

**ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGUYỄN HỮU NHÂN

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHẤT KÍCH
KHÁNG LÊN SỰ TÍCH LŨY EURYCOMANONE TRONG
NUÔI CÂY HUYỀN PHÙ TÊ BÀO
CÂY BÁCH BỆNH (*Eurycoma longifolia* Jack)**

**Ngành: SINH LÝ HỌC THỰC VẬT
Mã số: 9420112**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

**Người hướng dẫn khoa học:
GS.TS. NGUYỄN HOÀNG LỘC**

HUẾ - 2021

Công trình được hoàn thành tại:

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Người hướng dẫn khoa học: **GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc**

Phản biện 1: **PGS.TS. Trần Thanh Hương**

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG TP. Hồ Chí Minh

Phản biện 2: **PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm**

Trường Đại học Sư Phạm, Đại học Thái Nguyên

Phản biện 3: **PGS.TS. Trần Thị Lệ**

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế
tại Thành phố Huế

Vào hồigiờngày tháng năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

Thư viện Quốc gia Việt Nam

Thư viện Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) thuộc chi *Eurycoma*, họ Simaroubaceae là một trong những loài thảo dược nhiệt đới phổ biến, có nguồn gốc ở các nước Đông Nam Á như Malaysia, Indonesia và Việt Nam. Dịch chiết của cây này, đặc biệt là từ rễ, được sử dụng để tăng cường testosterone ở nam giới. Dịch chiết được sử dụng như phương thuốc dân gian của người bản địa để kháng khuẩn, hạ sốt, chống viêm, gây độc tế bào và kích thích tính dục.

Eurycomanone là chất đặc trưng của cây bách bệnh, có hoạt tính chính trong tăng cường sinh lý ở nam giới, cảm ứng quá trình apoptosis ở tế bào ung thư,... Gần đây, nhu cầu về loại thảo dược này tăng rất nhanh, vì vậy, việc trồng ở quy mô lớn loại dược liệu này mới có thể đáp ứng được nhu cầu lớn hiện nay. Tuy nhiên, cây bách bệnh sinh trưởng chậm, cây trưởng thành cần tới 5 năm mới thu hoạch. Do đó, nuôi cấy *in vitro* cây bách bệnh để sản xuất hợp chất thứ cấp thay thế cho nguồn nguyên liệu tự nhiên là cần thiết.

Chất kích kháng là những chất hóa học được dùng để tác động vào con đường chuyển hóa thứ cấp nhằm tăng cường sinh tổng hợp các chất có giá trị dược phẩm trong nuôi cấy tế bào thực vật. Theo Abraham và cs (2011), dịch chiết nấm men đã được ứng dụng trong nuôi cấy *in vitro* thực vật do khả năng kích thích cơ chế bảo vệ, tăng sản sinh các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học. Salicylic acid được xem là một trong những tín hiệu quan trọng trong phản ứng tự vệ của cây và cũng được sử dụng rộng rãi trong sản xuất các chất chuyển hóa từ nuôi cấy tế bào thực vật. Methyl jasmonate cũng đã được chứng minh là một chất đóng vai trò quan trọng trong việc truyền tín hiệu điều chỉnh khả năng phòng vệ của thực vật và có thể kích thích sự sản sinh các chất chuyển hóa thứ cấp trong nuôi cấy tế bào.

Do đó, việc sử dụng chất kích kháng thực vật trong sản xuất eurycomanone từ cây bách bệnh thông qua nuôi cấy huyền phù tế bào hứa hẹn sẽ mang lại hiệu quả cao. Vì vậy, nghiên cứu ứng dụng nuôi

cấy tế bào cây bách bệnh để thu một lượng sinh khối lớn, có khả năng tích lũy cao các hợp chất có hoạt tính sinh học nhằm chủ động nguồn nguyên liệu, đảm bảo cho việc tách chiết các dược chất là có ý nghĩa lớn về mặt khoa học và thực tiễn. Xuất phát từ cơ sở trên, chúng tôi thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất kích kháng lên sự tích lũy eurycomanone trong nuôi cấy huyền phù tế bào cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack)”**

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Xác định loại chất kích kháng, nồng độ và thời gian xử lý thích hợp để sản xuất eurycomanone với hàm lượng cao nhất từ huyền phù tế bào cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack).

3. NỘI DUNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Nội dung nghiên cứu

- Sản xuất sinh khối tế bào cây Bách bệnh và khảo sát quá trình tích lũy eurycomanone trong tế bào;

- + Nghiên cứu khả năng sinh trưởng của callus và tế bào huyền phù cây bách bệnh;

- + Xây dựng đường cong sinh trưởng và đường cong tích lũy của tế bào huyền phù;

- + Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào huyền phù.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý các chất kích kháng: salicylic acid, methyl jasmonate, dịch chiết nấm men lên khả năng sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào huyền phù.

Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên callus của cây bách bệnh, sử dụng 03 chất kích kháng: salicylic acid, methyl jasmonate, dịch chiết nấm men, các nghiên cứu được tiến hành trong phạm vi phòng thí nghiệm.

4. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Luận án có các đóng góp mới như sau:

Đây là công trình đầu tiên sử dụng các chất kích kháng (methyl jasmonate, salicylic acid và dịch chiết nấm men) để nghiên cứu cải

thiện khả năng tích lũy eurycomanone của tế bào huyền phù cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack).

Luận án đã tìm ra được môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của callus cây bách bệnh, đó là môi trường cơ bản MS có bổ sung 1,25 mg/L NAA và 1,00 mg/L KIN, callus sinh trưởng mạnh với chỉ số sinh trưởng đạt 10,07; đã tìm ra điều kiện nuôi cấy thích hợp cho tế bào huyền phù là môi trường MS lỏng có bổ sung 1,25 mg/L NAA và 1,00 mg/L KIN, nguồn carbon là 3% sucrose.

Nghiên cứu cũng đã xác định được methyl jasmonate ở nồng độ 0,02 mM, bổ sung sau 4 ngày nuôi cấy cho hiệu quả tích lũy eurycomanone cao nhất sau 14 ngày nuôi cấy, cao hơn 10 lần so với mẫu đối chứng là tế bào không xử lý chất kích kháng và khoảng 8 lần so với mẫu tự nhiên.

5. CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án được trình bày trong 109 trang A4. Trong đó, phần Mở đầu 5 trang, phần Tổng quan tài liệu 35 trang, phần Đối tượng và Phương pháp nghiên cứu 7 trang, phần Kết quả nghiên cứu 21 trang, phần Bàn luận 17 trang, Kết luận và Kiến nghị 1 trang, Danh mục các công trình công bố 1 trang, Tài liệu tham khảo 19 trang, phần Phụ lục 3 trang. Luận án có 150 tài liệu tham khảo, trong đó có 137 tài liệu tiếng Anh. Phần kết quả nghiên cứu có 12 bảng và 12 hình.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. GIỚI THIỆU CÂY BÁCH BỆNH

Bách bệnh là cây thảo mộc, thường xanh, sinh trưởng chậm, là cây bụi hoặc cây gỗ nhỏ, chiều cao tối đa 15-18 m và ra quả sau 2-3 năm nuôi trồng. Tuy nhiên, để cây tích lũy các hợp chất sinh học tốt nhất có thể mất đến 25 năm, nhưng vì mục đích thương mại, hầu như rễ của cây được thu hoạch sau 4-5 năm. Hầu như tất cả các bộ phận của cây được sử dụng trong các phương thuốc dân gian. Dịch chiết của rễ được sử dụng để phục hồi năng lượng và sinh lực, tăng cường lưu

thông máu, và được bổ sung vào thành phần thảo dược cho phụ nữ sau khi sinh. Lá của nó được sử dụng bởi các thầy thuốc địa phương để điều trị sốt rét, khối u, bệnh về nướu răng, ngoài ra chúng còn được chữa một số bệnh lây qua đường tình dục như giang mai, lậu. Thành phần hoạt chất chính của cây bách bệnh là quassinoid. Quassinoid là một nhóm triterpenoid giảm cấp giàu oxy, phân bố chủ yếu trong họ *Simaroubaceae*.

1.2. HỢP CHẤT THỨ CẤP THỰC VẬT

Ở thực vật, có nhiều loại hợp chất hữu cơ hoặc các chất chuyển hóa được tạo ra trong quá trình trao đổi chất. Các hợp chất thứ cấp của thực vật thường được tổng hợp từ các sản phẩm của quang hợp như: alkaloid được tổng hợp từ các amino acid; các hợp chất như steroid, terpenoid và cardiac glycoside được tổng hợp từ acetic acid; các chất kháng sinh và vitamin được tổng hợp từ các carbohydrate. Những thành tựu đạt được trong lĩnh vực công nghệ sinh học, đặc biệt là phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật, đã cung cấp một phương thức mới cho quá trình thương mại hóa các chất hóa học có nguồn gốc từ thực vật. Phương pháp này sẽ mở rộng và tăng khả năng thu hồi các hóa chất có giá trị, một sự thay thế từ quy mô nông nghiệp truyền thống lên quy mô công nghiệp trong sản xuất các hợp chất thứ cấp.

1.3. CHẤT KÍCH KHÁNG THỰC VẬT

Chất kích kháng có thể được định nghĩa là một chất hoặc một hỗn hợp các chất mà khi đưa một nồng độ thấp vào hệ thống tế bào sống sẽ khởi đầu hoặc cải thiện sự sinh tổng hợp các hợp chất đặc trưng. Sự kích kháng là quá trình cảm ứng hoặc tăng cường sinh tổng hợp các chất trao đổi do sự thêm vào một lượng nhỏ chất kích kháng.

Chất kích kháng có thể được phân loại dựa vào tính tự nhiên của chúng, gồm chất kích kháng sinh học và phi sinh học hoặc dựa vào nguồn gốc của chúng, gồm chất kích kháng ngoại sinh và nội sinh. Sự tăng cường sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp từ nuôi cấy tế bào thực vật thông qua sự kích kháng đã mở ra một lĩnh vực nghiên cứu mới, mang lại lợi ích kinh tế quan trọng cho ngành dược. Một vài thông số

như tính chọn lọc và nồng độ của chất kích kháng, thời gian kích kháng, thời kỳ kích kháng, dòng tế bào, sự điều hòa sinh trưởng, thành phần dinh dưỡng, chất lượng của nguyên liệu thành tế bào... ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng cường sản phẩm tích lũy.

Jasmonic acid (JA) và methyl jasmonate (MeJA) là các phân tử tín hiệu trong stress sinh học và phi sinh học. Tác dụng rộng rãi của chúng có thể được giải thích bởi trên thực tế các phân tử này hoạt động như các chất kích kháng với phổ rộng các con đường tín hiệu. MeJA và JA đã được chứng minh là có thể kích thích sản xuất một vài hợp chất (alkaloid, terpenoid, phenolic phytoalexin, coumarin và taxane) ở nhiều loài thực vật.

Dịch lọc nuôi cấy nấm, dịch chiết nấm men (YE-Yeast Extract) và xác vi khuẩn có thể gây ra khả năng đáp ứng bảo vệ trong tế bào thực vật. Tuy nhiên, các loại kích kháng này là hỗn hợp phức tạp của nhiều chất hóa học, chỉ một phần trong đó có hiệu quả cảm ứng sự tích lũy các hợp chất đặc trưng.

1.4. GIỚI THIỆU VỀ EURYCOMANONE

Eurycomanone chỉ được tìm thấy duy nhất trong cây bách bệnh, có nhiều nhất ở trong rễ. Đây là hợp chất quassinoid chính trong cây bách bệnh, nó được sử dụng như là chất chỉ thị để đánh giá chất lượng các sản phẩm dược liệu từ cây này. Eurycomanone có một số hoạt tính sinh học như làm tăng sản xuất testosterone ở tinh hoàn chuột, hoạt tính chống thấm (antiulcer activity), gây độc các dòng tế bào ung thư và kháng sốt rét.

Phân tích HPLC các sản phẩm dược liệu ở Malaysia cho thấy eurycomanone xuất hiện trong 58,9% các sản phẩm dược liệu, hàm lượng eurycomanone trong cây bách bệnh khoảng 0,8-1,5% (w/v).

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu là callus được cảm ứng từ rễ cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) *in vitro* trong nghiên cứu của TS. Võ Châu Tuấn. Hạt của cây bách bệnh thu thập tại huyện Đại Lộc, tỉnh Quảng Nam được nuôi cấy tạo cây *in vitro*, sau đó rễ của cây *in vitro* 8 tuần tuổi được sử dụng để cảm ứng tạo callus. Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng nuôi cấy mô và tế bào thực vật, Khoa Sinh-Môi trường, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Môi trường và điều kiện nuôi cấy ban đầu

Môi trường dùng để nuôi cấy là môi trường MS cơ bản (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) khác nhau tùy theo mục đích của từng thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy có nguồn carbon là sucrose 3%, được làm đặc bằng agar 0,8%, pH được điều chỉnh đến 5,8 sau đó được khử trùng ở 121°C (1 atm) trong 20 phút.

2.2.2. Nuôi cấy callus cây bách bệnh

Callus (3 g) được nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng là 2,4-D, NAA và KIN (kinetin) ở các nồng độ khác nhau để khảo sát khả năng tăng sinh của callus cây bách bệnh. Sau 2 tuần nuôi cấy (14 ngày), callus được thu nhận, loại bỏ nước bám bên ngoài callus bằng phương pháp lọc (giấy lọc Whatman No.1) và xác định khối lượng tươi. Sau đó callus được sấy đến khi khối lượng không đổi ở nhiệt độ 50°C, để xác định khối lượng khô. Chỉ số sinh trưởng (GI-growth index) của tế bào được xác định bởi công thức: $GI = W_{14}/W_0$. Trong đó: W_{14} và W_0 là khối lượng tươi của tế bào tại thời điểm đánh giá và thời điểm bắt đầu nuôi cấy.

2.2.3. Nuôi cấy huyền phù tế bào cây bách bệnh

Sau khi đánh giá được môi trường tốt nhất cho sự sinh trưởng của callus, 3 g callus 14 ngày tuổi (tương đương 1,7 g callus sau khi

lọc chân không) có màu vàng nhạt, rời, từ môi trường rắn được nuôi cấy lỏng trong bình tam giác có thể tích 250 mL chứa 50 mL môi trường để nuôi cấy tế bào huyền phù. Công thức môi trường cho callus sinh trưởng tốt nhất được sử dụng để nuôi cấy huyền phù tế bào. Quá trình nuôi cấy được thực hiện với tốc độ lắc 120 vòng/phút. Sinh khối tế bào được thu sau mỗi 2 ngày nuôi cấy cho đến 20 ngày để xây dựng đường cong sinh trưởng và đường cong tích lũy eurycomanone của tế bào.

2.2.4. Xác định sự ảnh hưởng của nguồn carbon lên sự sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của huyền phù tế bào cây bách bệnh

Sau khi xác định được thời gian tích lũy sinh khối và eurycomanone tối ưu, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon khác nhau lên khả năng sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào.

Các nguồn carbon: sucrose, fructose và glucose được bổ sung riêng lẻ vào môi trường nuôi cấy huyền phù tế bào ở các nồng độ khác nhau (mỗi nguồn carbon sử dụng 3 mức nồng độ: 20, 30 và 40 g/L). Sau thời gian nuôi cấy nhất định (đã xác định ở mục 2.2.3), sinh khối tế bào được thu hoạch để xác định khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng eurycomanone tích lũy được.

2.2.5. Xác định sự ảnh hưởng của pH môi trường lên sự sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của huyền phù tế bào cây bách bệnh

Để khảo sát ảnh hưởng của pH lên khả năng sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào, sử dụng môi trường nuôi cấy với nguồn carbon thích hợp nhất (đã xác định ở mục 2.2.4) cho sự sinh trưởng và tích lũy, điều chỉnh giá trị pH của môi trường từ 4,75 đến 6,75 trước khi khử trùng, khoảng chênh lệch pH giữa các môi trường là 0,5. Sau 14 ngày nuôi cấy, sinh khối tế bào được thu hoạch để xác định khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng eurycomanone tích lũy được.

2.2.6. Xử lý chất kích kháng

Xác định ảnh hưởng của nồng độ chất kích kháng lên sự sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của huyền phù tế bào cây bách bệnh

Ảnh hưởng của nồng độ các chất kích kháng được đánh giá bằng cách bổ sung riêng lẻ YE, MeJA và SA vào môi trường với các nồng độ khác nhau tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy (thời điểm kích kháng là 0 ngày). Trong đó, SA và MeJA có nồng độ từ 0,01-1 mM, YE từ 20-250 mg/L. Đối chứng là công thức không bổ sung chất kích kháng. Sau thời gian nuôi cấy nhất định, sinh khối tế bào được thu hoạch để xác định khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng eurycomanone.

Xác định ảnh hưởng của thời điểm kích kháng lên sự sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của huyền phù tế bào cây bách bệnh

Nồng độ của chất kích kháng cho huyền phù tế bào cây bách bệnh sinh trưởng và tích lũy tốt nhất (đã xác định ở trên) được lựa chọn để đánh giá thời điểm kích kháng tối ưu. Chất kích kháng được bổ sung vào môi trường ở thời điểm từ 2 – 12 ngày nuôi cấy (mỗi công thức thí nghiệm cách nhau 2 ngày). Đối chứng là công thức bổ sung chất kích kháng tại thời điểm ban đầu. Sau thời gian nuôi cấy nhất định, tế bào được thu hoạch để xác định khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng eurycomanone.

2.2.7. Chiết xuất eurycomanone

Eurycomanone được chiết xuất theo phương pháp của Mohamad và cs (2013) có điều chỉnh để phù hợp với điều kiện cụ thể của phòng thí nghiệm. Sinh khối khô của tế bào (callus, huyền phù tế bào, rễ cây tự nhiên) được nghiền thành bột mịn, sau đó chiết bằng cách ngâm 0,5 g mẫu trong 10 mL methanol (Merck), lắc 120 vòng/phút ở 60°C trong 8 giờ, sau đó để lắng và thu dịch chiết. Quy trình chiết được lặp lại 3 lần. Dịch chiết (khoảng 30 mL) được lọc qua giấy lọc Whatman (No.1) và cô đặc ở 50°C. Sau đó, kết tủa được hòa tan trong 5 mL methanol, lọc qua màng lọc Minisart 0,2 µm (Sartorius, Goettingen, Đức), để phân tích HPLC nhằm xác định hàm lượng

eurycomanone.

Mẫu callus và huyền phù tế bào được thu hoạch ở các thí nghiệm, mẫu rễ cây khoảng 5 năm tuổi được thu thập ngoài tự nhiên tại huyện Đại Lộc, tỉnh Quảng Nam.

2.2.8. Phân tích HPLC

Hàm lượng eurycomanone được xác định bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo phương pháp của Norhidayah và cs (2015) có điều chỉnh phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. 20 μ L dịch chiết được tiêm vào máy HPLC bằng Hamilton syringe. Điều kiện chạy HPLC ở nhiệt độ phòng, cột C18 (Xbridge: 5 μ m, 4,6 x 250 mm), tốc độ chạy: 0,8 mL/phút, thời gian chạy: 17,5 phút, detector đọc ở bước sóng 245 nm, pha tĩnh là silica gel và pha động là acetonitrile: H₂O (15:85).

Quy trình phân tích HPLC được thực hiện trên máy LC-20 Prominence (Shimadzu, Kyoto, Nhật Bản), với SPD-20A UV-VIS detector, sử dụng phần mềm LC-Solution. Các hóa chất sử dụng để phân tích HPLC được cung cấp bởi hãng Merck & Co.Inc. (Darmstadt, Đức). Đường chuẩn của eurycomanone được sử dụng để xác định hàm lượng eurycomanone chứa trong mẫu phân tích.

Eurycomanone của hãng Santa Cruz (CA, Mỹ) được dùng làm chất chuẩn để xác định hàm lượng eurycomanone. Hàm lượng eurycomanone được xác định dựa theo đường chuẩn được xây dựng từ diện tích peak của các nồng độ eurycomanone chuẩn khác nhau trong phân tích HPLC, phương trình đường chuẩn là $y = 3504672,8353x + 6163,5917$ ($R^2 = 0,9984$), trong đó x là hàm lượng eurycomanone, y là diện tích peak HPLC.

2.2.9. Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần gồm 5 bình nuôi cấy.

Kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA bằng Duncan's test với $p < 0,05$ sử dụng phần mềm SPSS ver 20.0./.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CALLUS

3.1.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ

3.1.1.1. Ảnh hưởng của 2,4-D

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D lên khả năng sinh trưởng của callus

2,4-D (mg/L)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Chỉ số sinh trưởng (GI)	Hình thái callus
0,5	6,56 ^b	0,36 ^b	2,19	Vàng nhạt, mỏng nước
1,0	6,84 ^{ab}	0,39 ^b	2,28	Vàng đậm, rắn, rời rạc
1,5	7,47 ^a	0,48 ^{ab}	2,49	Vàng đậm, mỏng nước
2,0	7,56 ^a	0,55 ^a	2,52	Vàng đậm, mỏng nước
2,5	7,41 ^a	0,42 ^b	2,47	Vàng đậm, mỏng nước

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Khi nuôi cấy callus lên môi trường chỉ có 2,4-D, ở tất cả các nồng độ khảo sát callus đều sinh trưởng tốt, chỉ số sinh trưởng đạt trên 2, khối lượng tươi đạt 6,56-7,56 g/bình (tương ứng với khối lượng khô đạt 0,36-0,55 g/bình). Trong đó, công thức bổ sung 2 mg/L 2,4-D cho kết quả tốt nhất, chỉ số sinh trưởng của callus đạt 2,52, khối lượng tươi và khô lần lượt là 7,56 và 0,55 g/bình (Bảng 3.1).

3.1.1.2. Ảnh hưởng của NAA

Kết quả nghiên cứu cho thấy NAA cho hiệu quả cao nhất ở nồng độ 1,25 mg/L, sinh khối callus từ 3 g nuôi cấy ban đầu đạt đến 23,59 g tươi (tương ứng với 0,93 g khô) với chỉ số sinh trưởng (GI) là 7,8. Trong khi đó, sinh khối tích lũy thấp trên môi trường nuôi cấy có bổ sung từ 2-2,25 mg/L NAA, sinh khối tươi đạt lần lượt là 17,24 và 16,79 g (tương ứng với 0,65 và 0,62 g khô).

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh

NAA (mg/L)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Chỉ số sinh trưởng (GI)	Hình thái callus
0,50	20,47 ^d	0,79 ^c	6,8	Vàng nhạt, mỏng nước
0,75	21,92 ^b	0,88 ^b	7,3	Vàng nhạt, mỏng nước
1,00	21,30 ^c	0,87 ^b	7,1	Vàng đậm, rắn, rời rạc
1,25	23,59 ^a	0,93 ^a	7,8	Vàng đậm, rắn, rời rạc
1,50	18,50 ^e	0,72 ^d	6,2	Vàng đậm, rắn, rời rạc
1,75	18,21 ^e	0,71 ^d	6,1	Vàng đậm, rắn, rời rạc
2,00	17,24 ^f	0,65 ^e	5,7	Vàng nhạt, mỏng nước
2,25	16,79 ^f	0,62 ^f	5,6	Vàng nhạt, mỏng nước

3.1.2. Ảnh hưởng của kết hợp các chất ĐHST

Trong nội dung nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa riêng lẻ, chúng tôi nhận thấy sử dụng NAA có hiệu quả hơn so với 2,4-D, vì thế chúng tôi sử dụng NAA trong thí nghiệm kết hợp với KIN.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của NAA và KIN đến khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh

NAA (mg/l)	KIN (mg/l)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Chỉ số sinh trưởng	Hình thái callus
1,25	0,50	23,43 ^c	0,92 ^c	7,8	Vàng nhạt, mỏng nước
	0,75	30,98 ^{ab}	1,26 ^a	10,3	Vàng nhạt, mỏng nước
	1,00	32,34 ^a	1,31 ^a	10,7	Vàng đậm, rắn, rời rạc
	1,25	28,80 ^b	1,11 ^b	9,6	Vàng đậm, rắn, rời rạc
	1,50	24,65 ^c	0,94 ^c	8,2	Vàng đậm, rắn, rời rạc
	1,75	20,49 ^d	0,79 ^d	6,8	Vàng nhạt, mỏng nước
	2,00	18,70 ^d	0,78 ^d	6,2	Vàng nhạt, mỏng nước

Kết quả kết hợp giữa 1,25 mg/L NAA và KIN cho thấy sinh khối callus đạt cao nhất (30,98-32,34 g tươi/bình, tương ứng với 1,26-

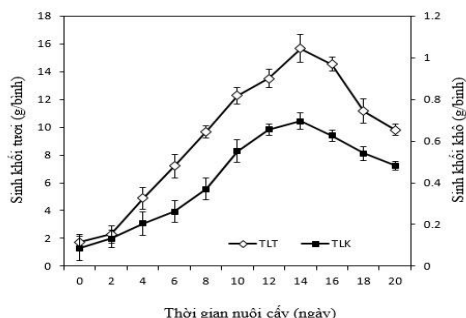
1,31 g khô/bình) thu nhận từ môi trường MS chứa 0,75 – 1,00 mg/L KIN, GI đạt tương ứng là 10,3-10,7 (Bảng 3.3). Kết quả này chứng tỏ rằng bổ sung NAA kết hợp với KIN thúc đẩy hơn nữa việc sinh trưởng của callus khi so sánh với bổ sung riêng từng chất điều hòa sinh trưởng.

3.1.3. Sự tích lũy eurycomanone trong callus cây bách bệnh

Kết quả phân tích HPLC mẫu dịch chiết từ callus 14 ngày tuổi trên môi trường tốt nhất (MS cơ bản có bổ sung 1,25 mg/L NAA và 1,00 mg/L KIN) và rễ cây bách bệnh tự nhiên khoảng 5 năm tuổi cho thấy tất cả các mẫu đều xuất hiện 1 peak có thời gian lưu giống với chất chuẩn eurycomanone (khoảng 4,15 phút). Hàm lượng eurycomanone trong callus là 0,17 mg/g chất khô (bằng khoảng 8% so với mẫu rễ cây tự nhiên là 2,09 mg/g).

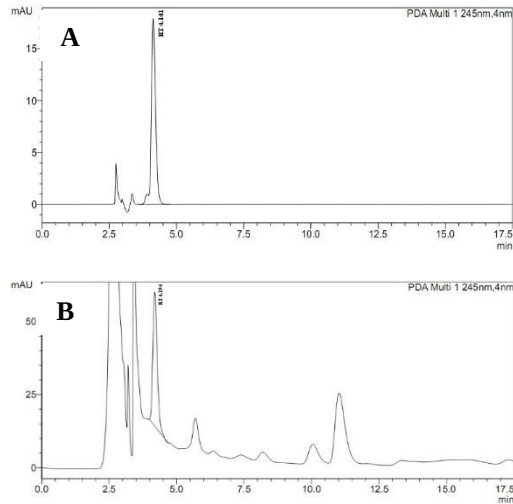
3.2. THIẾT LẬP NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO

3.2.1. Xây dựng đường cong sinh trưởng và tích lũy eurycomanone

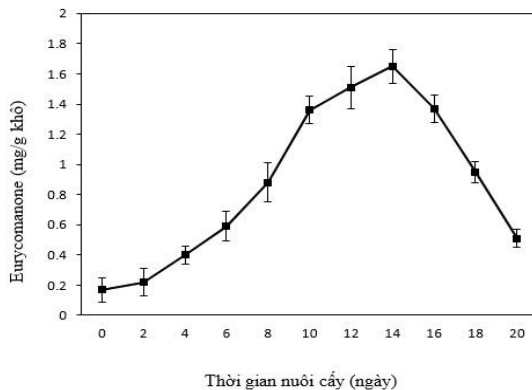


Hình 3.1. Đường cong sinh trưởng của tế bào

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở hình 3.1 cho thấy pha thích nghi diễn ra ngắn (khoảng 2 ngày), sau đó là pha sinh trưởng nhanh (kéo dài đến ngày thứ 14), pha ổn định diễn ra ngắn sau đó nhanh chóng chuyển qua pha chết. Với tỷ lệ tiếp mẫu khoảng 1,7 g bao đầu, sinh trưởng tế bào đạt cực đại vào ngày thứ 14, khối lượng tươi thu được là khoảng 15,67 g/bình (0,69 g khô/bình), cao gấp 9,21 lần sinh khối tươi ban đầu.



Hình 3.2. Phổ HPLC phân tích hàm lượng eurycomanone trong tế bào. **A.** Eurycomanone chuẩn, **B.** Dịch chiết eurycomanone từ tế bào huyền phù 14 ngày tuổi



Hình 3.3. Đường cong tích lũy eurycomanone

Phân tích HPLC được tiến hành trên dịch chiết tế bào và kết quả cho thấy một peak với thời gian lưu là 4.194 phút, tương tự như của chất chuẩn eurycomanone (4.141 phút) (Hình 3.2). Như vậy,

eurycomanone đã được tổng hợp trong tế bào *in vitro* cây bách bệnh và sự biến đổi sinh học đường như không có sai khác ý nghĩa.

Kết quả xây dựng đường cong tích lũy cho thấy eurycomanone đã được sản xuất trong quá trình nuôi cấy từ đầu đến ngày 20, hàm lượng cao nhất (1,65 mg/g khô) cũng thu được vào ngày thứ 14 giống như sự tích lũy sinh khối tế bào (Hình 3.3).

3.2.2. Ảnh hưởng nguồn carbon đến sự sinh trưởng của tế bào

Kết quả trình bày ở bảng 3.4 cho thấy glucose thích hợp cho sinh trưởng của tế bào, đặc biệt là ở nồng độ 3% (sinh khối tươi đạt 20,30 g), tuy nhiên ở môi trường này sự tích lũy sinh khối khô không tốt (chỉ đạt 0,59 g). Trong khi đó, sucrose ở nồng độ 3% sự sinh trưởng của tế bào không tốt bằng glucose (sinh khối tươi đạt 17,43 g) nhưng sự tích lũy sinh khối khô lại tốt hơn rất nhiều (0,72 g). Khi nuôi cấy tế bào trên môi trường chứa fructose tế bào không sinh trưởng, hóa nâu và chết sau vài ngày.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sự sinh trưởng của tế bào cây bách bệnh

Nguồn carbon		Khối lượng	Khối lượng	Eurycomanone
(%)		tươi (g)	khô (g)	(mg/g)
Glucose	2	17,58 ^b	0,43 ^c	0,47 ^e
	3	20,30 ^a	0,59 ^b	0,77 ^d
	4	12,57 ^c	0,44 ^c	1,36 ^b
Sucrose	2	17,62 ^b	0,44 ^c	1,54 ^{ab}
	3	17,43 ^b	0,72 ^a	1,70 ^a
	4	18,00 ^b	0,61 ^b	1,11 ^c
Fructose	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-

Ở môi trường nuôi cấy chứa sucrose 3%, sự sản xuất eurycomanone của tế bào đạt cao nhất (1,70 mg/g). Ảnh hưởng của nồng độ glucose lên sự tích lũy eurycomanone thấp hơn sucrose.

3.2.3. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng của tế bào

Trong nghiên cứu của chúng tôi, pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh giao động trong khoảng 4,75-6,75 trước khi khử trùng. Kết quả nghiên cứu trình bày ở bảng 3.5 cho thấy sự tích lũy sinh khối tươi và sinh khối khô đều tốt nhất ở pH 5,75. Ở công thức môi trường này, sự tích lũy sinh khối tươi và khô, hàm lượng eurycomanone đều đạt cao nhất, tương ứng là 17,27 g/bình, 0,76 g/bình và 1,67 mg/g khô.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng của tế bào

pH	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Eur (mg/g)
4,75	11,04 ^d	0,49 ^d	0,49 ^c
5,25	15,47 ^b	0,68 ^b	1,38 ^b
5,75	17,27 ^a	0,76 ^a	1,67 ^a
6,25	13,68 ^c	0,60 ^c	1,34 ^b
6,75	13,52 ^c	0,60 ^c	1,31 ^b

3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT KÍCH KHÁNG LÊN SỰ SINH TRƯỞNG TẾ BÀO VÀ TÍCH LŨY EURYCOMANONE

3.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất kích kháng đến sự tích lũy eurycomanone

3.3.1.1. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men

Số liệu trình bày ở bảng 3.6 cho thấy YE có tác dụng ức chế sự sinh trưởng của tế bào, khối lượng khô của mẫu có xử lý kích kháng YE đạt 0,41 đến 0,51 g/bình (mẫu đối chứng 0,72 g/bình). Tuy nhiên, sự tích lũy eurycomanone tăng đạt cực đại khoản 3,71 mg/g khô khi xử lý với nồng độ 200 mg/L YE (tương ứng 1,82 mg/bình), cao hơn đối chứng khoản 2 lần.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men lên sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào cây bách bệnh

YE (mg/L)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Eurycomanone (mg/g)
ĐC	17,43 ^a	0,72 ^a	1,70 ^d
20	14,7 ^{bc}	0,42 ^e	1,61 ^d
50	14,98 ^b	0,47 ^d	1,71 ^d
100	15,24 ^b	0,46 ^d	1,79 ^d
150	13,96 ^c	0,41 ^e	2,28 ^c
200	17,08 ^a	0,49 ^c	3,71 ^a
250	16,68 ^a	0,51 ^b	3,07 ^b

ĐC: đối chứng không bổ sung YE.

3.3.1.2. Ảnh hưởng của methyl jasmonate

Khác với khi xử lý bằng YE, kích kháng bằng MeJA ảnh hưởng một cách rõ rệt đến sự sinh trưởng của tế bào bách bệnh. Sự sinh trưởng của tế bào giảm một cách đáng kể khi nồng độ MeJA tăng từ 0,01- 0,50 mM. Ở nồng độ 1,00 mM MeJA, tế bào hóa nâu, không phát triển (Bảng 3.7). Tuy nhiên, hàm lượng eurycomanone đạt cao nhất 6,60 mg/g chất khô ở nồng độ 0,02 mM MeJA (tương ứng 3,16 mg/bình), kết quả này cao hơn 4 lần so với đối chứng.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của methyl jasmonate lên sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào

MeJA (mM)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Eurycomanone (mg/g)
ĐC	17,43 ^a	0,72 ^a	1,70 ^c
0,01	10,58 ^b	0,43 ^c	5,17 ^b
0,02	8,14 ^c	0,48 ^c	6,60 ^a
0,05	5,22 ^d	0,61 ^b	1,23 ^d
0,10	2,29 ^e	0,33 ^d	1,11 ^d
0,20	1,63 ^f	0,22 ^e	0,51 ^f
0,50	0,76 ^g	0,07 ^f	0,85 ^e
1,00	-	-	-

ĐC: đối chứng không bổ sung MeJA.

3.3.1.3. Ảnh hưởng của salicylic acid

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của salicylic acid lên sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào

SA (mM)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Eurycomanone (mg/g)
ĐC	17,43 ^b	0,72 ^a	1,70 ^b
0,01	16,32 ^c	0,48 ^{bc}	3,30 ^a
0,02	19,08 ^a	0,56 ^b	3,51 ^a
0,05	14,67 ^d	0,52 ^b	3,35 ^a
0,10	2,86 ^e	0,37 ^c	0,9 ^c
0,20	-	-	-
0,50	-	-	-
1,00	-	-	-

ĐC: đối chứng không bổ sung SA

Kết quả trình bày ở bảng 3.8 cho thấy sự ức chế mạnh của SA lên khả năng sinh trưởng của tế bào bạch bệnh ở nồng độ lớn hơn 0,05 mM. Ở nồng độ 0,20 – 1,00 mM SA, tế bào hóa nâu, không phát triển. Trong đó, hàm lượng của eurycomanone cũng tăng khoảng 2 lần khi so sánh với mẫu đối chứng trong môi trường có bổ sung SA 0,02 mM (eurycomanone đạt 3,51 mg/g khô, tương ứng 1,96 mg/bình).

3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian kích kháng đến sự tích lũy eurycomanone

3.3.2.1. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng YE lên sự tích lũy eurycomanone

Hàm lượng eurycomanone trong các tế bào khi xử lý bằng 200 mg/L YE ở ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy đạt giá trị cao nhất là 6,25 mg/g chất khô (tương ứng 3,125 mg/bình), cao gấp 3,68 và 2,98 lần so với mẫu đối chứng không được xử lý chất kích kháng và mẫu rễ của cây 5 năm tuổi.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng YE lên sự tích lũy eurycomanone

Thời điểm kích kháng (ngày)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Eurycomanone (mg/g)
0	17,08 ^b	0,49 ^a	3,71 ^c
2	16,86 ^b	0,49 ^a	3,87 ^c
4	17,20 ^b	0,50 ^a	4,83 ^b
6	16,67 ^b	0,50 ^a	6,25 ^a
8	18,21 ^a	0,52 ^a	4,49 ^b
10	17,01 ^b	0,50 ^a	2,12 ^d
12	18,42 ^a	0,50 ^a	2,02 ^d

3.3.2.2. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng MeJA lên sự tích lũy eurycomanone

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý 0,02 mM MeJA lên khả năng sinh trưởng của tế bào cho thấy MeJA ức chế mạnh đối với sinh khối tươi, thời gian xử lý chất kích kháng càng dài khả năng sinh trưởng của tế bào càng bị ức chế. Đối với sinh khối khô, xử lý chất kích kháng từ 8-10 ngày làm tăng khả năng tích lũy sinh khối khô. Hàm lượng eurycomanone trong các tế bào khi xử lý bằng MeJA sau 4 ngày nuôi cấy đạt giá trị cao nhất là 17,36 mg/g khô (9,54 mg/bình) (Bảng 3.10), cao gấp khoảng 10 và 8 lần so với mẫu đối chứng và mẫu rễ của cây 5 năm tuổi.

3.3.2.3. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng SA lên sự tích lũy eurycomanone

Khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy 0,02 mM SA, sinh khối tế bào ở tất cả các thời điểm bổ sung đều giảm, trong đó bổ sung vào đầu giai đoạn sinh trưởng (2-6 ngày) sẽ ức chế mạnh nhất. Hàm lượng eurycomanone trong tế bào chỉ đạt cao nhất là 5,20 mg/g (2,44 mg/bình) khi SA được bổ sung vào trong môi trường sau 4 ngày nuôi cấy (Bảng 3.11). Như vậy, sự kích thích quá trình sinh tổng hợp của eurycomanone ở những thời điểm kích kháng khác nhau là khác nhau, trong khi sự sinh trưởng của tế bào không bị ảnh hưởng bởi thời điểm

này. Hầu hết các mẫu xử lý, sinh khối tế bào đạt từ 0,46 đến 0,56 g khô/bình.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng MeJA lên sự tích lũy eurycomanone

Thời điểm kích kháng (ngày)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Eurycomanone (mg/g)
0	8,14 ^e	0,48 ^{ab}	6,60 ^d
2	8,32 ^e	0,50 ^{ab}	12,83 ^b
4	9,21 ^d	0,55 ^a	17,36 ^a
6	10,43 ^c	0,56 ^a	9,18 ^c
8	11,40 ^b	0,49 ^{ab}	5,99 ^d
10	13,83 ^a	0,42 ^b	3,81 ^e
12	14,09 ^a	0,43 ^b	2,77 ^f

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng SA lên sự tích lũy eurycomanone

Thời điểm kích kháng (ngày)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Eurycomanone (mg/g)
0	19,08 ^a	0,56 ^a	3,51 ^c
2	15,58 ^c	0,46 ^b	4,26 ^b
4	16,00 ^c	0,47 ^b	5,20 ^a
6	15,90 ^c	0,47 ^b	5,01 ^a
8	17,09 ^b	0,50 ^{ab}	2,37 ^d
10	18,00 ^b	0,53 ^a	2,01 ^d
12	17,36 ^b	0,50 ^{ab}	1,97 ^d

Chương 4

BẢN LUẬN

4.1. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CALLUS

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự sinh trưởng của callus trên cây bách bệnh đã được nhiều tác giả nghiên cứu và công bố. Trong khi đó Mahmood và cs (2010) cho rằng 2,4-D là loại auxin phù hợp nhất để cảm ứng tạo callus cũng như nhân sinh khối callus từ nhiều nguồn gốc khác nhau của cây bách bệnh, callus tạo thành từ mẫu lá, cuống lá đơn, cuống lá kép và lá mầm trên các môi trường có bổ sung 2,4-D đều cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ tạo callus từ 78,33-88,33%. Vì vậy, chúng tôi sử dụng 2,4-D là chất điều hòa sinh trưởng đầu tiên để khảo sát khả năng sinh trưởng của callus. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi 2,4-D không phải là chất điều hòa sinh trưởng cho hiệu quả tốt nhất. Khi bổ sung riêng lẻ 2,4-D, công thức bổ sung 2 mg/L 2,4-D cho kết quả tốt nhất, chỉ số sinh trưởng của callus chỉ đạt 2,52 (Bảng 3.1).

Một số nghiên cứu cho thấy khi việc kết hợp giữa auxin và cytokinin vào môi trường nuôi cấy thúc đẩy mạnh mẽ việc tạo callus trên nhiều giống cây. Theo hướng đó, chúng tôi đã sử dụng kết hợp NAA và KIN lên khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh, kết quả thu được là rất khả quan. Kết quả kết hợp giữa 1,25 mg/L NAA và 1,00 mg/L KIN cho thấy sinh khối callus đạt cao nhất (32,34 g tươi/bình, tương ứng với 1,31 g khô/bình, GI đạt tương ứng là 10,7 (Bảng 3.3). Trên thế giới, việc sử dụng cả NAA và KIN trong nuôi cấy callus cây bách bệnh để sản xuất hợp chất thứ cấp đã được thực hiện. So với nghiên cứu của chúng tôi, nồng độ chất điều hòa sinh trưởng mà các tác giả sử dụng là thấp hơn.

4.2. THIẾT LẬP NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO

4.2.1. Sự tích lũy sinh khối tươi và khô trong nuôi cấy huyền phù

Trong nghiên cứu của chúng tôi, sinh trưởng tế bào đạt cực đại vào ngày thứ 14 của quá trình nuôi cấy (Hình 3.3), khối lượng tươi thu

được là khoảng 15,67 g/bình (0,69 g khô/bình), cao gấp 9.21 lần sinh khối tươi ban đầu. Kết quả thu được của chúng tôi cao hơn khá nhiều so với các nghiên cứu đã công bố trước đây. Keng và cs (2010) thu được sinh khối cao nhất (3,1 g tươi/0,22 g khô) vào ngày thứ 13 khi nuôi cấy 0,5 g tế bào cây bách bệnh trong môi trường MSB (thay đổi từ môi trường MS) được xử lý với 2 mg/L NaH_2PO_4 .

4.2.2. Sự tích lũy eurycomanone trong nuôi cấy huyền phù

Qua một số nghiên cứu trước đây cho thấy, đa số trường hợp nuôi cấy callus hoặc tế bào thực vật đều cho hàm lượng các chất thứ cấp cao hơn nhiều lần so với trong điều kiện tự nhiên. Nguyễn Hoàng Lộc và cs (2010, 2011) đã nghiên cứu sản xuất solasodine từ callus cây cà gai leo nhận thấy hàm lượng solasodine cao hơn khoảng 8,5 lần so với tách chiết từ rễ cây tự nhiên 1 năm tuổi. Đối với cây bách bệnh trong nghiên cứu này, eurycomanone đã được sản xuất trong quá trình nuôi cấy từ đầu đến ngày 20, hàm lượng cao nhất (1,65 mg/g khô) cũng thu được vào ngày thứ 14 giống như sự tích lũy sinh khối tế bào (Hình 3.7). Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Mohamad và cs (2013), hàm lượng eurycomanone trong cây bách bệnh 6-7 năm thu thập từ Muar (Malaysia) chỉ gần 1,4 mg/g khô.

4.2.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon và pH môi trường

Nguồn carbon được xem là có ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào và sự sản xuất các chất có nguồn gốc thực vật trong nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu của chúng tôi nồng độ sucrose 3% là thích hợp nhất cho sinh trưởng của tế bào. Ở nồng độ này, sự sinh trưởng của tế bào đạt khá tốt, sinh khối tươi đạt 17,43 g và sinh khối khô đạt 0,72 g, sự sản xuất eurycomanone của tế bào cũng đạt cao nhất (1,7 mg/g).

Bên cạnh nguồn carbon, pH môi trường cũng ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng và tích lũy hợp chất thứ cấp của tế bào. Trong nghiên cứu của chúng tôi, pH 5,75 cho kết quả thu được tốt nhất. Ở công thức môi trường này, sự tích lũy sinh khối tươi và khô, hàm lượng eurycomanone đều đạt cao nhất, tương ứng là 17,27 g/bình, 0,76 g/bình và 1,67 mg/g khô. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thu được tương

tự như kết quả nghiên cứu của Siregar và cs (2004), tác giả nhận thấy pH 5,75 là tối ưu cho nuôi cấy tế bào cây này.

4.3. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT KÍCH KHÁNG LÊN SỰ SINH TRƯỞNG TẾ BÀO VÀ TÍCH LŨY EURYCOMANONE

4.3.1. Ảnh hưởng của chất kích kháng lên sinh trưởng tế bào

Thông thường, bổ sung các chất kích kháng vào môi trường nuôi cấy đều ức chế khả năng sinh trưởng của tế bào, kết quả này được công bố trên nhiều công trình nghiên cứu trước đây. Trong nghiên cứu của chúng tôi, YE ít có sự tác động lên sự sinh trưởng của tế bào, MeJA ức chế mạnh trong khi SA tăng khả năng sinh trưởng của tế bào khi được xử lý ở nồng độ thấp (Bảng 3.6-3.8).

Đối với YE, đây là một hợp chất bao gồm nhiều thành phần khác nhau, ngoài các amino acid, vitamin và khoáng chất, ... Vì vậy, YE thường ít ức chế quá trình sinh trưởng của tế bào của cây bách bệnh, đặc biệt là ở sinh khối tươi (Bảng 3.6). MeJA là chất ức chế sinh trưởng tế bào và tăng cường sản xuất hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy rễ cây *Bupleurum falcatum* L., *Taxus* spp. và lúa. Trong nghiên cứu của chúng tôi, trong môi trường có MeJA sinh trưởng của tế bào bách bệnh bị ức chế mạnh so với đối chứng (Bảng 3.7). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây về sự ức chế của MeJA lên sinh trưởng của tế bào thực vật. Đối với SA, trong hầu hết các công trình nghiên cứu được công bố, việc xử lý chất kích kháng bằng SA sẽ ức chế sự sinh trưởng của tế bào. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sự sinh trưởng của tế bào khi bổ sung SA đều thấp hơn khi không bổ sung SA, cả khối lượng tươi lẫn khối lượng khô như ở hầu hết các công bố khác trước đây.

4.3.2. Ảnh hưởng của chất kích kháng lên tích lũy eurycomanone

Từ kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, YE khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã ảnh hưởng đến sự tích lũy eurycomanone của tế bào cây bách bệnh. Bổ sung YE với các nồng độ từ 150-250 mg/L đều làm tăng mạnh hàm lượng eurycomanone, nồng độ 200 mg/L hàm lượng eurycomanone cao gấp đôi đối chứng (Bảng 3.6)

Đối với MeJA, hàm lượng eurycomanone đạt cao nhất trong nghiên cứu của chúng tôi là 6,60 mg/g khô, thu được ở nồng độ 0,02 mM MeJA, kết quả này cao hơn 4 lần so với đối chứng và cao gấp đôi so với YE (Bảng 3.7). Nhìn chung, MeJA đã ảnh hưởng lên khả năng sinh tổng hợp eurycomanone trong tế bào bách bệnh rõ rệt hơn cả YE và SA, hàm lượng eurycomanone thu được đạt gần gấp đôi.

Việc sử dụng SA làm chất kích kháng để tăng cường tổng hợp các hợp chất thứ cấp từ nuôi cấy tế bào thực vật rất phổ biến. Hàm lượng eurycomanone trong tế bào cây bách bệnh tăng dần khi bổ sung SA từ 0,01-0,05 mM, sau đó giảm và gần như tế bào không phát triển và chết. Ở môi trường có bổ sung 0,02 mM SA, lượng eurycomanone trong tế bào đạt cao nhất (3,51 mg/g khối lượng khô), tương đương khi xử lý YE và thấp hơn khi xử lý MeJA khoảng 50%. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng SA sử dụng là khá thấp (0,01-0,05 mM), tương đương với một số nghiên cứu đã công bố. Chẳng hạn, Yousefzadi và cs (2010) đã bổ sung 10 μ M SA vào ngày thứ ba khi nuôi cấy tế bào cây *Linum album*, hàm lượng podophyllotoxin thu được 333 μ g/g khối lượng khô, cao gấp ba lần so với tế bào nuôi cấy trên môi trường không bổ sung SA.

4.3.2. Ảnh hưởng của thời gian kích kháng

Xử lý chất kích kháng tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy gây ra sự ức chế sự sinh trưởng của tế bào bách bệnh. Sinh khối khô chỉ đạt 0,57-0,71% (xử lý bằng YE), 0,1-0,85% (xử lý bằng MeJA) và 0,51-0,78% (xử lý bằng SA) so với mẫu đối chứng sau 14 ngày nuôi cấy ($p < 0,05$). Ngược lại, hàm lượng eurycomanone đã tăng từ 1,34 đến 2,18 lần (xử lý bằng YE), 0,1 đến 0,85 lần (xử lý bằng MeJA) và 3,04 đến 3,88 lần (xử lý bằng SA) ($p < 0,05$). Thời điểm kích kháng thích hợp phụ thuộc vào khả năng đáp ứng của các loài thực vật khác nhau. Kết quả của chúng tôi cho thấy rằng thời điểm thích hợp nhất để xử lý chất kích kháng tế bào bách bệnh là từ 4 đến 6 ngày sau khi nuôi cấy.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi rút ra các kết luận như sau:

1. Môi trường nuôi cấy callus bách bệnh có hiệu quả cao nhất là MS cơ bản có bổ sung 1,25 mg/L NAA và 1,00 mg/L KIN, callus sinh trưởng mạnh với chỉ số sinh trưởng là 10,07, khối lượng khô đạt 1,31 g/bình và hàm lượng eurycomanone là 0,17 mg/g chất khô.

2. Điều kiện tốt nhất để nuôi cấy tế bào huyền phù bách bệnh là môi trường MS lỏng chứa 1,25 mg/L NAA và 1,00 mg/L KIN, 3% sucrose, pH 5,75. Sinh khối tươi, sinh khối khô và hàm lượng eurycomanone thu được tương ứng là 17,27 g/bình, 0,76 g/bình và 1,67 mg/g chất khô sau 14 ngày nuôi cấy.

3. Methyl jasmonate là chất kích kháng thích hợp nhất để tăng cường sản xuất eurycomanone trong tế bào cây bách bệnh. MeJA 0,02 mM được bổ sung vào môi trường tại ngày thứ 4 của quá trình nuôi cấy đã tăng lượng eurycomanone tích lũy lên tới 17,36 mg/g chất khô, cao hơn 10 lần so với tế bào không xử lý chất kích kháng và khoảng 8 lần so với mẫu tự nhiên (rễ cây bách bệnh khoảng 5 năm tuổi).

KIẾN NGHỊ

Đề tài cần được tiếp tục nghiên cứu theo hướng ứng dụng, mở rộng ở quy mô pilot, thăm dò thêm các chất kích kháng khác, từ đó hoàn thiện quy trình sản xuất để có thể áp dụng vào sản xuất ở quy mô công nghiệp.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyen Huu Nhan, Nguyen Hoang Loc (2017). Production of eurycomanone from cell suspension culture of *Eurycoma longifolia*. *Pharmaceutical biology*, 55(1): 2234-2239. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1400077>
2. Nguyen Huu Nhan, Nguyen Hoang Loc (2018). Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of longjack (*Eurycoma longifolia*) by elicitor treatment. *Journal of Plant Biotechnology*, 45(4): 340-346. <https://doi.org/JPB-45-340>
3. Nguyễn Hữu Nhân, Hoàng Tấn Quảng, Nguyễn Hoàng Lộc (2019) 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*, 128 (1E): 69-76.
4. Nguyễn Hữu Nhân, Hoàng Tấn Quảng, Nguyễn Hoàng Lộc (2020) Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của tế bào huyền phù cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack). *Tạp chí Khoa học, Trường đại học Khoa học, Đại học Huế*, 16(2):155-165.

**HUE UNIVERSITY
UNIVERSITY OF SCIENCES**

NGUYEN HUU NHAN

**THE EFFECTS OF ELICITORS ON EURYCOMANONE
BIOSYNTHESIS OF SUSPENSION-CULTURED LONGJACK
CELLS (*Eurycoma longifolia* Jack)**

Major: PLANT PHYSIOLOGY

Code: 9420112

DOCTORAL DISSERTATION SUMMARY

Scientific supervisor:

Prof. Dr. NGUYEN HOANG LOC

HUE – 2021

The dissertation was completed at
University of Sciences, Hue University

Scientific supervisor: **Prof. Dr. Nguyen Hoang Loc**

Review 1: **Assoc. Prof. Dr. Tran Thanh Huong**
University of Science, Viet Nam National University Ho Chi Minh
City

Review 2: **Assoc. Prof. Dr. Nguyen Thi Tam**
University of Education, Thai Nguyen University

Review 3: **Assoc. Prof. Dr. Tran Thi Le**
University of Agriculture and Forestry, Hue University

The dissertation will be defended at Hue University Dissertation
Committee meeting at

This dissertation can be found at:

- National Library of Vietnam
- Library of University of Sciences, Hue University

INTRODUCTION

1. RESEARCH NECESSITY

Longjack (*Eurycoma longifolia* Jack, Simaroubaceae) is a tropical medicinal plant, originated from Southeast Asian countries, namely Malaysia, Indonesia, and Vietnam. Root extracts obtained from *E. Longifolia* are used for increasing men's testosterone levels. Longjack is also known as a traditional tonic having antimicrobial, anti-inflammatory, antipyretic, aphrodisiac, and anticancer effects.

Eurycomanone is the main bioactive compound of longjack, with noteworthy benefits, including treating men's sexual insufficiency and inducing apoptosis in cancer cells. Mass-cultivation of longjack is one of the methods for meeting the demand of Eurycomanone, which has recently rocketed. Unfortunately, longjack's growth rate is low. Specifically, it takes approximately five years for longjack's cultivation before harvesting. Therefore, longjack cell suspension culture is the most suitable alternative approach to secondary metabolite productions since it does not depend on naturally cultivated plants.

Elicitors are chemicals having the capacity of enhancing the biosynthesis of valuable secondary metabolites. According to Abraham et al. (2011), yeast extract (YE), triggering plant defenses, has been used as an elicitor for increasing the amounts of bioactive compounds produced by micropropagation. Salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA) are also important elicitors for bioactive compound productions, with critical signaling roles in activation of plant defenses.

Considering the competence of secondary metabolite productions based on elicited cell suspension culture, this study was conducted to find the optimal protocol for producing large biomass of suspension-cultured longjack cells with high eurycomanone content. By this means, we can create a sufficient source of eurycomanone without depending on whole plants.

By the above-mentioned bases, we present our study named “**The effects of elicitors on eurycomanone biosynthesis of suspension-cultured longjack cells (*Eurycoma longifolia* jack)**”.

2. RESEARCH TARGETS

Determining the optimal types of elicitor, elicitors' concentrations, and elicitor treatment duration for obtaining the highest eurycomanone amount from suspension-cultured longjack cells (*Eurycoma longifolia* Jack)

3. RESEARCH CONTENT AND SCOPE

Research content

- Investigating the suitable conditions for cell biomass production and eurycomanone biosynthesis;
- + Determining callus and suspension-cultured cells' growth rates;
- + Constructing the growth curve and the eurycomanone accumulation curve of suspension-cultured cells;
- + Examining the effects of culture media on suspension-cultured cells' growth and eurycomanone accumulation;
- Finding the optimal concentrations and treatment durations of several elicitors (SA, MeJA, and YE) for enhancing suspension-cultured cells' growth and eurycomanone accumulation.

Research scope

This study was on longjack callus, treated with the three elicitors (MeJA, SA, and YE). All experiments were conducted at the laboratory scale.

4. NEW FINDINGS OF DISSERTATION

This is the first study on using elicitors (MeJA, SA, and YE) to enhance the eurycomanone content of suspension-cultured longjack cells (*Eurycoma longifolia* Jack).

The optimal media for longjack calli's growth and longjack cell suspension culture were determined (MS medium + 1.25 mg/L NAA/1.00 mg/L KIN (growth index = 10.07) and liquid MS medium + 1.25 mg/L NAA/1.00 mg/L KIN + 30 g/L sucrose, respectively).

0.02 mM MeJA supplementation on the fourth day of culture had the highest capacity of stimulating eurycomanone production, with the maximum eurycomanone amount obtained after 14 days of culture. The optimal eurycomanone amount was ten times higher than the control cultures (with no elicitor treatment) and eight times higher than the naturally cultivated plants.

5. DISSERTATION STRUCTURE

This dissertation has 109 pages, with five pages for the introduction, 35 pages for the literature review, seven pages for the materials and methods section, 21 pages for the results, 17 pages for the discussion, one page for the conclusion and suggestions, one page for the list of published articles, 19 pages for the references, and three pages for the appendix. The dissertation has 150 referenced materials, including 137 English materials. A total of 12 figures and 12 tables were presented in the results section.

Chapter 1

LITERATURE REVIEW

1.1. LONGJACK INTRODUCTION

Longjack is a herbal, evergreen, and slowly grown plant, with a maximum height of 15-18 m and fruiting time of 2-3 years. It takes 25 years to obtain the best amounts of bioactive compounds in longjack. However, longjack's roots are generally harvested after 4-5 years of cultivation for trading. Almost all parts of longjack have been used as traditional tonics. Root extracts of this plant can restore energy and vitality, enhance blood flow, and be the herbal ingredient for women after childbirth. Longjack's leaves have been used by local healers for malaria, tumor, gum diseases, syphilis, and gonorrhea treatments. The main bioactive compound of longjack is quassinoid. Quassinoids are a group of highly oxygenated degraded triterpenoids in the Simaroubaceae family.

1.2. PLANT SECONDARY METABOLITES

There are many organic compounds and metabolites created in plant metabolism. Plant secondary metabolites are generally synthesized by using the products of photosynthesis (alkaloids from amino acid; steroids, terpenoids, and cardiac glycoside from acetic acid; antibiotics and vitamins from carbohydrates). Biotechnology achievements in the field of plant tissue culture have provided methods for commercializing plant bioactive compounds. Those methods can increase the production scale and yield of plant bioactive compounds.

1.3. ELICITORS

Elicitors are compounds or a complex of compounds, having the capacity of initializing or enhancing the biosynthesis of a particular substance in plant cells. Elicitation is the induction or enhancement of plant secondary metabolite productions, triggered by using a small elicitor amount.

Elicitors are classified based on their nature (biotic and abiotic elicitors) or their origins (endogenous and exogenous elicitors).

Enhancing secondary metabolite productions based on elicitors is a new research topic, bringing high benefits for the pharmaceutical industry. Several factors, including elicitors' concentrations, treatment duration, stage of treatment, plant cell lines, plant growth regulations, and cell wall quality, can significantly affect the accumulation of bioactive compounds.

Jasmonic acid (JA) and methyl jasmonate (MeJA) are signaling molecules in biotic and abiotic stresses. The strong effects of JA and MeJA are caused by participating in a wide variety of signaling pathways. MeJA and JA can stimulate the biosynthesis of many compounds in different plant species (alkaloid, terpenoid, phenolic phytoalexin, coumarin, and taxane).

Fungi culture's filtrates, YE, and dead bacterial cells can trigger plant defenses. However, these elicitors consist of many compounds, with only a few molecules being responsible for stimulating bioactive compound synthesis and accumulation.

1.4. EURYCOMANONE INTRODUCTION

Eurycomanone, a quassinoid, can only be found in longjack. This bioactive compound mainly accumulates in the root of longjack and acts as a marker for medicines' quality made from the species. Eurycomanone has the capacities of increasing testosterone levels in rat testicles, preventing ulcers, treating malaria, and being cytotoxic to cancer cell lines.

58.9 % of Malaysian medicines contain eurycomanone, according to HPLC analysis. Eurycomanone concentration in longjack ranges from 0.8 % to 1.5 % (w/v).

Chapter 2

MATERIALS AND METHODS

2.1. PLANT MATERIALS

Calli induced from longjack *in vitro* roots (*Eurycoma longifolia* Jack), obtained from Dr. Vo Chau Tuan's study, were plant materials for this research.

In vitro plantlets were regenerated from longjack seeds, collected from Dai Loc Ward, Quang Nam province. Roots of eight-week-old plantlets were used for callus induction. These procedures were conducted in the Faculty of Biology and Environmental Sciences, College of Pedagogy, Da Nang University.

2.2. EXPERIMENTAL METHODS

2.2.1. Culture medium and conditions

Basal MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with different plant growth regulators (depending on experiments' purposes) was the culture medium for the experiments. The culture media (pH 5.8) were added with 3 % sucrose, 0.8 % agar, and autoclaved at 121°C, 1 atm, in 20 minutes.

2.2.2. Longjack callus culture

To examine the most suitable condition for callus growth, 3 g of longjack calli were cultured on MS medium given different concentrations of 2,4-D, NAA, and KIN. After 14 days of culture, calli were filtered by using Whatman filter paper No. 1 and then weighed to determine the fresh weight. Next, calli were dried at 50°C until the dry weight remains unchanged. The cells' growth index (GI) was calculated by using the following formula:

$$GI = \frac{W_{14}}{W_0}$$

Where W_{14} is the callus fresh weight after 14 days of culture and W_0 is the callus fresh weight at the beginning of culture.

2.2.3. Longjack cell suspension culture

3 g of separated, 14-day-old, light yellow calli, cultured on solid medium, were transferred into 50 mL of liquid medium, contained in a 250 mL Erlenmeyer flask. The optimal medium compositions for callus growth were used for cell suspension culture. Flasks were shaken at 120 rpm. The cells were cultured in 20 days. Cell biomass was collected every two days to construct the growth curve and the eurycomanone accumulation curve.

2.2.4. Effects of carbon source on the growth and eurycomanone accumulation of suspension-cultured longjack cells

The effects of different types of carbon sources were examined after determining the optimal amount of time for biomass increasing and eurycomanone accumulation.

Different concentrations of sucrose, glucose, and fructose (20, 30, and 40 g/L) were separately added into the liquid culture medium. After a particular number of culturing days (determined in section 2.2.3), biomass fresh weight, dry weight, and accumulated eurycomanone concentration were determined.

The optimal carbon source was used for further experiments.

2.2.5. Effects of pH on the growth and eurycomanone accumulation of suspension-cultured longjack cells

The pH of the culture medium was adjusted to different values, ranging from 4.75 to 6.75 (step = 0.5), before autoclaving to examine the effects of pH on the growth and eurycomanone accumulation of suspension-cultured cells. After 14 days of culture, biomass fresh weight, dry weight, and accumulated eurycomanone concentration were determined.

2.2.6. Elicitor treatments

Effects of elicitor concentration on the growth and eurycomanone accumulation of suspension-cultured longjack cells

Different concentrations of YE, MeJA, and SA were separately supplemented into the culture media at the beginning of

culture (day 0) to examine the effects of elicitor concentration on the growth and eurycomanone accumulation of suspension-cultured longjack cells. SA and MeJA concentrations ranged from 0.01 to 1.00 mM, while YE concentrations ranged from 20 to 250 mg/L. The control medium in this experiment contained no elicitor. After a particular number of culturing days, biomass fresh weight, dry weight, and accumulated eurycomanone concentration were determined.

The optimal concentration of elicitor was used for the next experiment.

Effects of elicitation time on the growth and eurycomanone accumulation of suspension-cultured longjack cells

Elicitors were added into the culture medium at different times, day 2, day 4, day 6, day 8, day 10, and day 12, to examine the effects of elicitation time on the growth and eurycomanone accumulation of suspension-cultured longjack cells. Elicitors were added into the control medium at the beginning of culture. After a particular number of culturing days, biomass fresh weight, dry weight, and accumulated eurycomanone concentration were determined.

2.2.7. Eurycomanone extraction

Eurycomanone was extracted according to the modified protocol of Mohamad et al. (2013). The dry biomass from callus, suspension-cultured cells, and longjack roots was homogenized into fine powder.

Next, 0.5 g of the powder was immersed in 10 mL methanol (Merck) and then shaken at 120 rpm (60°C, eight hours). After that, the extract was obtained. Repeat this step at least three times.

30 mL of the extract had then been filtered by using Whatman filter paper No.1 before being concentrated at 50°C.

After that, the obtained precipitates were dissolved by using 5 mL of methanol and then filtered by using Minisart 0.2 µm membrane (Sartorius, Goettingen, Germany).

Finally, the HPLC analysis was conducted to determine the

amount of eurycomanone.

The calli and suspension-cultured cells were obtained from the above experiments. The longjack roots were collected from 5-year-old plants, grown in Dai Loc Ward, Quang Nam province.

2.2.8. HPLC analysis

Eurycomanone amount was determined by HPLC analysis, according to the modified protocol of Norhidayah et al. (2015). 20 μ L of the extract was injected into the column by using a Hamilton syringe. The HPLC analysis were carried out at ambient temperature with a C18 column (Xbridge: 5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm), flow rate: 0.8 mL/min, run time: 17.5 min, detector wavelength: 245 nm. The stationary phase was silica gel and the mobile phase was acetonitrile:H₂O (15:85, v/v).

The HPLC was performed on a LC-20 Prominence system (Shimadzu, Japan) with a SPD-20A UV-VIS detector using LC-Solution software. All solvents were of analytical grade and were purchased from Merck & Co. Inc. (Germany).

A standard curve of eurycomanone (Santa Cruz, USA) was used for measurement of the eurycomanone content in the samples. The standard curve's equation is as follow:

$$y = 3504672.8353x + 6163.5917 (R^2 = 0.9984),$$

Where x is eurycomanone concentration and y is the areas of HPLC peaks.

2.2.9. Data analysis

Each experiment was randomly done in triplicates, with a total number of culture flasks of 15 (5 $\times$ 3).

Raw data were analyzed by ANOVA. Means were compared by Duncan's test. All the statistical analyses were conducted by SPSS (ver. 20.0) software, with an alpha of 0.05.

Chapter 3

RESULTS

3.1. EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS ON CALLUS GROWTH

3.1.1. *Effects of individual plant growth regulators on callus growth*

3.1.1.1. Effects of 2,4-D on callus growth

Table 3.1. The impacts of 2,4-D on the growth and characteristic of longjack callus

2,4-D (mg/L)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Growth index (GI)	Callus characteristic
0.5	6.56 ^b	0.36 ^b	2.19	Light yellow, watery
1.0	6.84 ^{ab}	0.39 ^b	2.28	Yellow, friable, separated
1.5	7.47 ^a	0.48 ^{ab}	2.49	Yellow, watery
2.0	7.56 ^a	0.55 ^a	2.52	Yellow, watery
2.5	7.41 ^a	0.42 ^b	2.47	Yellow, watery

Note: Within a column, means having a letter in common are not significantly different at the 5 % level by Duncan's test.

The calli grew well on all tested culture media, containing 2,4-D, with the fresh weight ranging from 6.56 to 7.56 g/flask and the dry weight ranging from 0.36 to 0.55 g/flask. 2 mg/L was the best 2,4-D concentration, with the GI, fresh weight, and dry weight of 2.52, 7.56 g/flask, and 0.55 g/flask, respectively (Table 3.1).

3.1.1.2. Effects of NAA on callus growth

The results in Table 3.2 showed that 1.25 mg/L was the best NAA concentration. Specifically, the fresh weight of callus rocketed from 3.00 g to 23.59 g. The maximum dry weight (0.93 g) and GI (7.8) were also obtained from the MS medium given 1.25 mg/L NAA.

In contrast, the low fresh weights (17.24 g and 16.79 g) and dry weights (0.65 g and 0.62 g) were observed in the media supplemented with 2.00 or 2.25 mg/L NAA, respectively.

Table 3.2. The impacts of NAA on the growth and characteristic of longjack callus

NAA (mg/L)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Growth index (GI)	Callus characteristic
0.50	20.47 ^d	0.79 ^c	6.8	Light yellow, watery
0.75	21.92 ^b	0.88 ^b	7.3	Light yellow, watery
1.00	21.30 ^c	0.87 ^b	7.1	Yellow, friable, separated
1.25	23.59 ^a	0.93 ^a	7.8	Yellow, friable, separated
1.50	18.50 ^e	0.72 ^d	6.2	Yellow, friable, separated
1.75	18.21 ^e	0.71 ^d	6.1	Yellow, friable, separated
2.00	17.24 ^f	0.65 ^e	5.7	Light yellow, watery
2.25	16.79 ^f	0.62 ^f	5.6	Light yellow, watery

3.1.2. Effects of plant growth regulators' combinations on callus growth

As is highlighted in Tables 3.1 and 3.2, NAA was more suitable than 2,4-D for stimulating callus growth. Thus, we combined 1.25 mg/L NAA and different concentrations of KIN in this experiment to determine the best combination for the growth of longjack calli.

Table 3.3. Effects of NAA-KIN combinations on the growth of longjack calli

NAA (mg/l)	KIN (mg/l)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Growth index	Callus characteristic
1.25	0.50	23.43 ^c	0.92 ^c	7.8	Light yellow, watery
	0.75	30.98 ^{ab}	1.26 ^a	10.3	Light yellow, watery
	1.00	32.34 ^a	1.31 ^a	10.7	Yellow, friable, separated
	1.25	28.80 ^b	1.11 ^b	9.6	Yellow, friable, separated
	1.50	24.65 ^c	0.94 ^c	8.2	Yellow, friable, separated
	1.75	20.49 ^d	0.79 ^d	6.8	Light yellow, watery
	2.00	18.70 ^d	0.78 ^d	6.2	Light yellow, watery

The optimal fresh weights (30.98 – 32.34 g/flask), dry weights (1.26 – 1.31 g/flask), and GIs (10.3 – 10.7) were obtained in the MS media given 1.25 mg/L NAA and 0.75 – 1.00 mg/L KIN (Table 3.3). These results proved that NAA-KIN combinations further improved the growth of calli compared to individual plant growth regulators.

3.1.3. The accumulation of eurycomanone in longjack calli

The HPLC analysis results of the 14-day-old callus (obtained from the MS medium given 1.25 mg/L NAA and 1.00 mg/L KIN) and the five-year-old longjack roots showed that all the samples had one peak, with the retention time being similar to standard eurycomanone solution of 4.15 minutes. Eurycomanone concentration in callus was 0.17 mg/g dry matter, which was equal to 8 % of the eurycomanone content in longjack roots (2.09 mg/g).

3.2. LONGJACK CELL SUSPENSION CULTURE

3.2.1. Constructions of the growth curve and eurycomanone accumulation curve

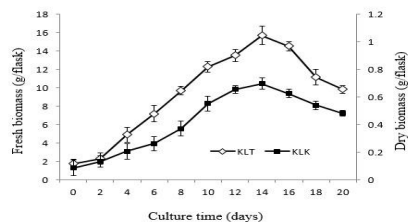


Figure 3.1. The suspension-cultured cells' growth curve

The lag phase of suspension-cultured cells was short (approximately two days). Cells' exponential phase lasted for about 14 days. The stationary phase was extremely short and it was immediately followed by the death phase (Figure 3.1). The biomass reached its maximum value on the 14th day, from 1.7 g of initial cultured cells. The optimal fresh weight of 15.67 g/flask (0.69 g dry biomass/flask), obtained on day 14, was 9.21 times higher than that of the initial biomass.

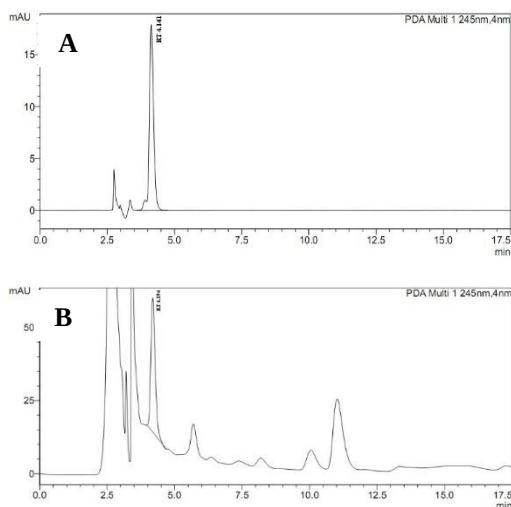


Figure 3.2. Chromatograms of HPLC analyses for cells' eurycomanone concentration determination. **A.** Standard eurycomanone, **B.** Eurycomanone extract obtained from 14-day-old suspension-cultured cells

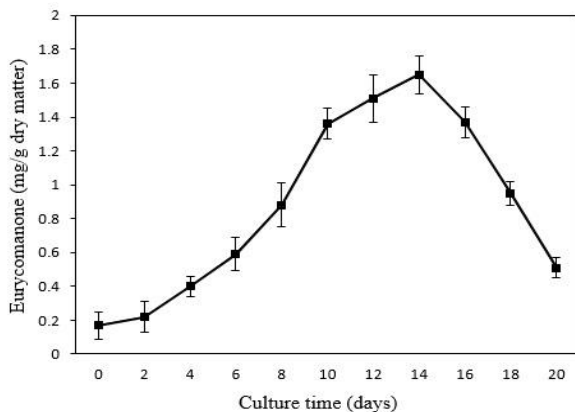


Figure 3.3. Eurycomanone accumulation curve

According to the HPLC analysis, the retention time of cell extract (4.194 minutes) was similar to that of standard eurycomanone solution (4.141 minutes) (Figure 3.2). Therefore, eurycomanone was synthesized by longjack *in vitro* cells. Additionally, its biological modifications seem to be insignificant.

Eurycomanone accumulation started from day 0 to day 20. Being similar to cell biomass, the highest eurycomanone concentration (1.65 mg/g dry matter) was also obtained on day 14 (Figure 3.3).

3.2.2. Effects of carbon sources on cell growth

3 % glucose was the most suitable for cell growth, with the maximum fresh weight of 20.30 g. However, cells' dry weight (0.59 g) was low in the MS medium given 3 % glucose (Table 3.4). In contrast, the optimal cells' dry weight of 0.72 g was obtained from the medium supplemented with 3 % sucrose, though this medium could not stimulate the formation of cells with high fresh weight (17.43 g). Cells did not grow, became brown, and died after several days on the medium added with fructose.

Table 3.4. The impacts of carbon sources on longjack cells' growth

Carbon sources		Fresh weight	Dry weight	Eurycomanone
(%)		(g)	(g)	(mg/g)
Glucose	2	17.58 ^b	0.43 ^c	0.47 ^e
	3	20.30 ^a	0.59 ^b	0.77 ^d
	4	12.57 ^c	0.44 ^c	1.36 ^b
Sucrose	2	17.62 ^b	0.44 ^c	1.54 ^{ab}
	3	17.43 ^b	0.72 ^a	1.70 ^a
	4	18.00 ^b	0.61 ^b	1.11 ^c
Fructose	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-

The maximum eurycomanone concentration (1.70 mg/g) was obtained from the medium supplemented with 3 % sucrose. Sucrose's impacts on eurycomanone accumulation were stronger than glucose.

3.2.3. Effects of pH on cell growth

In our study, the pH values of the culture medium were adjusted in the range of 4.75 – 6.75 before autoclaving. The highest fresh weight (17.27 g/flask), dry weight (0.76 g/flask), and eurycomanone concentration (1.67 mg/g dry matter) were obtained on the medium with a pH value of 5.75 (Table 3.5).

Table 3.5. The impacts of pH on longjack cells' growth

pH	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Eurycomanone (mg/g)
4.75	11.04 ^d	0.49 ^d	0.49 ^c
5.25	15.47 ^b	0.68 ^b	1.38 ^b
5.75	17.27 ^a	0.76 ^a	1.67 ^a
6.25	13.68 ^c	0.60 ^c	1.34 ^b
6.75	13.52 ^c	0.60 ^c	1.31 ^b

3.3. EFFECTS OF ELICITORS ON CELL GROWTH AND EURYCOMANONE ACCUMULATION

3.3.1. *The impacts of elicitor concentrations on eurycomanone accumulation*

3.3.1.1. Effects of yeast extract on cell growth and eurycomanone accumulation

YE had inhibitory effects on cell growth, with the dry weight ranging from 0.41 to 0.51 g/flask (control's dry weight: 0.72 g/flask) (Table 3.6). However, the optimal eurycomanone concentration (3.71 mg/g dry matter), which was two times higher than the control, was obtained from the medium given 200 mg/L YE (1.82 mg/flask).

Table 3.6. The impacts of YE on longjack cell growth and eurycomanone accumulation

YE (mg/L)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Eurycomanone (mg/g)
Control	17.43 ^a	0.72 ^a	1.70 ^d
20	14.70 ^{bc}	0.42 ^e	1.61 ^d
50	14.98 ^b	0.47 ^d	1.71 ^d
100	15.24 ^b	0.46 ^d	1.79 ^d
150	13.96 ^c	0.41 ^e	2.28 ^c
200	17.08 ^a	0.49 ^c	3.71 ^a
250	16.68 ^a	0.51 ^b	3.07 ^b

Control: no YE supplemented

3.3.1.2. Effects of methyl jasmonate on cell growth and eurycomanone accumulation

In contrast to YE, MeJA significantly affected the longjack cells' growth. Cell growth fell when MeJA concentration increased from 0.01 to 0.50 mM. Cells were brown and did not grow on the medium supplemented with 1.00 mM MeJA (Table 3.7). However, the highest eurycomanone concentration of 6.60 mg/g dry matter, which was four times higher than the control, was obtained from the medium given 0.02 mM MeJA (3.16 mg/flask).

Table 3.7. The impacts of methyl jasmonate on longjack cell growth and eurycomanone accumulation

MeJA (mM)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Eurycomanone (mg/g)
Control	17.43 ^a	0.72 ^a	1.70 ^c
0.01	10.58 ^b	0.43 ^c	5.17 ^b
0.02	8.14 ^c	0.48 ^c	6.60 ^a
0.05	5.22 ^d	0.61 ^b	1.23 ^d
0.10	2.29 ^e	0.33 ^d	1.11 ^d
0.20	1.63 ^f	0.22 ^e	0.51 ^f
0.50	0.76 ^g	0.07 ^f	0.85 ^e
1.00	-	-	-

Coltrol: no MeJA supplemented

3.3.1.3. Effects of salicylic acid on cell growth and eurycomanone accumulation

Table 3.8. The impacts of salicylic acid on longjack cell growth and eurycomanone accumulation

SA (mM)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Eurycomanone (mg/g)
Control	17.43 ^b	0.72 ^a	1.70 ^b
0.01	16.32 ^c	0.48 ^{bc}	3.30 ^a
0.02	19.08 ^a	0.56 ^b	3.51 ^a
0.05	14.67 ^d	0.52 ^b	3.35 ^a
0.10	2.86 ^e	0.37 ^c	0.90 ^c
0.20	-	-	-
0.50	-	-	-
1.00	-	-	-

Coltrol: no SA supplemented

SA concentrations, which are higher than 0.05 mM, had great inhibitory effects on longjack cell growth (Table 3.8). Cells were brown and did not grow on the media supplemented with 0.20 – 1.00 mM SA. Eurycomanone content of cells cultured on the medium

containing 0.02 mM SA was two times higher than the control, with the eurycomanone concentration of 3.51 mg/g_{dry matter} (1.96 mg/flask).

3.3.2. The impacts of elicitors' treatment time on eurycomanone accumulation

3.3.2.1. Effects of YE's treatment time on eurycomanone accumulation

The maximum eurycomanone content of 6.25 mg/g dry matter (3.125 mg/flask), which was 3.68 and 2.98 times higher than the control and the five-year-old natural roots, was obtained by using 200 mg/L YE on day 6 of culture (Table 3.9).

Table 3.9. The impacts of YE's treatment time on eurycomanone accumulation

Treatment time (day)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Eurycomanone (mg/g)
0	17.08 ^b	0.49 ^a	3.71 ^c
2	16.86 ^b	0.49 ^a	3.87 ^c
4	17.20 ^b	0.50 ^a	4.83 ^b
6	16.67 ^b	0.50 ^a	6.25 ^a
8	18.21 ^a	0.52 ^a	4.49 ^b
10	17.01 ^b	0.50 ^a	2.12 ^d
12	18.42 ^a	0.50 ^a	2.02 ^d

3.3.2.2. Effects of MeJA's treatment time on eurycomanone accumulation

0.02 mM MeJA had great negative impacts on the increase of cells' fresh weight. Specifically, the inhibitory level of MeJA on cells' growth increased when the MeJA treatment time rose. In contrast, the increment of cells' dry weight was observed when cells were treated with MeJA on days 8 – 10. Eurycomanone content in cells elicited by MeJA after four days of culture reached the highest value of 17.36 mg/g dry matter (9.54 mg/flask), which was ten and eight times higher than the control and the five-year-old natural root sample (Table 3.10).

3.3.2.3. Effects of SA's treatment time on eurycomanone accumulation

All tested 0.02 mM SA treatment times made cells' fresh weight decrease. Supplementing SA on days 2 – 6 had the greatest

inhibitory effects on cell growth. The highest eurycomanone content was only 5.20 mg/g dry matter (2.44 mg/flask) when SA treatment was applied after four days of culture (Table 3.11).

All the above-mentioned results showed that elicitors' treatment time could affect eurycomanone biosynthesis. In contrast, elicitors' treatment time did not affect cell growth. Particularly, in all tested treatment times, cells' dry weight always ranged from 0.46 to 0.56 g/flask.

Table 3.10. The impacts of MeJA's treatment time on eurycomanone accumulation

Treatment time (day)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Eurycomanone (mg/g)
0	8.14 ^e	0.48 ^{ab}	6.60 ^d
2	8.32 ^e	0.50 ^{ab}	12.83 ^b
4	9.21 ^d	0.55 ^a	17.36 ^a
6	10.43 ^c	0.56 ^a	9.18 ^c
8	11.40 ^b	0.49 ^{ab}	5.99 ^d
10	13.83 ^a	0.42 ^b	3.81 ^e
12	14.09 ^a	0.43 ^b	2.77 ^f

Table 3.11. The impacts of SA's treatment time on eurycomanone accumulation

Treatment time (day)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Eurycomanone (mg/g)
0	19.08 ^a	0.56 ^a	3.51 ^c
2	15.58 ^c	0.46 ^b	4.26 ^b
4	16.00 ^c	0.47 ^b	5.20 ^a
6	15.90 ^c	0.47 ^b	5.01 ^a
8	17.09 ^b	0.50 ^{ab}	2.37 ^d
10	18.00 ^b	0.53 ^a	2.01 ^d
12	17.36 ^b	0.50 ^{ab}	1.97 ^d

Chapter 4

DISCUSSION

4.1. EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS ON CALLUS GROWTH

There are many authors reporting the impacts of plant growth regulators on the growth of longjack callus. Mahmood et al. (2010) claimed that 2,4-D was the most suitable auxin for longjack callus induction and multiplication from many types of explants (leaves, petioles of single and double compound leaves, and cotyledons). The highest induction rates (78.33 – 88.33 %) were obtained from media given 2,4-D (Mahmood, 2010). Thus, we examined 2,4-D first for its effects on callus growth. However, our study results showed that 2,4-D was not the best plant growth regulator for callus growth, with the low GI of 2.52 obtained from the medium added with 2 mg/L 2,4-D (Table 3.1).

Several studies indicated that auxin-cytokinin combinations could stimulate callus formation of many plant species. Therefore, we tested the effects of NAA-KIN combinations on the growth of longjack callus and obtained good results. Specifically, the highest fresh weight (32.34 g/flask), dry weight (1.31 g/flask), and GI (10.70) were obtained by combining 1.25 mg/L NAA and 1.00 mg/L KIN (Table 3.3). NAA-KIN combinations have been globally used in longjack callus culture for secondary metabolite productions. However, NAA and KIN concentrations utilized by other authors were lower than those utilized by us.

4.2. CELL SUSPENSION CULTURE ESTABLISHMENT

4.2.1. Fresh and dry biomass accumulations in cell suspension culture

In our study, the optimal cell growth was observed on day 14 of culture (Figure 3.3), with the fresh weight of 15.67 g/flask (0.69 g dry cells/flask), which was 9.21 times higher than the initial fresh weight. Our results were better than previously published research of

several authors. Specifically, Keng et al. (2010) cultured 0.5 g of longjack cells on the MSB medium (a modified version of the MS medium) given 2 mg/L NaH_2PO_4 and obtained the highest fresh weight (3.1 g) and dry weight (0.22 g) of cells on day 13.

4.2.2. Eurycomanone accumulation in cell suspension culture

Many previously published studies have demonstrated that secondary metabolite contents in plant cells or calli were higher than those in the naturally cultivated plants in most cases. Nguyen Hoang Loc et al. (2010, 2011) researched into producing solasodine from *Solanum trilobatum*. The authors found that solasodine concentration in *S. trilobatum* calli was 8.5 times higher than that in the one-year-old naturally grown plant. In the case of longjack, eurycomanone was synthesized from day 0 to day 20 of culture, with the maximum eurycomanone concentration (1.65 mg/g dry matter) and biomass obtained on day 14 (Figure 3.7). These results were higher than those of Mohamad et al. (2013), who reported a low eurycomanone content (1.4 mg/g dry matter) in six-to-seven-year-old longjack (from Muar, Malaysia).

4.2.3. Effects of carbon sources and pH

Carbon sources can affect cell development and the biosynthesis of plant-originated substances in micropropagation. In our study, 3 % sucrose was the most suitable carbon source for cell growth. Cells could grow relatively well in the medium given 3 % sucrose, with the fresh weight, dry weight, and eurycomanone concentration of 17.43 g, 0.72 g, and 1.7 mg/g, respectively.

Medium' pH also has impacts on cell growth and bioactive compound accumulations. In our study, 5.75 was the best pH value, with fresh weight, dry weight, and eurycomanone concentration of 17.27 g, 0.76 g, and 1.67 mg/g dry matter, respectively. Our result was similar to that of Siregar et al. (2004), who also claimed that 5.75 was the optimal pH for longjack cell growth.

4.3. EFFECTS OF ELICITORS ON CELL GROWTH AND EURYCOMANONE ACCUMULATION

4.3.1. Effects of elicitors on cell growth

Supplementing elicitors into culture media generally inhibits cell growth, as stated in many previous studies. In our study, YE had little effect on cell growth. In contrast, MeJA and low concentrations of SA had great inhibitory and stimulatory impacts on the growth of cultured cells, respectively (Table 3.6 – 3.8).

YE contains many amino acids, vitamins, and minerals. Thus, it generally does not harm longjack cell growth and fresh weight increment (Table 3.6). MeJA is a cell growth inhibitor and enhances secondary metabolite biosynthesis in cultured *Bupleurum falcatum* L., *Taxus* spp. roots and rice. In our study, longjack cell growth was strongly inhibited by MeJA (Table 3.7). This result was in line with previous works about MeJA's inhibitory effects on plant cell growth. In terms of SA, in most previous studies, SA suppressed cell growth. In our study, the fresh weight and dry weight of cells cultured in the medium with SA were also lower than those in the medium without SA.

4.3.2. Effects of elicitors on eurycomanone accumulation

Our study results showed that YE could affect eurycomanone accumulation of longjack cells. YE concentrations of 150 – 250 mg/L stimulated eurycomanone biosynthesis, with the maximum eurycomanone concentration (being two times higher than the control) obtained by using 200 mg/L YE (Table 3.6).

The eurycomanone concentration of 6.60 mg/g dry matter (which was two and four times higher than YE and the control, respectively) was obtained by using 0.02 mM MeJA (Table 3.7). MeJA impacts on longjack cells' eurycomanone biosynthesis were clearer than SA and YE.

Using SA as an elicitor for enhancing secondary metabolite productions in plant micropropagation is common. Eurycomanone

concentration in longjack cells increased when SA concentrations rose from 0.01 to 0.05 mM. Cells did not grow and died at SA concentrations being higher than 0.05 mM. The highest eurycomanone concentration (3.51 mg/g dry matter), which was nearly equal to YE treatment and 50 % lower than MeJA treatment, was obtained by 0.02 mM SA. In our study, the tested SA concentrations (0.01 – 0.05 mM) were low and similar to several published studies. To illustrate, Yousefzadi et al. (2010) used 10 μ M SA on day 3 of *Linum album* cell culture. The obtained podophyllotoxin concentration was 333 μ g/g dry matter, which was three times higher than cells cultured on media without SA.

4.3.2. Effects of elicitors' treatment time

Elicitor treatments at the beginning of culture inhibited longjack cell growth. The dry weight values of cells elicited by YE, MeJA, and SA were only equal to 0.57 – 0.71 %, 0.10 – 0.85 %, and 0.51 – 0.78 % of the control's dry weight after 14 days of culture, respectively ($p < 0.05$). In contrast, eurycomanone concentrations of cells treated with YE, MeJA, and SA increased 1.34 – 2.18, 0.1 – 0.85, and 3.04 – 3.88 times, respectively ($p < 0.05$). The optimal elicitor treatment time depends on different plant species. Our results showed that the most suitable time for elicitor treatment of longjack cells was from day 4 to day 6 after being cultured.

CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS

CONCLUSIONS

From the study results, we came to the following conclusions:

1. The optimal medium for longjack callus culture was the MS medium given 1.25 mg/L NAA and 1.00 mg/L KIN, with the highest GI, dry weight, and eurycomanone concentration of 10.07, 1.31 g/flask, and 0.17 mg/g dry matter, respectively.

2. The best condition for longjack cell suspension culture was the liquid MS medium (pH 5.75) supplemented with 1.25 mg/L NAA, 1.00 mg/L KIN, and 3 % sucrose. The highest obtained fresh weight, dry weight, and eurycomanone concentration were 17.27 g/flask, 0.76 g/flask, and 1.67 mg/g dry matter, respectively, after 14 days of culture.

3. Methyl jasmonate was the most suitable elicitor for enhancing eurycomanone biosynthesis of longjack cells. Supplementing 0.02 mM MeJA into the medium on day 4 of culture increased eurycomanone concentration to 17.36 mg/g dry matter, which was ten and eight times higher than the cells not elicited and the five-year-old natural root sample, respectively.

SUGGESTION

This research should be further improved to be more practical and scaled up to the pilot plant. Additionally, more elicitors should also be tested. All these improvements would complete the procedure of producing eurycomanone, which could be applied for industrial-scale production.

AUTHOR'S PUBLICATIONS RELATED TO THE DISSERTATION

5. Nguyen Huu Nhan, Nguyen Hoang Loc (2017). Production of eurycomanone from cell suspension culture of *Eurycoma longifolia*. *Pharmaceutical biology*, 55(1): 2234-2239. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1400077>
6. Nguyen Huu Nhan, Nguyen Hoang Loc (2018). Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of longjack (*Eurycoma longifolia*) by elicitor treatment. *Journal of Plant Biotechnology*, 45(4): 340-346. <https://doi.org/JPB-45-340>
7. Nguyen Huu Nhan, Hoang Tan Quang, Nguyen Hoang Loc (2019). Effects of culture media on growth ability of *Eurycoma longifolia* Jack callus. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 128 (1E): 69-76.
8. Nguyen Huu Nhan, Hoang Tan Quang, Nguyen Hoang Loc (2020). Effects of culture media and conditions on growth ability of *Eurycoma longifolia* Jack suspension cells. *Journal of Science and Technology, University of Sciences, Hue University*, 16(2):155-165.