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn cung cấp carbon lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá xạ đen

Mô sẹo từ lá xạ đen hình thành trong môi trường B5 bổ sung BA 0,1 mg/L, 2,4-D 0,4 mg/L và sucrose 30 g/L được cấy chuyển sau mỗi 4 tuần.

Trong thí nghiệm này, mẫu cấy là mô sẹo đã qua một lần cấy chuyên (khối lượng khởi đầu 0,05–0,07 g) được chuyển sang môi trường B5 bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật (CDHSTTV) tương tự môi trường tạo mô sẹo với sự thay đổi nguồn cung cấp carbon (glucose, fructose và sucrose) ở 3 nồng độ khảo sát 20, 30 và 40 g/L.

Khảo sát ảnh hưởng của NAA (Naphthalene acetic acid) lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá xạ đen

Mô sẹo từ lá xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy (khối lượng khởi đầu 0,02–0,05 g) được cấy chuyên sang môi trường B5 bổ sung nguồn carbon thích hợp ở thí nghiệm 2, BA 0,1 mg/L và NAA nồng độ 0,4–5,0 mg/L.

Khảo sát sự hình thành và tăng sinh của mô sẹo từ lá xạ đen theo thời gian

Nhằm theo dõi sự hình thành và tăng sinh của mô sẹo xạ đen, mẫu cấy lá được nuôi trên môi trường B5 bổ sung CDHSTTV và nguồn carbon với loại và nồng độ thích hợp đã được xác định từ các nghiên cứu trước. Mẫu cấy được theo dõi trong 7 tuần và ghi nhận sự tăng trưởng sau mỗi tuần nuôi cấy.

Nuôi cấy huyền phù tế bào xạ đen

Mô sẹo hình thành trên môi trường B5 bổ sung CDHSTTV và nguồn carbon với loại và nồng độ thích hợp sau 5 tuần được cấy chuyên sang môi trường mới. Mô sẹo được dùng làm nguyên liệu nuôi cấy huyền phù tế bào là loại mô sẹo xấp xỉ sau 1 lần cấy chuyên (10 tuần nuôi cấy). Mô sẹo (1 g) được đưa vào bình chứa 30 mL môi trường lỏng có thành phần tương tự môi trường tạo mô sẹo. Hệ thống tế bào được nuôi trên máy lắc vòng với tốc độ lắc 150 vòng/phút ở hai điều kiện tối và sáng. Huyền phù tế bào được nuôi cấy trong 5 tuần và đánh giá sự tăng trưởng sau mỗi tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi trong thí nghiệm

Quá trình nuôi cấy tế bào xạ đen được tiến hành ở 25 ± 2 °C và độ ẩm $70 \pm 2\%$.

Mẫu cấy tạo mô sẹo được đặt trong tối với các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: ngày hình thành, hình thái, tỉ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo, khối lượng tươi và chỉ số tăng trưởng của mô sẹo.

Tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo được xác định theo công thức

$$X(\%) = \frac{a}{A} * 100,$$

trong đó X là tỉ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo (%); a là số mẫu hình thành mô sẹo; A là số mẫu cấy ban đầu [15].

Chỉ số sinh trưởng (GI) được tính theo công thức

$$GI = \frac{W_F - W_I}{W_I},$$

trong đó W_F là khối lượng tươi mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy; W_I là khối lượng tươi mô sẹo ban đầu [15].

Xác định sinh khối tươi của tế bào huyền phù [16]: cân ống eppendorf 1 mL, sau đó dùng pipetman hút 1 mL huyền phù tế bào đã được lắc đều cho vào ống. Huyền phù tế bào được ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 15 phút bằng máy ly tâm (Hermle Z216 MK, Đức). Cân lại ống eppendorf chứa sinh khối tế bào lắng ở đáy sau khi đã hút bỏ phần dịch nổi. Sinh khối tươi của tế bào là độ chênh lệch khối lượng giữa hai lần cân.

Xử lý số liệu

Số liệu là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại, được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV với sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của BA kết hợp với 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo từ lá xạ đen

Sự cảm ứng tạo mô sẹo từ mẫu cấy lá xạ đen được thực hiện bằng việc kết hợp BA 0,1 mg/L và

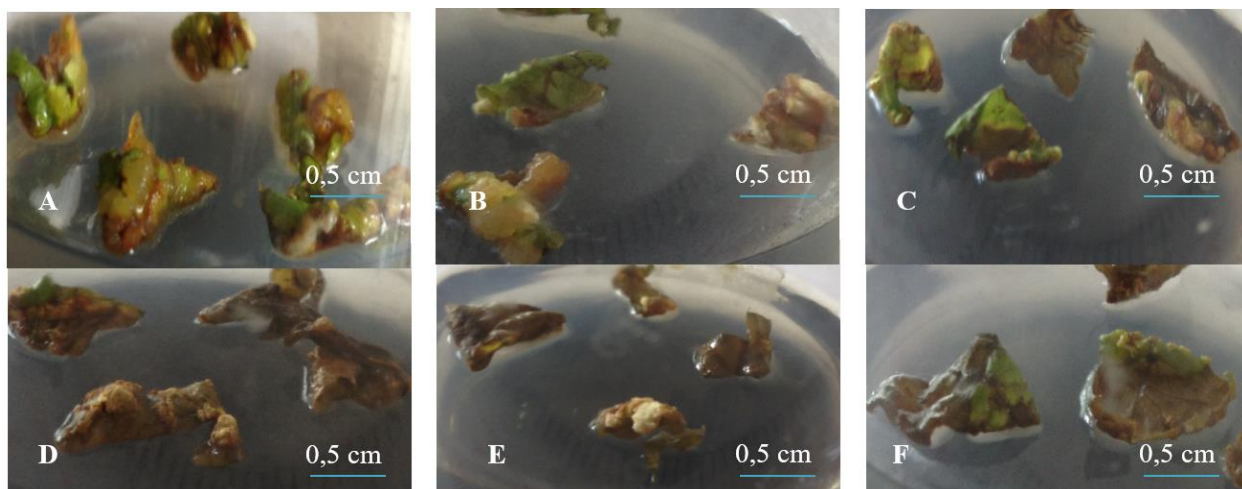
2,4-D ở các nồng độ khác nhau vào môi trường. Sau 1 tuần, hầu hết các mẫu cấy từ lá đều gia tăng kích thước. Tuy nhiên, chỉ có các mẫu cấy trên môi trường có nồng độ 2,4-D từ 0,4 đến 1,5 mg/L mới hình thành các khối mô sẹo nhỏ ở gân lá chính, quanh mép lá và ở vết cắt. Sau 4 tuần, mẫu cấy trên môi trường có BA 0,1 mg/L kết hợp 2,4-D 0,4 mg/L có tỉ lệ tạo mô sẹo cao nhất (85%); khối lượng tươi của mô sẹo cũng cao nhất (0,642 g); mô sẹo có màu

vàng xanh, trong và xốp. Mẫu cấy trên môi trường bổ sung BA 0,1 mg/L và 2,4-D 1,5 mg/L có tỉ lệ hình thành mô sẹo thấp nhất (37%), các sẹo xốp, rất nhỏ xuất hiện ở mép lá và vết cắt. Môi trường có BA 0,1 mg/L kết hợp với 2,4-D nồng độ 2,0–3,0 mg/L không cảm ứng được sự hình thành mô sẹo, tất cả mẫu cấy đều bị đen và chết sau 4 tuần (Bảng 1 và Hình 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA và 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo từ lá xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

CĐHSTTV (mg/L)		Tỉ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo (%)	Khối lượng tươi mô sẹo (g)	Hình thái mô sẹo
BA	2,4-D			
0,1	0,4	85	0,642 ± 0,068 ^b	Vàng xanh, trong, xốp
	1,0	67	0,108 ± 0,019 ^a	Vàng xanh, trong, xốp
	1,5	37	0,031 ± 0,006 ^a	Vàng nhạt, xốp
	2,0	–	–	–
	2,5	–	–	–
	3,0	–	–	–

Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$



Hình 1. Mô sẹo từ lá xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung BA 0,1 mg/L và 2,4-D: (A) 0,4 mg/L; (B) 1,0 mg/L; (C) 1,5 mg/L; (D) 2,0 mg/L; (E) 2,5 mg/L; (F) 3,0 mg/L

Loại và nồng độ CĐHSTTV được sử dụng trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành mô sẹo, cấu trúc và màu sắc của chúng. Trong quá trình tạo mô sẹo, việc bổ sung auxin vào môi trường nuôi cấy là cần thiết. Trong một số trường hợp, cytokinin được thêm vào môi trường nuôi cấy để phối hợp với auxin kích thích sự hình thành và tăng sinh mô sẹo. Cytokinin cần thiết cho sự phân chia tế bào trong mẫu cấy. Khi không có cytokinin, metaphase của chu trình tế bào bị kéo dài vì sự sinh tổng hợp protein bị gián đoạn, do đó có thể ảnh hưởng đến tăng trưởng và phát triển của tế bào [17]. Auxin và cytokinin (như 2,4-D và BA) thường được kết hợp để điều chỉnh quá trình sinh trưởng của mô sẹo [18].

2,4-D là auxin có tác dụng kích thích phân chia tế bào, kéo dài và gia tăng kích thước tế bào nên thường được dùng để gây cảm ứng tạo mô sẹo. Tuy nhiên, ở nồng độ cao, 2,4-D có thể dẫn đến ngăn chặn sự hoạt động bình thường của acid nucleic và sinh tổng hợp protein, do đó tế bào có thể hóa nâu, giảm khả năng sống và chết [19]. Kết quả khảo sát cho thấy môi trường bổ sung nhiều hơn 1,0 mg/L 2,4-D không có tác dụng cảm ứng sự hình thành mô sẹo từ lá xạ đen.

Tương tự, theo Phua và cs., mô sẹo xấp xỉ hình thành từ lá cây cỏ rắn *Clinacanthus nutans* khi môi trường MS được bổ sung 2,4-D nồng độ dưới 1,0 mg/L. Trong đó, môi trường MS bổ sung 2,4-D 0,5 mg/L tạo mô sẹo tốt nhất với khối lượng tươi trung bình sau 15 tuần nuôi cấy đạt 6,230 g [19]. Le Thi Tam Hong và Tran Van Minh cũng cho thấy việc bổ sung BA 0,1 mg/L và 2,4-D nồng độ dưới 2,5

mg/L vào môi trường MS đã kích thích sự hình thành mô sẹo từ lá của cây xạ đen *in vitro* trong khi môi trường có 2,4-D 3,0 mg/L không cảm ứng được sự hình thành mô sẹo [13].

3.2 Ảnh hưởng của nguồn cung cấp carbon lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá xạ đen

Đường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* với vai trò vừa là nguồn năng lượng, vừa là chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào; cả hai đều rất quan trọng trong việc cảm ứng hình thành mô sẹo [20]. Ngoài ra, chúng cũng có thể là phân tử tín hiệu và đóng vai trò tương tự CĐHSTTV, giúp điều chỉnh quá trình trao đổi chất, tăng trưởng và phát triển của tế bào bằng sự kích thích biểu hiện hoặc ức chế các gen mã hoá enzyme [21]. Do đó, việc khảo sát nguồn cung cấp carbon và nồng độ thích hợp cần thiết để xác định điều kiện tốt nhất cho sự tăng sinh mô sẹo từ lá xạ đen.

Glucose và sucrose là hai loại đường thường hay sử dụng nhất trong nuôi cấy *in vitro*. Ngoài ra, trong một số thí nghiệm, fructose, maltose, lactose và galactose cũng được sử dụng để cảm ứng sự hình thành và tăng sinh mô sẹo [17]. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy các loại đường với nồng độ khác nhau đã ảnh hưởng khác biệt đến sự tăng sinh của mô sẹo. Môi trường chứa glucose 30 g/L giúp mô sẹo tăng sinh nhanh với sự gia tăng sinh khối cao nhất sau 4 tuần (0,139 g) và chỉ số tăng trưởng đạt 2,109. Tiếp theo là môi trường có sucrose nồng độ 20 và 30 g/L với sự gia tăng khối lượng mô sẹo là 0,120 và 0,111 g. Trong khi đó, môi trường có fructose và sucrose 40 g/L đã làm giảm đáng kể sự tăng sinh của mô sẹo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sự tăng sinh mô sẹo từ lá xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Loại đường	Nồng độ (g/L)	Sự gia tăng khối lượng tươi mô sẹo (g)	GI
Fructose	20	0,043 ± 0,025 ^{ab}	0,928 ± 0,540 ^{abc}
	30	0,056 ± 0,010 ^{abc}	1,140 ± 0,223 ^{abcd}
	40	0,039 ± 0,026 ^a	0,689 ± 0,484 ^a

Loại đường	Nồng độ (g/L)	Sự gia tăng khối lượng tươi mô sẹo (g)	GI
Glucose	20	0,090 ± 0,042 ^{bcd}	1,724 ± 0,773 ^{bcd}
	30	0,139 ± 0,014 ^e	2,109 ± 0,370 ^d
	40	0,098 ± 0,042 ^{cde}	1,904 ± 0,933 ^{cd}
Sucrose	20	0,120 ± 0,028 ^{de}	1,805 ± 0,490 ^{bcd}
	30	0,111 ± 0,003 ^{de}	1,913 ± 0,494 ^{cd}
	40	0,037 ± 0,031 ^a	0,863 ± 0,725 ^{ab}

Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$.

Trejgell và cs. đã nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon (sucrose, fructose, glucose, mannose hoặc sorbitol, được khử trùng bằng nồi hấp hoặc lọc vô trùng) để cảm ứng tạo mô sẹo từ nụ hoa, lá mầm và trụ hạ diệp của cây bìm bìm biếc *Pharbitis nil*. Khảo sát này cho thấy việc bổ sung glucose hấp khử trùng đã kích thích sự tạo mô sẹo ở nụ hoa và lá mầm. Theo các tác giả, cách khử trùng đường bổ sung là một trong những yếu tố có ảnh hưởng quan trọng đến sự hình thành mô sẹo, đặc biệt trong trường hợp fructose. Tác dụng kích thích tạo mô sẹo của fructose chỉ thể hiện khi được lọc vô trùng [22]. Theo Sumaryono và cs., việc sử dụng fructose sau khi hấp tiệt trùng có thể hạn chế sự tăng sinh của tế bào do ở nhiệt độ cao nó giải phóng ra chất độc (5-hydroxymethyl-2-furaldehyd) làm tăng tình trạng mất nước của tế bào [23].

3.3 Ảnh hưởng của NAA lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá xạ đen

Nhằm thay thế 2,4-D, môi trường B5 bổ sung NAA với các nồng độ khác nhau được sử dụng để khảo sát sự tăng sinh mô sẹo nuôi cấy *in vitro*.

Auxin cần thiết cho việc tạo rễ và mô sẹo từ mẫu cấy; chúng có khả năng thay đổi chương trình di truyền sinh lý học sẵn có của tế bào thực vật. Naphthalene acetic acid thường được sử dụng với nồng độ thấp để kích thích sự phân chia và tăng trưởng tế bào, khả năng đậu trái và hình thành rễ [24]. Trong thí nghiệm này, các mẫu khảo sát có sự gia tăng khối lượng từ 0,102 đến 0,157 g sau 4 tuần nuôi cấy. Trong đó, môi trường bổ sung NAA 0,4 và 1,0 mg/L có sự gia tăng khối lượng mô sẹo cao hơn so với các môi trường chứa NAA khác. Riêng ở nghiệm thức đối chứng (môi trường có bổ sung BA 0,1 mg/L và 2,4-D 0,4 mg/L), mô sẹo có khối lượng tăng cao nhất (0,282 g) với chỉ số tăng trưởng 12,373 (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Sự gia tăng khối lượng tươi mô sẹo (g)	GI
0,1	Đối chứng	0,282 ± 0,058 ^c	12,373 ± 2,722 ^a
	0,4	0,157 ± 0,039 ^b	2,944 ± 0,656 ^b
	1,0	0,148 ± 0,045 ^{ab}	3,645 ± 0,708 ^b
	2,0	0,105 ± 0,027 ^{ab}	3,300 ± 1,070 ^b

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Sự gia tăng khối lượng tươi mô sẹo (g)	GI
	3,0	0,084 ± 0,008 ^a	2,526 ± 0,653 ^b
	4,0	0,106 ± 0,053 ^{ab}	3,532 ± 1,985 ^b
	5,0	0,102 ± 0,022 ^{ab}	4,110 ± 1,840 ^b

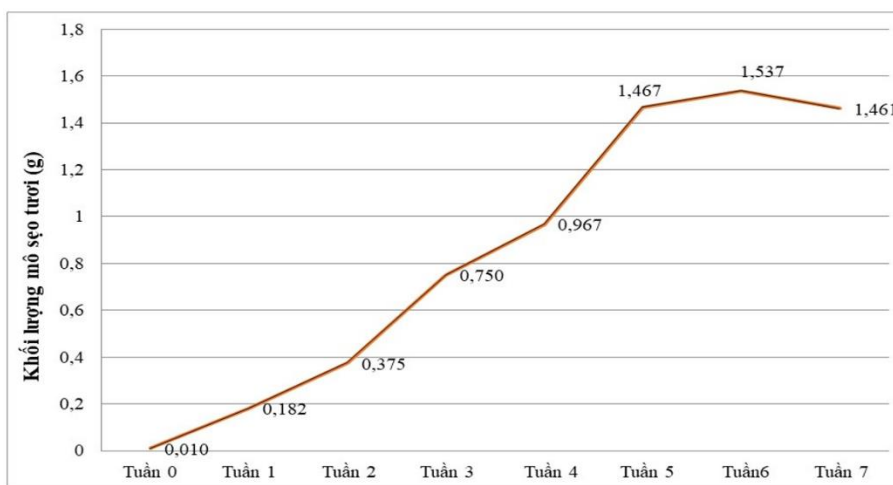
Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$.

Sự đáp ứng của tế bào thực vật với auxin để phân chia tạo mô sẹo cũng như sự tăng sinh và hình thái của mô sẹo phụ thuộc rất nhiều vào loại auxin sử dụng. Theo Bhagya và Chandrashekar, mẫu cấy từ đoạn thân non cây sâm nam *Cyclea peltata* Lam. trên môi trường MS bổ sung NAA riêng rẽ hoặc NAA kết hợp BA/KIN (Kinetin) đều hình thành mô sẹo cứng trong khi sử dụng 2,4-D riêng rẽ hoặc 2,4-D kết hợp BA/KIN đều hình thành mô sẹo xốp [25]. Trong khi đó, Nguyễn Hữu Nhân và cs. lại cho thấy mô sẹo của cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung NAA riêng rẽ hoặc NAA kết hợp KIN tăng sinh tốt hơn so với môi trường bổ sung 2,4-D riêng rẽ hoặc kết hợp KIN [26].

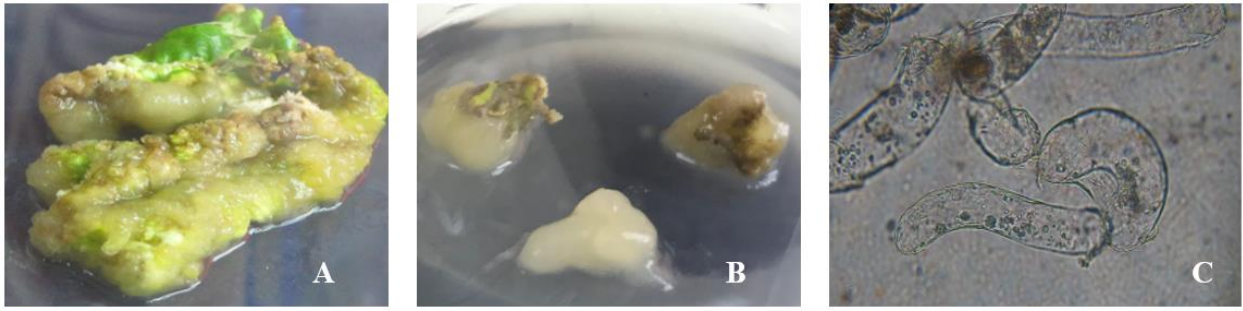
3.4 Khảo sát sự tăng sinh của mô sẹo từ lá xạ đen theo thời gian

Mẫu cấy lá xạ đen được đặt trên môi trường B5 bổ sung 2,4-D 0,4 mg/L, BA 0,1 mg/L và glucose 30 g/L để theo dõi sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo theo thời gian (Hình 2)

Sau một tuần nuôi cấy, mẫu lá bắt đầu gia tăng kích thước và mô sẹo nhỏ xuất hiện xung quanh mép lá, chỗ vết cắt và gân lá chính. Sang tuần thứ 2, mô sẹo đã xuất hiện nhiều hơn trên bề mặt lá, mô sẹo xốp xuất hiện ở tuần thứ 3 và gia tăng kích thước. Đến tuần thứ 5, sự sinh trưởng của mô sẹo chuyển sang giai đoạn ổn định với sự gia tăng sinh khối thấp hơn rất nhiều so với thời gian trước đó. Ở thời điểm này, mô sẹo xốp, mọng nước và có màu vàng xanh phát triển trên toàn bề mặt mẫu cấy. Tuy nhiên, ở tuần thứ 6, trên mô sẹo bắt đầu xuất hiện những đốm nâu. Đến tuần thứ 7 thì sinh khối mô sẹo bắt đầu giảm và chuyển sang màu vàng với nhiều vết đen.



Hình 2. Sự tăng trưởng của mô sẹo xạ đen theo thời gian



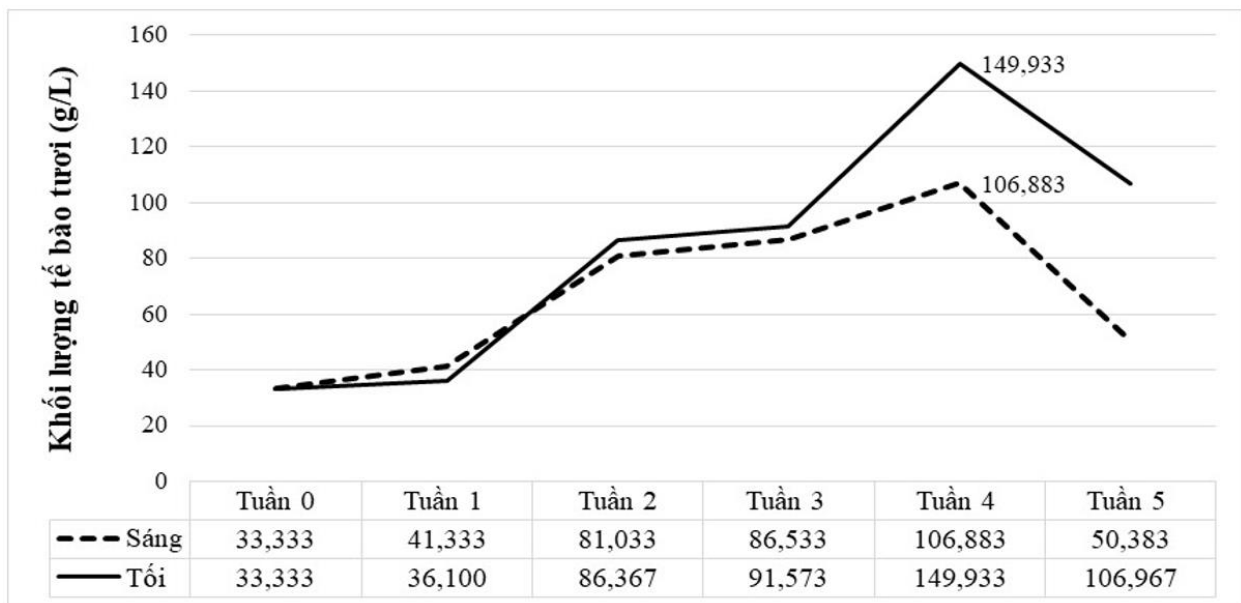
Hình 3. Mô sẹo lá xạ đen nuôi cấy *in vitro*: (A) sau 5 tuần; (B) 1 lần cấy chuyển (10 tuần); (C) dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 40

Như vậy, dựa vào sự tăng sinh của mô sẹo xạ đen theo thời gian, mô sẹo nên được cấy chuyển sau tuần thứ 5 của quá trình nuôi cấy (Hình 2 và 3A). Sau một lần cấy chuyển (10 tuần), mô sẹo có màu trắng sữa hoặc vàng nhạt, mỏng nước, mềm, mịn và rất dễ vỡ (Hình 3B). Mô sẹo sau 10 tuần nuôi cấy dưới kính hiển vi (Hình 3C) gồm các tế bào dài, rời nhau.

3.5 Sự tạo huyền phù tế bào xạ đen

Việc nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật cần thiết cho quá trình nhân giống cây trồng *in vitro*, sản xuất sinh khối tế bào ở quy mô công nghiệp để thu nhận các chất có hoạt tính sinh học. Kết quả khảo sát sự tăng trưởng của huyền phù tế bào ở điều kiện sáng và tối được trình bày trên Hình 4.

Sau tuần nuôi cấy đầu tiên trong môi trường lỏng, mô sẹo bắt đầu phóng thích tế bào và cụm nhỏ tế bào vào môi trường nuôi cấy. Sự gia tăng sinh khối diễn ra chậm. Từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 4, tế bào bước sang giai đoạn phân chia và tăng nhanh sinh khối. Sinh khối tế bào cao nhất được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy ở cả hai điều kiện sáng và tối với các tế bào nhỏ, mịn, phân tán đều trong môi trường (Hình 5). Sau đó, sự sinh trưởng của tế bào giảm đáng kể ở tuần thứ 5, tế bào bước sang giai đoạn suy yếu và chết nếu không được cấy chuyển sang môi trường mới. Vì vậy, tuần thứ 4 của quá trình nuôi cấy là thời điểm thích hợp cho việc cấy chuyển huyền phù tế bào xạ đen.



Hình 4. Sự tăng trưởng của huyền phù tế bào xạ đen theo thời gian



Hình 5. Huyền phù tế bào xạ đen

Kết quả ghi nhận trên đây cũng cho thấy huyền phù tế bào tăng sinh ở trong tối mạnh hơn ngoài sáng. Cụ thể, ở tuần thứ 4, sinh khối tế bào ở trong tối đạt 149,933 g/L trong khi ở ngoài sáng chỉ đạt 106,883 g/L.

Ánh sáng ảnh hưởng mạnh đến sự tăng trưởng ở thực vật. Một hoặc nhiều chất cần thiết cho sự phân chia tế bào có thể bị giảm hàm lượng do tiếp xúc với ánh sáng [27]. Ngoài ra, ánh sáng có thể ngăn chặn sự hoạt động của các enzyme liên quan đến sự tăng trưởng tế bào [28]. Năm 2017, Mir và cs. đã khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự gia tăng sinh khối khi nuôi cấy huyền phù tế bào cây *Artemisia amygdalina* Decne. Các tác giả ghi nhận sinh khối tế bào đạt cao nhất ở ngày thứ 35 của giai đoạn ổn định khi huyền phù tế bào được nuôi trong tối [29].

4 Kết luận

Sau quá trình thí nghiệm, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Môi trường B5 bổ sung glucose 30 g/L, BA 0,1 mg/L và 2,4-D 0,4 mg/L thích hợp cho nuôi cấy mô sẹo từ lá xạ đen *in vitro*. Mô sẹo sau 5 tuần nuôi cấy có màu vàng xanh, xốp.

Sau 10 tuần nuôi cấy, mô sẹo có màu trắng sữa hoặc vàng nhạt, mềm, mịn và dễ vỡ, được sử dụng để nuôi cấy huyền phù tế bào.

- Huyền phù tế bào phát triển tốt trong điều kiện tối với các tế bào nhỏ mịn, phân tán đều trong môi trường lỏng. Sinh khối tế bào gia tăng cao nhất ở tuần thứ 4 của quá trình nuôi cấy với khối lượng tế bào tươi đạt 149,933 g/L.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trường ĐH Bách Khoa, Tp. HCM và Trường Đại học Thủ Dầu Một đã tạo điều kiện về cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Pant B. Application of plant cell and tissue culture for the production of phytochemicals in medicinal plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2014;808:25-39.
2. Subedi T. Phytochemical studies of *Taxus* species and their uses in cancer treatment. *Janapriya Journal of Interdisciplinary Studies*. 2017;6:160-71.
3. Ramani S, Jayabaskaran C. Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *Journal of Molecular Signaling*. 2008;3(9):1-6.
4. Hoa HQ, Khánh TC. Đặc điểm thực vật của ba loại cây thuốc thuộc chi Cùm rậm (*Ehretia* P. BR.), họ Vòi voi (Boraginaceae). *Tạp chí Dược liệu*. 2009;14(3):137-41.
5. Kuo YH, Kuo LMY. Antitumour and anti_AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*. 1997;44(7):1275-81.
6. Ly TN, Shimoyamada M, Yamauchi R. Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. *Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54(11):3786-93.
7. Cường NH. Nghiên cứu thành phần hóa học và thăm dò hoạt tính sinh học cây xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth. and Hook.) và cây cùm rậm răng

- (*Ehretia dentata* Courch.) [Luận án]. [Hà Nội: VN]: Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam; 2008.
8. Ly TN. Separation process of rosmarinic acid and their derivatives from *Celastrus hindsii* Benth leaves. *Journal of Science and Technology*. 2016;54(2C):380-7.
 9. Trâm TTM, Hương TT, Loan LQ, Dũng NH, Tuấn TT. Khảo sát sự sinh trưởng, khả năng kháng oxy hoá và hàm lượng phenolic của cây xạ đen *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi *in vitro* dưới tác động của đèn led. *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm*. 2018;16(1):38-48.
 10. Anh TNT, Thu NTB. Nghiên cứu nhân nhanh cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. et Mor. *Tạp chí Dược liệu*. 2012;17(4):244-8.
 11. Tiên LTT, Minh TV. Tissue cultures of xa đen *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi. *An Giang University Journal of Science*. 2015;3(3):113-23.
 12. Tuan TT, Loan NTK, Thuy PTT, Hang NTT, Trang NTH, et al. Quantitative rosmarinic acid content in *ex vitro* plant and initial micropropagation of *Celastrus hindsii*. *Vietnamese Journal of Biotechnology*, 2016;14(1A): 283-90.
 13. LTT Hong, Minh TV. Saponin accumulation in cell suspension culture of *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi. In: 8th International Conference on Advances in Civil, Structural and Environmental Engineering - ACSEE; 2019 January 12–13; Kuala Lumpur, Malaysia. New York (USA): Institute of Research Engineers and Doctors; 2019. p. 21-25.
 14. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 1986;50:151-8.
 15. Sahraroo A, Babalar M, Mirjalili MH, Fattahi Moghaddam MR, Nejad Ebrahimi S. *In vitro* callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2014;13(4):1447-1456.
 16. Cương LK, Chiến HX, Nam NB, Hương TT, Nhật DT. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng tăng sinh mô sẹo "xốp" và bước đầu nuôi cấy huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Sinh học*. 2012;34(3):265-276.
 17. Lượng NĐ, Tiên LTT. Công nghệ tế bào. Hồ Chí Minh: Nhà xuất bản Đại học Quốc gia; 2006. tr.376.
 18. Benítez-García I, Emilio Vanegas-Espinoza P, Meléndez-Martínez AJ, Heredia FJ, Paredes-López, O, Del Villar-Martínez AA. Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2014;17(3):107-13.
 19. Phua QY, Chin CK, Asri ZRM, Lam DYA. The calligenic effects of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) on leaf explants of sabah snake grass (*Clinacanthus nutans*). *Pakistan Journal of Botany*. 2016;48(2):561-566.
 20. André SB, Mongomaké K, Modeste KK, Edmond KK, Tchoa K, Hilaire KT, Justin KY. Effects of plant growth regulators and carbohydrates on callus induction and proliferation from leaf explant of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 2015;8(2):118-27.
 21. Ilczuk A, Jagieo-Kubiec K, Jacygrad E. The effect of carbon source in culture medium on micropropagation of common ninebark (*Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim.) 'Diable D'or'. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 2013;12(3):23-33.
 22. Trejgell A, Jarkiewicz M, Tretyn A. The effect of carbon source on callus induction and regeneration ability in *Pharbitis nil*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2006;28(6):619-26.
 23. Sumaryono, Muslihatin W, Ratnatnadewwi D. Effect of carbohydrate source on growth and performance of *in vitro* sago palm (*Metroxylon sago* Rottb.) plantlets. *Hayati Journal of Biosciences*. 2012;19(2):88-92
 24. Yan YH, Li JL, Zhang XQ, Yang WY, Ma YM, Zhu YQ, et al. Effect of naphthalene acetic acid on adventitious root development and associated physiological changes in stem cutting of *Hemarthria compressa*. *PLoS One*. 2014;9(3):1-6.
 25. Bhagya N, Chandrashekar KR. Effect of growth regulators on callus induction from *Cyclea peltata* (lam.) Hook. f. Thoms. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013;6(4):85-88.
 26. Nhân NH, Quảng HT, Lộc NH. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*. 2019;128(1E):69-76.
 27. Yeoman MM, Davidson AW. Effect of light on cell division in developing callus cultures. *Annals of Botany*. 1971;35:1085-100.
 28. Tiên LTT, Việt BT, Lượng NĐ. 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. 2010;13(3):67-77.
29. Mir MY, Kamili AN, Hassan OP, Tyub S. Effect of light and dark conditions on biomass accumulation and secondary metabolite production in suspension cultures of *Artemisia amygdalina* Decne. Journal of Himalayan Ecology and Sustainable Development. 2017;12:107-112.