

**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 CẤY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO CÂY BÁCH
BỆNH (*Eurycoma longifolia* JACK)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ - NĂM 2021

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 CẤY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO CÂY BÁCH
BỆNH (*Eurycoma longifolia* JACK)**

Ngành: SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

Mã số: 9420112

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

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

HUẾ - NĂM 2021

MỤC LỤC

MỤC LỤC	i
LỜI CẢM ƠN	v
LỜI CAM ĐOAN	vi
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC BẢNG.....	ix
DANH MỤC HÌNH	x
MỞ ĐẦU	1
1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI	1
2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU	3
4. NỘI DUNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU.....	4
5. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	5
Chương 1	6
TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	6
1.1. GIỚI THIỆU CÂY BÁCH BỆNH.....	6
1.1.1. Đặc điểm sinh học cây bách bệnh.....	6
1.1.2. Thành phần hóa học chủ yếu của cây bách bệnh.....	8
1.1.3. Đặc tính dược lý của cây bách bệnh.....	12
1.1.3.1. Hoạt tính chống sốt rét.....	12
1.1.3.2. Hoạt tính chống ung thư.....	13
1.1.3.3. Hoạt tính chống bệnh tiểu đường	14
1.1.3.4. Hoạt tính kích thích sinh dục.....	14
1.1.3.5. Hoạt tính kháng khuẩn	16
1.1.3.6. Hoạt tính chống loãng xương.....	16
1.1.3.7. Hoạt tính kháng viêm.....	16
1.1.4. Một số công trình nuôi cấy <i>in vitro</i> cây bách bệnh.....	18
1.2. HỢP CHẤT THỨ CẤP THỰC VẬT	20

1.2.1. Vai trò của các hợp chất thứ cấp ở thực vật	20
1.2.2. Sản xuất hợp chất thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào.....	21
1.2.3. Chiến lược trong sản xuất các sản phẩm thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào	23
1.3. CHẤT KÍCH KHÁNG THỰC VẬT	24
1.3.1. Định nghĩa chất kích kháng và sự kích kháng.....	24
1.3.2. Phân loại chất kích kháng	24
1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình kích kháng	27
1.3.3.1. Nồng độ chất kích kháng.....	27
1.3.3.2. Thời gian tiếp xúc với chất kích kháng	28
1.3.3.3. Thời kỳ nuôi cấy	28
1.3.3.4. Thành phần dinh dưỡng	28
1.3.4. Quá trình kích kháng và sản xuất các hợp chất thứ cấp ở thực vật	29
1.3.5. Ứng dụng của các chất kích kháng lên sự tích lũy các hợp chất thứ cấp.....	32
1.3.5.1. Ảnh hưởng của chất kích kháng phi sinh học	32
1.3.5.2. Ảnh hưởng của các chất kích kháng sinh học	35
1.4. GIỚI THIỆU VỀ EURYCOMANONE	38
1.4.1. Tổng quan về eurycomanone	38
1.4.2. Sản xuất eurycomanone bằng nuôi cấy mô tế bào	40
Chương 2	41
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	41
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	41
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	42
2.2.1. Môi trường và điều kiện nuôi cấy ban đầu	42
2.2.2. Nuôi cấy callus cây bách bệnh.....	43
2.2.3. Nuôi cấy huyền phù tế bào cây bách bệnh	43
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.....	44

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	45
2.2.6. Xử lý chất kích kháng	45
2.2.7. Chiết xuất eurycomanone	46
2.2.8. Phân tích HPLC	47
2.2.9. Xử lý thống kê	47
Chương 3	48
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	48
3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CALLUS	48
3.1.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ	48
3.1.1.1. Ảnh hưởng của 2,4-D	48
3.1.1.2. Ảnh hưởng của NAA	49
3.1.2. Ảnh hưởng của kết hợp các chất ĐHST	50
3.1.3. Sự tích lũy eurycomanone trong callus cây bách bệnh	51
3.2. THIẾT LẬP NUÔI CẤY HUYỀN PHỤ TẾ BÀO	53
3.2.1. Xây dựng đường cong sinh trưởng và tích lũy eurycomanone	53
3.2.2. Ảnh hưởng nguồn carbon đến sự sinh trưởng của tế bào	57
3.2.3. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng của tế bào	59
3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT KÍCH KHÁNG LÊN SỰ SINH TRƯỞNG TẾ BÀO VÀ TÍCH LŨY EURYCOMANONE	59
3.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất kích kháng	59
3.3.1.1. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men	60
3.3.1.2. Ảnh hưởng của methyl jasmonate	60
3.3.1.3. Ảnh hưởng của salicylic acid	62
3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời điểm kích kháng	63
3.3.2.1. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng YE lên sự tích lũy eurycomanone	63

3.3.2.2. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng MeJA lên sự tích lũy eurycomanone	65
3.3.2.3. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng SA lên sự tích lũy eurycomanone	66
Chương 4	69
BÀN LUẬN	69
4.1. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CALLUS	69
4.2. THIẾT LẬP NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO	70
4.3. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT KÍCH KHÁNG LÊN SỰ SINH TRƯỞNG TẾ BÀO VÀ TÍCH LŨY EURYCOMANONE	76
4.3.1. Ảnh hưởng của chất kích kháng lên sinh trưởng tế bào	76
4.3.2. Ảnh hưởng của chất kích kháng lên tích lũy eurycomanone	79
4.3.3. Ảnh hưởng của thời gian kích kháng	83
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	86
KẾT LUẬN	86
KIẾN NGHỊ	86
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	87
TÀI LIỆU THAM KHẢO	88

LỜI CẢM ƠN

Hoàn thành luận án này, trước hết chúng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS.TS Nguyễn Hoàng Lộc đã quan tâm giúp đỡ và hướng dẫn tận tình.

Xin được bày tỏ lòng biết ơn đến cán bộ giảng viên của Bộ môn Sinh học Ứng dụng, Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế; Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế; Trung tâm Nghiên cứu và chuyển giao công nghệ, Trường Cao đẳng Lương thực – Thực phẩm đã giúp đỡ chúng tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài.

Xin cảm ơn Ban Giám đốc, Ban đào tạo và Công tác Sinh viên Đại học Huế; Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học, Ban chủ nhiệm Khoa sinh học-Trường Đại học Khoa học- Đại học Huế ; Ban Giám hiệu, Khoa Công nghệ Sinh học-Trường Cao đẳng Lương thực – Thực phẩm, Đà Nẵng đã có nhiều giúp đỡ quý báu, tạo mọi điều kiện tốt nhất để chúng tôi hoàn thành luận án.

Xin cảm ơn TS. Võ Châu Tuấn đã cung cấp callus cây bách bệnh, là đối tượng nghiên cứu, để chúng tôi thực hiện nội dung của luận án.

Xin cảm ơn các đồng nghiệp, bạn bè đã nhiệt tình động viên, hỗ trợ chúng tôi hoàn thành luận án.

Cuối cùng, xin được bày tỏ lòng biết ơn đến những người thân trong gia đình đã luôn giúp đỡ, động viên và khích lệ cả vật chất lẫn tinh thần để chúng tôi hoàn thành luận án này.

Xin trân trọng cảm ơn!

Huế, ngày tháng năm 2020

Tác giả

Nguyễn Hữu Nhân

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực, khách quan, nghiêm túc và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Nếu có gì sai sót tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm.

Tác giả luận án

Nguyễn Hữu Nhân

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

2,4D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
ATP	Adenosine triphosphate
BW	Body weight (trọng lượng cơ thể)
CDPK	Ca ²⁺ -dependent protein kinase
Cs	Cộng sự
DNA	Deoxyribonucleic acid
DW	Dry weight (khối lượng khô)
ĐC	Đối chứng
ĐHST	Điều hòa sinh trưởng
Eur	Eurycomanone
ET	Ethylene
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry (sắc ký khí ghép khối phổ)
GI	Growth index (chỉ số sinh trưởng)
HIV	Human immuno-deficiency virus (virus gây suy giảm miễn dịch ở người)
HPLC	High-performance liquid chromatography (sắc ký lỏng hiệu năng cao)
IAA	β -indol-acetic acid
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50% (nồng độ ức chế tối đa 50%)
JA	Jasmonic acid
JAS	Jasmonate
KIN	Kinetin
KLK	Khối lượng khô
KLT	Khối lượng tươi

LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MeJA	Methyl jasmonate
MS	Murashige and Skoog (1962)
NAA	Naphthaleneacetic acid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Cộng hưởng từ hạt nhân)
NO	nitrit oxyde
OG	Oligogalacturonide
PK	Protein kinase
PAA	Phenylacetic acid
PAL	Phenylalanine ammonia lyase
PVP	Polyvinylpyrrolidone
QCM sensor	Quartz crystal microbalance sensor (cảm biến vi cân tinh thể thạch anh)
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species (các gốc tự do oxy hóa)
SA	Salicylic acid
SAMK	Stress-activated MAPK
SIMK	Salt-induced MAPK
SIPK	SA-induced protein kinase
TIA	Terpenoid indol alkaloid
UV	Ultraviolet (tia cực tím)
YE	Yeast extract (dịch chiết nấm men)
W	Weight (khối lượng)
WIPK	Wound-induced protein kinase

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D lên khả năng sinh trưởng của callus	49
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh	49
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của NAA và KIN đến khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh.....	51
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sự sinh trưởng của tế bào cây bách bệnh.....	58
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào huyền phù cây bách bệnh.....	59
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men lên sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào cây bách bệnh	60
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của methyl jasmonate lên sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào	61
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của salicylic acid lên sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào	63
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng YE lên sự tích lũy eurycomanone	64
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng MeJA lên sự tích lũy eurycomanone	66
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng SA lên sự tích lũy eurycomanone	67
Bảng 3.12. Tổng hợp kết quả xử lý kích kháng tốt nhất của từng chất.....	68

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của một số hợp chất có hoạt tính sinh học trong cây bách bệnh.....	9
Hình 1.2. JA và các dẫn xuất của nó.....	26
Hình 2.1. Cây bách bệnh 3 năm tuổi (bên trái) và 2 năm tuổi (bên phải)	41
Hình 2.2. Callus cây bách bệnh sau 14 ngày nuôi cấy	41
Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm.....	42
Hình 3.1. Callus sinh trưởng trên môi trường có 1,25 mg/L NAA (A) và 2,25 mg/L NAA (B) sau 14 ngày nuôi cấy.	50
Hình 3.2. Phổ HPLC phân tích hàm lượng eurycomanone trong callus.	52
Hình 3.3. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù cây bách bệnh sau 20 ngày nuôi cấy (KLT: Khối lượng tươi, KKK: Khối lượng khô).	54
Hình 3.4. Tế bào huyền phù trong bình tam giác 250 mL chứa 50mL môi trường sau 14 ngày nuôi cấy.....	54
Hình 3.5. Sinh khối tươi và khô của tế bào cây bách bệnh.	55
Hình 3.6. Phổ HPLC phân tích hàm lượng eurycomanone trong tế bào.	56
Hình 3.7. Đường cong tích lũy eurycomanone của tế bào huyền phù cây bách bệnh sau 20 ngày nuôi cấy.....	57
Hình 3.8. Sinh khối tươi (A) và khô (B) của tế bào khi xử lý 0,02 mM MeJA sau 14 ngày nuôi cấy.	62
Hình 3.9. Phổ HPLC của eurycomanone chuẩn trong thí nghiệm thời điểm kích kháng.....	64
Hình 3.10. Phổ HPLC của dịch chiết eurycomanone khi kích kháng YE 200 mg/L sau 6 ngày nuôi cấy.....	65
Hình 3.11. Phổ HPLC của dịch chiết eurycomanone khi kích kháng MeJA 0,02 mM sau 4 ngày nuôi cấy.....	66
Hình 3.12. Phổ HPLC của dịch chiết eurycomanone khi kích kháng SA 0,02 mM sau 4 ngày nuôi cấy.....	67

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 [32]. Ở Việt Nam, bách bệnh phân bố rải rác ở các tỉnh vùng núi thấp (dưới 1000 m) và trung du. Các tỉnh Tây Nguyên và miền Trung gặp nhiều hơn các tỉnh phía Bắc [2]. 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. Dịch chiết của rễ còn được dùng để giảm huyết áp, sốt và sự mệt mỏi. 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, ... [32], [56]. 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 [56]. 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.

Công nghệ sinh học sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp có giá trị bằng nuôi cấy cơ quan hoặc tế bào thực vật là phương thức thay thế hấp dẫn cho việc chiết xuất từ nguyên liệu cây hoàn chỉnh [102]. Nuôi cấy tế bào thực vật có thể cung cấp liên tục nguồn nguyên liệu để tách chiết một lượng lớn các hoạt chất từ tế bào nuôi cấy mà không phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên [98]. Nhiều chiến lược mang tính Công nghệ sinh học đã được đưa ra về cả lý thuyết và thực nghiệm để tăng cường sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp từ

thực vật. Chẳng hạn như sàng lọc dòng tế bào cho năng suất cao, cải tiến môi trường dinh dưỡng, bổ sung các tiền chất, nuôi cấy quy mô lớn trong hệ thống bioreactor, nuôi cấy rễ tơ, cố định tế bào thực vật, chuyển hóa sinh học [102]... trong đó sử dụng chất kích kháng mang lại hiệu quả cao nhất. Khi chịu sự kích kháng tế bào huyền phù sẽ cảm ứng sản xuất các hợp chất thứ cấp mà bình thường nó không được tổng hợp. Hầu hết những nghiên cứu cho thấy khi bổ sung chất kích kháng vào môi trường nuôi cấy tế bào thực vật đều làm tăng hàm lượng hợp chất thứ cấp. Như vậy, ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật kết hợp với xử lý kích kháng sẽ đem lại thành công trong việc sản xuất các hợp chất thứ cấp có giá trị cao và cơ hội thương mại hóa sản phẩm [34].

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 được phẩm trong nuôi cấy tế bào thực vật [64], [102]. 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 [17]. 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 [30]. 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 [150].

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

2.1. Mục tiêu chung

Xác định được 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).

2.2. Mục tiêu cụ thể

- Xác định được môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của callus cây bách bệnh
- Xây dựng được đường cong sinh trưởng và đường cong tích lũy của huyền phù tế bào cây bách bệnh.
- Xác định được nguồn carbon, pH môi trường nuôi cấy, nồng độ và thời điểm bổ sung chất kích kháng phù hợp nhất cho sự sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của huyền phù tế bào cây bách bệnh.

3. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN

3.1. Ý nghĩa khoa học

Kết quả nghiên cứu của luận án sẽ cung cấp các dẫn chứng khoa học mới, có tính hệ thống về ứng dụng chất kích kháng trong nuôi cấy *in vitro* tế bào cây bách bệnh để sản xuất hợp chất thứ cấp.

Đồng thời là nguồn tài liệu tham khảo hữu ích trong nghiên cứu, giảng dạy về nuôi cấy tế bào và sản xuất các hoạt chất sinh học có giá trị cao từ nuôi cấy tế bào thực vật.

3.2. Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả của luận án là cơ sở khoa học để phát triển hệ thống nuôi cấy

huyền phù tế bào cây bách bệnh ở qui mô lớn, sử dụng chất kích kháng nhằm sản xuất liên tục, ổn định để thu nhận eurycomanone với sản lượng lớn, cung cấp nguồn nguyên liệu đủ, chất lượng dùng làm thuốc, góp phần bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

4. NỘI DUNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

4.1. 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.

4.2. 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 ở quy mô phòng thí nghiệm tại Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường đại học Khoa học, Đại học Huế và Trung tâm Nghiên cứu và chuyển giao công nghệ, Trường Cao đẳng Lương thực-Thực phẩm, Đà Nẵng.

5. 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.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. GIỚI THIỆU CÂY BÁCH BỆNH

1.1.1. Đặc điểm sinh học cây bách bệnh

Tên khoa học: cho đến nay bách bệnh có 4 loài khác nhau đã được báo cáo là *E. longifolia*, *Entomophthora apiculata*, *Polyathia bullata* và *Goniothalamus* sp. thuộc họ Simaroubaceae [32]. trong đó *E. longifolia* là loài phổ biến nhất, được sử dụng thường xuyên cho các phương thuốc truyền thống. *E. Longifolia* được gọi bởi nhiều tên khác nhau tùy thuộc vào mỗi quốc gia như: tongkat ali ở Malaysia và Singapore, pasak bumi ở Indonesia, tung saw ở Thái Lan. Ở Việt Nam cây này có nhiều tên gọi khác nhau như bách bệnh, bá bệnh, mật nhân.

Hệ thống phân loại: cây bách bệnh thuộc

- Giới (kingdom): Thực vật (Plantae)
- Ngành (Division): Thực vật có hoa (Magnoliophyta)
- Lớp (Class): Thực vật hai lá mầm (Magnoliopsida)
- Bộ (Order): Bồ hòn (Sapindales)
- Họ (Family): Thanh thất (Simaroubaceae)
- Chi (Genus): *Eurycoma*
- Loài (Species): *longifolia* [18]

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. Quả có màu xanh, dài 2-3 cm, chuyển sang màu đỏ thẫm khi chín. Lá xẻ lông chim, mọc xoắn, dài từ 25-40 cm với 10-30 lá chét. Hoa tạo thành

cụm lớn, thuộc dạng đơn tính khác gốc [32].

Ở Việt Nam, bách bệnh phân bố rải rác ở các tỉnh vùng núi thấp (dưới 1000 m) và trung du. Các tỉnh Tây Nguyên và miền Trung gặp nhiều hơn các tỉnh phía Bắc [2]. Nguyễn Thành Mến và cs (2014) khi nghiên cứu đặc điểm phân bố và sinh thái của cây bách bệnh ở Lâm Đồng cho thấy với đặc điểm biên độ sinh thái rộng, cây bách bệnh có phổ phân bố theo độ cao biến thiên từ điểm thấp nhất khoảng 200 m cho đến độ cao 1.129 m, phân bố tập trung trong khoảng độ cao từ 500 m đến 900 m. Bách bệnh thường xuất hiện nhiều ở dạng địa hình sườn dốc với tỷ lệ 63,0%, ở các đỉnh đồi là 33,3% và nơi chân dốc chỉ 3,7%. Trong tự nhiên, loài bách bệnh thường phân bố theo từng dải và đôi khi mọc thành cụm khoảng 3-8 cây ở ven các rừng lá rộng. Tuy nhiên, hình thức phân bố phân tán ngẫu nhiên là phổ biến [7].

Bách bệnh là loài cây ưa sáng và chịu được khô hạn, các quần thể bách bệnh ít khi mọc theo đám mà thường xuất hiện phân tán ở sườn đồi, ven rừng, khu đất trống hoặc nương rẫy. Đặc biệt, thường gặp cây tái sinh trên các nương rẫy mới và dưới tán rừng thông 3 lá. Về phẩm chất, loài bách bệnh thường sinh trưởng tốt, ít bị sâu bệnh, tỷ lệ cây phẩm chất tốt chiếm đến 92,2% tổng số cây điều tra [7].

Nhìn chung, rễ của cây được thu hoạch thủ công và cần nhiều thời gian, để nhổ một cây có đường kính khoảng 70-100 mm có thể cần đến 8-10 h. Cây sinh trưởng nhanh trên nền cát, đất thoát nước tốt, che bóng một phần và được tưới nước đầy đủ. Cây bách bệnh là loài được thông báo cần được bảo vệ ở hầu hết các vùng mà nó sinh trưởng và việc thu hoạch chúng đã bị nghiêm cấm [32].

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

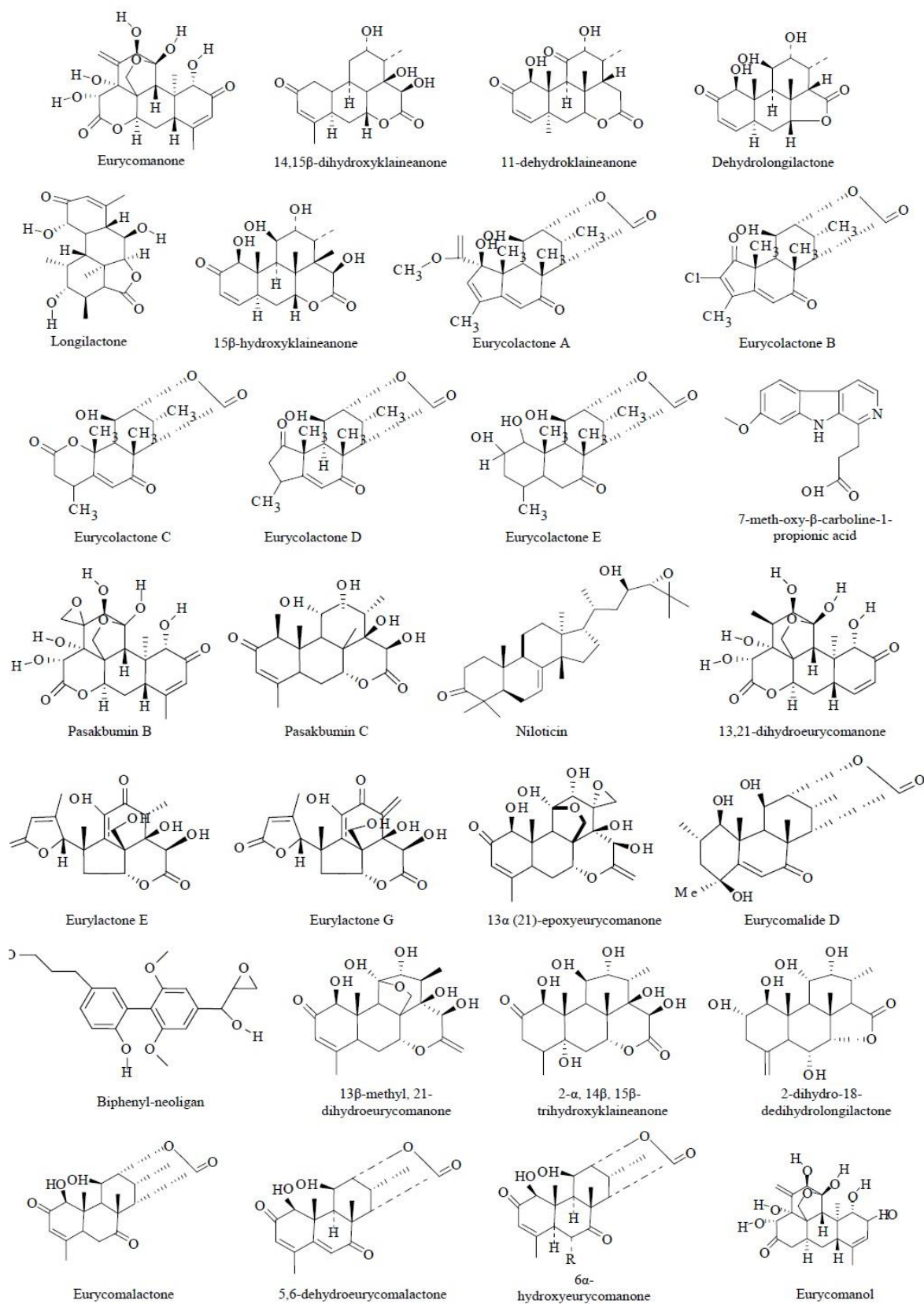
được cho phụ nữ sau khi sinh. Lá của nó được sử dụng bởi các thầy thuốc địa phương để điều trị sốt rét, khối u, bệnh về nướu răng, ngoài ra chúng còn được chữa một số bệnh lây qua đường sinh dục như giang mai, lậu [63].

1.1.2. Thành phần hóa học chủ yếu của cây bách bệnh

Rất nhiều hợp chất hóa học đã được phân lập và phân tích đặc tính từ cây bách bệnh, đặc biệt là từ rễ. Thành phần hoạt chất chính của cây bách bệnh là quassinoid. Quassinoid là một nhóm triterpenoid giảm cấp giàu oxy, có vị đắng, phân bố chủ yếu trong họ *Simaroubaceae*. Công thức hóa học của một số hợp chất chính trong cây bách bệnh được trình bày ở hình 1.1.

Năm 1982, Darise và cs phát hiện trong thành phần của rễ bách bệnh có chứa eurycomanone, eurycomanol, eurycomanone-2-O- β -glycopyranoside và 9-hydroxycanthin-6-one. Năm 1983, các tác giả đã phát hiện được β -sitosterol; 9-hydroxycanthin-6-one-N-oxide trong lá cây này [41].

Từ năm 1990-1993, Morita và cs tìm thấy các hợp chất eurycomanol, klaineanone; 11-ketone trong thành phần hóa học của cây bách bệnh. Đã phân lập được 2 đồng phân mới là 2,2'-dimethoxy-4-(3-hydroxy-1-propenyl)-4'-(1,2,3-trihydroxypropyl) diphenyl ether, và 2 biphenyl mới 2-hydroxy-3,2',6'-trimethoxy-4'-(2,3-epoxy-1-hydroxypropyl)-5-(3-hydroxy-1-propenyl)-biphenyl và 2-hydroxy-3,2'-dimethoxy-4'-(2,3-epoxy-1-hydroxypropyl)-5-(3-hydroxy-1-propenyl)-biphenyl từ thân của cây này. Sau đó, hai hợp chất mới có khung quassinoid (C_{19}): 6-dehydroxylongilactone; 7 α -hydroxyeurycomalactone và 7 hợp chất: 13 α (21)-epoxyeurycomanone; 15-Acetyl-13 α (21)-epoxyeurycomanone; 12,15-diacetyl-13 α (21)-epoxyeurycomanone; 12-acetyl-13,12-dihydroeurycomanone; 15 β -acetyl-14-hydroxyklaineanone; 6 α -acetoxy-14,15 β -dihydroxyklaineanone; 6 α -acetoxy-14,15 β -dihydroxyklaineanone cũng được phân lập [96].



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của một số hợp chất có hoạt tính sinh học trong cây bách bệnh (Abubakar và cs, 2017) [18].

Năm 2001, Jiwajinda và cs đã phân lập được longilactone; 6-dehydroxylongilactone; 11-dehydroxyklaineaneone; 15 β -dihydroxyklaineaneone; 14,15 β -dihydroxyklaineaneone; 15 β -O-acetyl-14-dihydroxyklaineaneone khi nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính của cây bách bệnh [65].

Năm 2004, Kuo và cs đã phân lập gần 65 hợp chất từ rễ của cây bách bệnh, phân tích đặc tính của chúng bằng NMR (Nuclear Magnetic Resonance – Cộng hưởng từ hạt nhân) và phương pháp khối phổ. Trong số đó, lần đầu tiên họ xác định được 4 hợp chất quassinoid diterpenoid có nguồn gốc tự nhiên, đó là: eurycomalide A; eurycomalide B; 13 β , 21-dihydroxyeurycomanol và 5 α , 14 β , 15 β -trihydroxyklaineaneone [70].

Shafiqul và cs (2006) đã phân tích dịch chiết của cây bách bệnh bằng phương pháp GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry - sắc ký khí ghép khối phổ) và phân tích sự tương quan với 12 hợp chất đã được xác định bằng phương pháp QCM sensor (Quartz crystal microbalance sensor - cảm biến vi cân tinh thể thạch anh). Hợp chất chính bay hơi được xác định gồm: curcumene, massoilactone, 3-phenoxy-1-propanol, octanoic acid, benzoic, acetic acid, menthol, 2-phenoxyethanol, 4-ethynyl-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-2-cyclohex-1-enone. Từ kết quả đó, sự tương quan được thiết lập giữa khoảng cách mùi vị với cảm biến bằng tinh thể thạch anh để phân loại dịch chiết thực vật nhằm nghiên cứu độ nhạy của công nghệ. Tác giả đã nhấn mạnh khả năng của chiếc mũi điện tử để phát hiện sự thay đổi nhỏ trong mùi hương không chỉ ở cây bách bệnh mà còn có thể phát triển thành phương pháp xác định nhanh mùi hương của các cây thảo mộc khác [123].

Năm 2009, Phan Văn Kiệm và cs đã sử dụng các phương pháp sắc ký khác nhau đã phân lập được 10 hợp chất từ lá của cây bách bệnh, bao gồm: 9-methoxycanthin-6-one; 9-hydroxycanthin-6-one; 11-dehydroklaineaneone;

longilactone; 4(18)-isomer, 2-alcohol-longilactone; eurycomalactone; eurycomanone; 13 β ,18-dihydroeurycomanone; eurylene; kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside [2].

Một β -carboline alkaloid mới là 7-methoxy- (9H- β -carbolin-1-il)-(E)-1-propenoic acid (1) kết hợp cùng với 9-methoxycanthin-6-one (2) và 9-hydroxycanthin-6-one (3) đã được tách chiết từ các mẫu cây rễ tơ của cây bách bệnh. Ảnh hưởng của các hợp chất này đối với việc sản xuất nitric oxyde (NO) cảm ứng với lipopolysaccharide (LPS) tạo ra trong các tế bào RAW264.7 đã được nghiên cứu. Hợp chất số 1 ức chế mạnh quá trình tạo NO trong khi hợp chất 2 và 3 lần lượt có tác dụng yếu và không có tác dụng. Kết quả cho thấy, hợp chất 1 làm giảm sự biểu hiện của cyclooxygenase-2 và cảm ứng tổng hợp oxide nitric [105].

Thành phần hóa học chính của cây bách bệnh được tổng hợp lại như sau [116]:

Quassinoid: bao gồm các dạng của eurycomanone (pasakbumin-A), eurycomanols, pasakbumin-B, hydroxyklaineanones, eurycomalactones, eurycomadilactones, eurylactones, laurycolactones, longilactones, và hydroxyglaucarubol được phân lập từ rễ.

Các chất có nguồn gốc từ squalene bao gồm teurilene, eurylene; 14-deacetyleurylene; và longilene peroxide.

Nhóm biphenyl neolignans: 2-hydroxy-3,2,6-trimethoxy-4-(2,3-epoxy-1-hydroxypropyl)-5-(3-hydroxy-1-propenyl)-biphenyl; two isomeric 2,2-dimethoxy-4-(3-hydroxy-1-propenyl)-4-(1,2,3-trihydroxypropyl) diphenyl ethers; and 2-hydroxy-3,2-dimethoxy-4-(2,3-epoxy-1-hydroxypropyl)-5-(3-hydroxy-1-propenyl)biphenyl.

Alkaloids bao gồm 5,9-dimethoxycanthin-6-one; 9,10-

dimethoxycanthin-6-one, 11-hydroxy-10-methoxycanthin-6-one; 10-hydroxy-9-methoxycanthin-6-one; và 9-methoxy-3-methylcanthin-5,6-dione.

1.1.3. Đặc tính dược lý của cây bách bệnh

Mặc dù một số phương thuốc dân gian sử dụng cây bách bệnh đã được ghi nhận, nhưng giá trị khoa học và dẫn chứng y học vẫn là điều kiện tiên quyết cho mục đích khai thác thương mại.

1.1.3.1. Hoạt tính chống sốt rét

Sốt rét là một trong những căn bệnh gây tử vong cao nhất trên thế giới. Theo ước tính mỗi năm trên thế giới có gần 2-3 triệu người chết vì căn bệnh này, nguyên nhân là do ký sinh trùng thuộc nhóm *Plasmodium*, nhưng đến nay nó vẫn chưa được tiêu diệt do sự kháng thuốc của các loài *Plasmodium* sp. (chủ yếu là *P. falciparum*), đây là bệnh phổ biến ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới như Đông Nam Á và vùng Châu Phi hạ Sahara. Việc chữa trị hiện nay đối với bệnh này là sử dụng các loại thuốc như: chloroquine, artemisinin và clindamycin. Vì vậy rất cần thiết để nghiên cứu và phát triển một loại thuốc chống sốt rét mới hiệu quả hơn, rẻ hơn, dễ sử dụng, an toàn hơn, không bị kháng bởi ký sinh trùng. Để góp phần giải quyết vấn đề này, một vài nghiên cứu đã cung cấp cơ sở khoa học về dịch chiết cây bách bệnh có khả năng chống được bệnh sốt rét [92].

Thực vật được sử dụng trong cộng đồng để điều trị bệnh sốt rét, trong đó cây bách bệnh được sử dụng phổ biến như là một phương thuốc hiệu quả. Các loại thuốc điều trị bệnh sốt rét hiện nay như chloroquine, artemisinin có nguồn gốc từ thực vật. Al-Adhroey và cs (2010) đã khảo sát các loài thực vật được sử dụng truyền thống ở vùng Peninsular, Malaysia để chữa bệnh sốt rét. Họ đã phỏng vấn 233 người bản xứ, các hộ gia đình ở nông thôn và các thầy lang về tên của vài loài thực vật được sử dụng để điều trị bệnh này. Kết quả

cây bách bệnh là loài thực vật được đề cập nhiều nhất. Điều đó có thể nói rằng, cây bách bệnh có tiềm năng phát triển thành nguồn nguyên liệu cho loại thuốc mới để chống lại căn bệnh nguy hiểm này [24].

Mohd Ridzuan và cs (2007) nghiên cứu đặc tính chống bệnh sốt rét của dịch chiết rễ cây bách bệnh đã chuẩn hóa dòng TA164 kết hợp với artemisinin *in vivo* cho thấy rằng sự xử lý kết hợp này đã khử được *Plasmodium yoelii* lây nhiễm trên chuột. Các tác giả đã so sánh hoạt tính kháng sốt rét của dịch chiết chuẩn gồm 3 loại quassinoid chính là: eurycomanone; 13, 21-dihydroeurycomanone và 13 α (21) epoxyeurycomanone với dịch chiết chuẩn kết hợp với artemisinin và nhận thấy rằng sự kết hợp giữa dịch chiết và thuốc đã làm tăng hoạt tính chống sốt rét [95].

Nguyen-Pouplin và cs (2007) đã thử hoạt tính chống sốt rét của dịch chiết cây bách bệnh được sử dụng trong các phương thuốc dân gian ở Việt Nam. Các tác giả đã khám phá ra rằng dịch chiết cây này có hoạt tính kháng sốt rét cao [106].

1.1.3.2. Hoạt tính chống ung thư

Một vài nghiên cứu đã cho thấy dịch chiết cây bách bệnh có khả năng ức chế tế bào ung thư. Hợp chất quassinoid được phân lập từ cây bách bệnh đã cho thấy khả năng gây độc đối với tế bào ung thư biểu mô có nguồn gốc từ tế bào ung thư biểu mô vòm họng (thượng hầu) của người và cảm ứng quá trình apoptosis của tế bào ung thư vú [96]. Kardono và cs (1991) đã phân lập và phân tích đặc tính của 5 thành phần gây độc tế bào từ rễ của cây bách bệnh ở Indonesia. Trong đó, 4 hợp chất alkaloid cho thấy khả năng gây độc tế bào chống lại dòng tế bào kiểu tế bào ung thư người, đó là nhóm canthin-6-one alkaloid gồm: 9-methoxycanthin-6-one, 9-methoxycanthin-6-one-N-oxide, 9-hydroxycanthin-6-one, và 9-hydroxycanthin-6-one-N-oxide và 1 chất thuộc nhóm quassinoid là eurycomanone. Hai hợp chất eurycomanone và 7-

methoxy-P-carboline-1-propionic acid thể hiện hoạt tính chống sốt rét mạnh kháng lại chủng *P. falciparum* [66].

Kuo và cs (2004) đã phân lập và xác định 65 hợp chất từ rễ cây bách bệnh và sàng lọc khả năng gây độc tế bào bằng các thí nghiệm *in vitro*. Trong số các hợp chất được đánh giá thì có 8 hợp chất chứng tỏ khả năng gây độc mạnh đối với dòng tế bào gây ung thư phổi ở người (A-549) và 7 hợp chất khác có tác dụng mạnh lên dòng tế bào gây ung thư vú ở người (MCF-7). Có 2 hợp chất thể hiện khả năng diệt chủng *P. falciparum* kháng thuốc. Tuy nhiên không có hợp chất nào có hoạt tính chống HIV đáng chú ý [70].

1.1.3.3. Hoạt tính chống bệnh tiểu đường

Trong dân gian, mọi người thường sử dụng lá và rễ của cây bách bệnh để kiểm soát lượng đường trong máu của mình, tuy nhiên, các thông tin khoa học đã công bố về khả năng này được thử nghiệm trên người là rất hiếm.

Husen và cs (2004) đã báo cáo khả năng kiểm soát đường huyết của cây bách bệnh trên chuột. Các tác giả đã sàng lọc dịch chiết của cây bách bệnh (50, 100 và 150 mg/kg BW (body weight - trọng lượng cơ thể)) trên chuột có khả năng tăng đường huyết bình thường và được cảm ứng bởi streptozotocin. Từ các kết quả thu được cho thấy các thí nghiệm đều cho kết quả dương tính và đạt kết quả cao nhất ở nồng độ 150 mg/kg BW. Tuy nhiên, kết quả cũng chỉ ra rằng chuột tăng đường huyết bình thường thì sự hạ đường huyết là không đáng kể [58].

1.1.3.4. Hoạt tính kích thích sinh dục

Dịch chiết rễ cây bách bệnh được ghi nhận rộng rãi về tính năng đặc biệt của nó là tăng cường nam tính và năng lực giới tính. Ang và Sim (1998) đã đánh giá sự ảnh hưởng của dịch chiết rễ cây bách bệnh lên khả năng sinh dục của chuột đực khi được xử lý với các liều lượng 200, 400 và 800 mg/kg

BW, 2 lần/ngày, trong 10 ngày. Kết quả cho thấy sự tăng khả năng sinh dục của chuột đực tỷ lệ thuận với liều lượng sử dụng, mặc dù không có hiện tượng gì xảy ra trong 20 phút đầu xử lý [26].

Testosterone rất quan trọng cho khả năng sinh sản của giới đực, cần cho chức năng sinh tinh trùng bình thường. Sự biểu hiện vượt mức của estrogen có thể dẫn đến ức chế sự tác động của testosterone và chức năng của tinh hoàn. Wahab và cs (2010) đã nghiên cứu sự ảnh hưởng của dịch chiết cây bách bệnh lên mô tinh hoàn và đếm tinh trùng của chuột đực đã được xử lý với estrogen. Họ đã khám phá ra rằng dịch chiết đã tăng cường chức năng của tinh hoàn và ức chế sự ảnh hưởng của estrogen vì số lượng tinh trùng của chuột thí nghiệm tăng lên [139].

Tambi và Imran (2010) đã thử nghiệm sự ảnh hưởng của dịch chiết cây bách bệnh lên những người đàn ông vô sinh tự phát, những người này có nồng độ tinh trùng thấp kèm với (hoặc không) tỷ lệ thấp tinh trùng có hình thái và khả năng di động bình thường mà không rõ nguyên nhân. Trong thí nghiệm này, một số nam giới đã được cho dùng 200 mg dịch chiết mỗi ngày và sau đó phân tích tinh dịch của họ. Kết quả cho thấy có tăng nồng độ tinh trùng, hình thái và khả năng di động của nó tốt hơn [131].

Tất cả những nghiên cứu ở trên đã cho rằng cây bách bệnh có khả năng điều trị các vấn đề sinh dục của giới đực, nhưng Abdulghani và cs (2012) cho thấy cây bách bệnh còn có khả năng cải thiện ảnh hưởng trong điều trị sự rối loạn giới tính ở con cái. Tác giả đã nghiên cứu cải thiện ảnh hưởng của dịch chiết cây bách bệnh lên sự rối loạn sinh sản ở chuột cái, cụ thể là sự chín của trứng và chu kỳ động dục không đều. Những con chuột thí nghiệm được xử lý với hormone để cảm ứng sự rối loạn sinh sản. Sau khi xử lý với dịch chiết, sự ảnh hưởng đảo ngược đã thể hiện, chỉ có một tỷ lệ rất thấp chuột cái bị tác động rối loạn của hormone [15].

1.1.3.5. Hoạt tính kháng khuẩn

Farouk và cs (2007) đã sử dụng nhiều loại dịch chiết (bằng methanol, ethanol, acetone và nước) từ các bộ phận khác nhau của cây bách bệnh: lá, thân và rễ để đánh giá khả năng kháng khuẩn chống lại vi khuẩn Gram (-/+). Từ nghiên cứu của họ cho thấy, dịch chiết từ lá và thân có khả năng kháng cả vi khuẩn Gram (+) (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) và Gram (-) (*Proteus vulgaris* và *Serratia marcescens*), ngoại trừ 2 chủng vi khuẩn Gram (-) là *Escherichia coli* và *Salmonella typhi*. Tuy nhiên, dịch chiết từ rễ không có bất kỳ hoạt tính kháng khuẩn nào [45].

1.1.3.6. Hoạt tính chống loãng xương

Tác dụng chống loãng xương của cây bách bệnh trên mô hình chuột thiếu (do tình hoàn bị cắt nên việc sản xuất ra androgen bị thiếu hụt, dẫn đến loãng xương). Kết quả cho thấy cao rễ bách bệnh cho tác dụng androgenic rõ rệt (chống loãng xương và có khả năng thay thế cho testosterone). Do vậy, bách bệnh có thể dùng như một liệu pháp thay thế triển vọng ở người loãng xương do thiếu hụt hay suy giảm androgen [94].

1.1.3.7. Hoạt tính kháng viêm

Nguyễn Hải Đăng và cs (2016) nhận thấy 7- methoxy- (9H- β -carbolin- 1- il)-(E)- 1- propenoic acid (7- MCPA), một β - carboline alkaloid được tách chiết từ cây bách bệnh có tác dụng kháng viêm. 7- MCPA phát huy tác dụng chống viêm bằng cách điều chỉnh các con đường Nrf2 và NF - κ B và có thể là một chất hoạt hóa Nrf2 tiềm năng để phòng ngừa cũng như điều trị các bệnh viêm nhiễm [51].

Theo Ruan và cs (2019), bốn hợp chất phenol mới được công bố là eurylophenolosides A (1) và B (2), eurylolignanosides A (3) và B (4), cùng với

12 hợp chất khác (đã công bố trước đó) được phân lập từ rễ của cây bách bệnh. Cấu trúc của các hợp chất này đã được xác định bằng các kỹ thuật quang phổ và phản ứng hóa học khác nhau. Trong số các chất tách chiết đã biết tên, syringaldehyde (12), 3-chloro-4-hydroxybenzoic acid (13), 3-chloro-4-hydroxyl benzoic-4-O- β -d-glucopyranoside acid (14), và isotachioside (15) lần đầu tiên được tách chiết từ chi *Eurycoma*. Hơn nữa, đây là dữ liệu NMR đầu tiên của hợp chất số 14 được công bố. Trong khi đó, các hoạt động ức chế NO của tất cả các hợp chất được kiểm tra trong các tế bào RAW264.7 kích thích bằng lipopolysaccharide (LPS) ở 40 μ M. Kết quả cho thấy, piscidinol A (6), 24-epi-piscidinol A (7), bourjotinolone A (10) và scopoletin (16) được quan sát thấy là có vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn mức độ của NO mà không gây độc tế bào. Hơn nữa, phương pháp Western blot đã được sử dụng để điều tra cơ chế của các hợp chất 6, 7, 10 và 16 bằng cách phân tích mức độ của các protein liên quan đến phản ứng viêm, chẳng hạn như cảm ứng nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-6 (IL-6), và yếu tố nhân kappa-chất tăng cường chuỗi ánh sáng của tế bào B hoạt hóa (NF- κ B) trong tế bào RAW264.7 được cảm ứng bởi LPS. Kết quả chỉ ra rằng, các hợp chất 6, 7, 10 và 16 được phát hiện là có khả năng ức chế đáng kể sự biểu hiện protein IL-6, NF- κ B và iNOS trong con đường tiết NF- κ B được cảm ứng bởi LPS. Hơn nữa, người ta thấy rằng tác dụng ức chế biểu hiện protein của 6, 7 và 16 phụ thuộc vào liều lượng. Cơ chế này có thể liên quan đến việc ức chế việc biểu hiện iNOS thông qua việc ngăn chặn con đường NF- κ B cảm ứng bởi IL-6 [120].

Trong nghiên cứu của Liu và cs (2019), một thư viện hợp chất đã được sàng lọc các hoạt tính chống viêm thông qua việc ức chế sản xuất quá mức NO trung gian gây viêm trong tế bào đại thực bào RAW 264.7 được cảm ứng bởi LPS, Thư viện bao gồm 75 alkaloids loại β -carboline hoặc canthinone tự nhiên từ cây Simaroubaceae và các chất tương tự được tổng hợp hóa học của

chúng. Sáu hợp chất, cụ thể là, benzalharman (23), kumujian (27), 1-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (37), 1-acetophenone-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (42), cathin-6-one (46), và 9-methoxy-cathin-6-one (57), thể hiện khả năng ức chế đáng kể đối với việc sản xuất quá mức NO. Nghiên cứu sâu hơn cho thấy, tất cả 6 hợp chất đã điều chỉnh làm giảm sự biểu hiện cao của protein tổng hợp oxit nitric cảm ứng (iNOS). Trong số đó, hai alkaloid loại canthinone (46 và 57) điều chỉnh mạnh sự biểu hiện protein cyclooxygenase-2 (COX-2) theo cách phụ thuộc vào liều lượng và cũng ức chế sự sản xuất quá mức của chất trung gian gây viêm prostaglandin E2 (PGE2). Tuy nhiên, các alkaloid loại β -carboline (23, 27, 37, và 42) không cho thấy sự ức chế rõ ràng nào đối với việc sản xuất quá mức PGE2 và sự biểu hiện của protein COX-2. Kết quả cho thấy alkaloids loại β -carboline và alkaloids loại canthinone có thể có tác dụng chống viêm thông qua các cơ chế độc lập [76].

1.1.4. Một số công trình nuôi cấy *in vitro* cây bách bệnh

Trên thế giới, rất nhiều công trình nghiên cứu về các phương pháp chiết xuất, xác định thành phần hóa học và thử nghiệm hoạt tính sinh học của cây bách bệnh. Tuy nhiên, việc ứng dụng chất kích kháng để sản xuất các hợp chất thứ cấp từ loài cây này vẫn còn hạn chế.

Siregar và cs (2004) nghiên cứu sự ảnh hưởng của nguồn tế bào và pH môi trường nuôi cấy lên sự sản xuất canthin-6-one alkaloid từ nuôi cấy tế bào các dòng cây bách bệnh khác nhau. Kết quả cho thấy, lá dòng Eu-9 không những tạo callus tốt nhất mà còn tích lũy sinh khối cao trong nuôi cấy huyền phù nhưng tích lũy 9-methoxycanthin-6-one và 9-hydroxycanthin-6-one với sản lượng thấp. Ngược lại, lá dòng Eu-8 cảm ứng tạo callus và sinh khối thấp nhưng sản xuất 9-methoxycanthin-6-one và 9-hydroxycanthin-6-one cao nhất. pH 5,75 là tối ưu cho nuôi cấy tế bào cây này nhưng hàm lượng cao của

alkaloid được cảm ứng ở pH 4,75 và 5,25 trước khi khử trùng [127].

Chan và cs (2010) đã bổ sung các nồng độ khác nhau của chitosan, NaH_2PO_4 , Na_2CO_3 và polyvinylpyrrolidone vào môi trường MSBs nhằm kích thích sự tích lũy alkaloid của tế bào huyền phù cây bách bệnh. Thí nghiệm này cho thấy khi bổ sung 100 mg/L chitosan vào môi trường nuôi cấy đã cảm ứng tăng sinh khối tế bào và nồng độ 150 mg/L cảm ứng sản xuất 9-hydroxycanthin-6-one cao nhất (0,44% dw (dry weight-khối lượng khô)) nhưng không sản xuất 9-methoxycanthin-6-one. Trong khi đó, tế bào tích lũy sinh khối và hàm lượng alkaloid cao nhất ở nồng độ NaH_2PO_4 lần lượt 2 mg/L và 20 mg/L. Tuy nhiên, các nồng độ khác nhau của Na_2CO_3 và PVP (polyvinylpyrrolidone) đã ức chế sự sinh trưởng của tế bào, đồng thời không làm thay đổi hàm lượng của alkaloid [38].

Riksa và cs (2014) chiếu tia UV (ultraviolet - tia cực tím) lên callus của cây bách bệnh với thời gian 18 giờ/ngày trong 28 ngày để nghiên cứu sự sinh trưởng và sự tích lũy alkaloid và terpenoid. Kết quả thể hiện rằng, cấu trúc của callus khô và rắn hơn nhưng sự sinh trưởng không có sự sai khác nhiều so với đối chứng. Đối với callus nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige and Skoog) bổ sung NAA (Naphthaleneacetic acid), khi được kích thích bằng tia UV đã tăng tích lũy canthin-6-one lên 3,5 lần và pyrrolidine lên 1,5 lần so với đối chứng, ngược lại, canthin alkaloid này không phát hiện thấy ở callus nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2,4D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). Ngoài ra squalene và 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde cũng được sản xuất ở tế bào được kích thích [118].

Ở Việt Nam, các nghiên cứu nuôi cấy cây bách bệnh tập trung chủ yếu vào nuôi cấy rễ tơ để sản xuất hợp chất thứ cấp.

Nguyễn Thu Trang và cs (2012) đã nghiên cứu tạo rễ tơ của cây bách bệnh với mục đích tạo nguồn nguyên liệu ổn định, đáp ứng nhu cầu làm

thuốc. Năm 2017, nhóm tác giả tiếp tục khảo sát hoạt tính sinh học của cao chiết methanol từ rễ tơ và rễ tự nhiên cây Bá bệnh. Kết quả cho thấy cao chiết methanol từ rễ tơ và rễ tự nhiên ức chế sản xuất cytokine gây viêm IL-6 kích thích bởi LPS ở dòng tế bào THP-1 với IC₅₀ tương ứng là 3,6 và 6,6 (µg/mL). Cao chiết methanol từ rễ tơ và rễ tự nhiên có hoạt tính gây độc tế bào ung thư ở mức trung bình trên các dòng tế bào HepG2, LU-1, MCF-7 với IC₅₀ tương ứng là 77,4, 61,1, 88,2 (µg/mL) và 63,8, 46,2, 54,8 (µg/mL). Tuy nhiên, cả hai loại cao chiết nghiên cứu đều không có khả năng ức chế quá trình peroxy hoá lipid (IC₅₀ > 100) [10].

1.2. HỢP CHẤT THỨ CẤP THỰC VẬT

1.2.1. Vai trò của các hợp chất thứ cấp ở 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. Những chất chuyển hóa này được xếp thành nhóm các chất trao đổi sơ cấp và thứ cấp. Các chất trao đổi sơ cấp như chlorophyll, amino acid, nucleotide, các carbohydrate đơn giản hoặc lipid của màng, chúng có vai trò quan trọng trong quá trình quang hợp, hô hấp, vận chuyển các chất hòa tan, quá trình đồng hóa và dị hóa các chất dinh dưỡng. Các hợp chất thứ cấp chỉ phân bố có giới hạn trong thế giới thực vật, chúng được tìm thấy trong một số loài thực vật hoặc trong nhóm loài có liên quan, trong khi đó hợp chất sơ cấp được tìm thấy trong hầu hết các loài [130].

Thực vật bậc cao là nguồn cung cấp hợp chất có tác dụng sinh học cao được dùng trong công nghiệp dược. Một số hợp chất thứ cấp được dùng làm thuốc như: Morphin, codein, cocain, quinin, các alkaloid dừa cạn, alkaloid dương địa hoàng, phytostigminin, pilocarpin, reserpin và các steroid như: diosgenin, digoxin, và digitoxin... [8]. Trong vài thập kỷ qua, những bằng chứng từ thực nghiệm và trong thực tế cho thấy các hợp chất thứ cấp ở thực

vật có các chức năng cơ bản sau:

- Bảo vệ cơ thể chống lại các loài động vật ăn thực vật (côn trùng và động vật có xương sống).
- Kháng nấm, vi khuẩn và virus.
- Bảo vệ cơ thể chống lại sự cạnh tranh của các thực vật khác về ánh sáng, nước và chất dinh dưỡng.
- Thu hút các loài động vật trong quá trình thụ phấn và phát tán hạt.
- Tạo ra các tín hiệu trong giao tiếp giữa thực vật với các loài vi sinh vật cộng sinh.
- Bảo vệ cơ thể chống lại tia tử ngoại và các tác nhân vật lý bất lợi khác [142].
- Chúng hình thành nên các hợp chất hấp thụ tia UV, do đó ngăn chặn được sự gây nguy hiểm của ánh sáng đến lá cây [34].

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. Các sản phẩm thứ cấp được dự trữ chủ yếu trong các cấu trúc đặc biệt hoặc các cơ quan dự trữ như rễ, các tế bào dự trữ, không bào, hệ thống màng... Các hợp chất hóa học này được dùng trong dược phẩm, hóa chất nông nghiệp, thuốc nhuộm, gia vị, chất tạo mùi, thuốc trừ sâu... chúng chiếm tỷ trọng lớn trong sản xuất công nghiệp [49].

1.2.2. Sản xuất hợp chất thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào

Mỗi tế bào thực vật trong nuôi cấy *in vitro* chứa đựng các thông tin di truyền hoàn chỉnh và vì thế nó có khả năng sản xuất các hợp chất hóa học giống như cây bố mẹ [115]. 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 [98]. 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.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật được phát triển với mục tiêu cải thiện hiệu suất các sản phẩm có hoạt tính sinh học. Ưu điểm của kỹ thuật này là có thể cung cấp sản phẩm một cách liên tục và đáng tin cậy dựa trên cơ sở:

- Tổng hợp các hợp chất thứ cấp có giá trị dưới sự điều khiển các yếu tố môi trường nuôi cấy, độc lập với khí hậu và điều kiện canh tác.
- Phủ định ảnh hưởng sinh học (vi sinh vật và côn trùng) đến các sản phẩm là hợp chất thứ cấp trong tự nhiên.
- Có thể chọn lọc các giống cây trồng cho nhiều loại hợp chất thứ cấp khác nhau.
- Có thể tự động hóa điều khiển sự sinh trưởng của tế bào và điều hòa quá trình chuyển hóa, do đó chi phí giảm và lượng sản phẩm sẽ tăng lên [4].

Nhiều nghiên cứu cho thấy, một số hợp chất thứ cấp ở tế bào thực vật nuôi cấy được tích lũy cao hơn so với cây bố mẹ, chẳng hạn như sự tích lũy anthocyanin trong nuôi cấy tế bào cây *Vitis* sp., *Euphorbia milli* và *Perilla frutescens* lần lượt cao gấp 1,6; 13,3 và 16 lần; anthraquinone trong tế bào nuôi cấy cây *Morinda citrifolia* cao gấp 8 lần; berberin trong tế bào nuôi cấy cây *Coptis japonica* và *Thalictrum minor* lần lượt cao gấp 3,3 và 1000 lần; rosmarinic acid trong tế bào nuôi cấy cây *Coleus blumei* cao gấp 9,3 lần; shikonin trong tế bào nuôi cấy cây *Lithospermum erythrorhizon* cao gấp 9,3 lần so với các cây ngoài tự nhiên. Điều này cho thấy ưu điểm của việc sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp đặc trưng của thực vật thông qua phương thức nuôi cấy tế bào [125].

1.2.3. Chiến lược trong sản xuất các sản phẩm thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào

Trong nuôi cấy tế bào, việc chọn lựa cẩn thận các tế bào có khả năng phát triển và điều kiện nuôi cấy tối ưu sẽ giúp tăng khả năng tích lũy một vài sản phẩm ở mức cao hơn. Để thu được hiệu suất cao cho khai thác thương mại, người ta đã sử dụng nhiều phương pháp khác nhau trong nỗ lực tập trung vào việc kích thích hoạt động sinh tổng hợp của các tế bào nuôi cấy. Tế bào nuôi cấy tích lũy một lượng lớn hợp chất thứ cấp chỉ khi ở những điều kiện đặc biệt như (1) chọn lựa thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp, (2) chọn lựa các dòng tế bào năng suất cao, (3) bổ sung tiền chất nuôi cấy và (4) các chất kích kháng bảo vệ thực vật [98].

Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy: Thông số của các nhân tố hóa học và vật lý như thành phần môi trường, chất kích thích sinh trưởng, pH, nhiệt độ nuôi cấy, sự thông khí, sự lắc hoặc khuấy, và ánh sáng ảnh hưởng đến hàm lượng các hợp chất thứ cấp đã được nghiên cứu nhiều. Một vài sản phẩm tích lũy trong tế bào ở mức cao hơn so với ở trong cây trồng tự nhiên khi được nuôi cấy ở điều kiện tối ưu [5].

Chọn lọc các dòng tế bào cho năng suất cao: Cải thiện tích lũy các hợp chất thứ cấp thường bắt đầu từ việc chọn các dòng cây bố mẹ có chứa hàm lượng cao các chất cần thu hồi để hình thành callus nhằm thu được các dòng tế bào có năng suất cao. Phương thức gây đột biến cũng đã được khảo sát để thu các dòng tế bào sản xuất vượt mức sản phẩm như phương thức chọn dòng tế bào có năng suất cao. Theo đó, một quần thể lớn của tế bào được đặt xử lý các tác nhân ức chế, gây độc hoặc các yếu tố stress môi trường và chỉ những dòng tế bào có khả năng chống chịu trong quá trình chọn lọc mới duy trì sinh trưởng [115].

Cung cấp tiền chất: Bổ sung các tiền chất của quá trình sinh tổng hợp nội bào vào môi trường nuôi cấy cũng có thể tăng lượng sản phẩm mong muốn, do một số hợp chất trung gian nhanh chóng bắt đầu sinh tổng hợp các

hợp chất thứ cấp vì thế làm tăng lượng sản phẩm cuối cùng. Phương pháp này hữu ích khi dùng các tiền chất có giá thành rẻ [90].

Sự kích kháng bảo vệ thực vật: Chất kích kháng bảo vệ thực vật báo hiệu việc hình thành các hợp chất thứ cấp. Sử dụng các chất kích kháng kết hợp với loại bỏ các sản phẩm cuối và sự tích lũy trong pha tách chiết, đã được chứng minh là một hướng rất thành công để gia tăng hiệu suất chuyển hóa [125].

Công nghệ chuyển hóa trong sản xuất các chất trao đổi ở tế bào thực vật: Ứng dụng công nghệ chuyển hóa ở tế bào thường là kết quả của kỹ thuật DNA (deoxyribonucleic acid) tái tổ hợp. Ngoài ra, còn có thể thiết kế hệ thống các phản ứng hóa sinh để đạt được một mục tiêu nào đó. Ví dụ, tăng tốc độ sản xuất các sản phẩm mong muốn, giảm các sản phẩm không mong muốn, hoặc phân hủy các chất độc [125].

1.3. CHẤT KÍCH KHÁNG THỰC VẬT

1.3.1. Định nghĩa chất kích kháng và sự kích kháng

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 [112].

1.3.2. Phân loại 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.

Chất kích kháng phi sinh học là chất kích kháng không có nguồn gốc từ sinh học, phần lớn là các muối vô cơ và các yếu tố sinh lý hoạt động như chất

kích kháng, ngược lại chất kích kháng sinh học là chất kích kháng có nguồn gốc sinh học, chúng bao gồm các polysaccharide có nguồn gốc từ thành tế bào thực vật (pectin hoặc cellulose) và vi sinh vật (chitin hoặc glucan), các glycoprotein, G-protein hoặc protein nội bào, chức năng của chúng là kết hợp với các thụ thể và hoạt động bằng cách kích hoạt hoặc bất hoạt một số enzyme hoặc kênh ion [138].

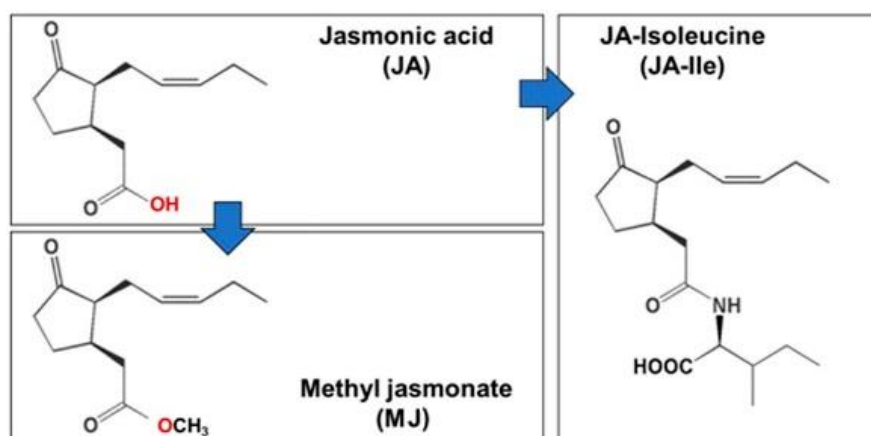
Chất kích kháng ngoại sinh là chất kích kháng có nguồn gốc bên ngoài tế bào giống như polysaccharide, polyamine và acid béo, ngược lại chất kích kháng nội sinh là chất kích kháng có nguồn gốc bên trong tế bào như galacturonide hoặc hepta- β -glucoside... [102].

Một số chất kích kháng phổ biến trong nuôi cấy tế bào thực vật

Jasmonic acid (JA) và các dẫn xuất của nó được gọi chung là Jasmonate (JAS). JAS là các hợp chất cyclopentanone hoặc các hormone thực vật có nguồn gốc từ α -linolenic acid. Nó bao gồm một nhóm acid béo oxy hóa, JA là tiền chất chính của nhiều hợp chất khác nhau trong nhóm này như MeJA, là chất được phân lập đầu tiên từ tinh dầu của *Jasminum grandiflorum*, và acid tự do này được phân lập sau đó từ dịch nuôi cấy của loài nấm *Lasiodiplodia theobromae*. JAS được tổng hợp từ acid béo gồm 3 bước: bước đầu tiên xảy ra trong màng lục lạp, α -linolenic acid và hexadecatrienoid acid được giải phóng từ màng phospholipid. Lipoxygenase (LOX), allene oxide synthetase (AOS) và allene oxide cyclase (AOC) là các enzyme chính sinh tổng hợp JA trong lục lạp, các enzyme này tạo ra cis-(+)-12-oxophytodienoic acid (OPDA) và dinor-OPDA (dn-OPDA). Bước thứ hai của quá trình tổng hợp JAS diễn ra trong peroxisome bởi quá trình oxy hóa β để tạo thành JA. Trong bước thứ 3 của quá trình này, JA được chuyển vào tế bào chất để tiếp tục biến đổi tạo thành MeJA và JA-isoleucine (JA-Ile) [57].

JA cùng với các tiền chất và dẫn xuất của nó tham gia vào nhiều quá

trình sinh lý của thực vật, đặc biệt là trung gian trong sự đáp ứng của thực vật với các stress sinh học và phi sinh học. Các chất này được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sự kích kháng bằng các hệ thống nuôi cấy *in vitro*. Quá trình kích kháng dẫn đến sự kết hợp giữa JAS với các thụ thể của chúng trên màng sinh chất, đây là mắc xích đầu tiên trong chuỗi các phản ứng tự vệ của tế bào, bao gồm sự sản xuất các ROS và các gốc tự do nitrogen hóa (reactive nitrogen species - RNS) và cảm ứng các enzyme bảo vệ chống lại stress oxy hóa. Quá trình kích kháng còn dẫn đến sự tổng hợp và tích lũy các phân tử tín hiệu như JA, SA, nitric oxide (NO), ethylene (ET) trong tế bào, tiếp theo là điều hòa sự biểu hiện của các gene trong sản xuất các hợp chất thứ cấp. Vì vậy, phần lớn các hóa chất như JA, MeJA, SA (salicylic acid), ET được sử dụng để nghiên cứu kích kháng *in vitro*. Trong đó, MeJA là chất kích kháng được sử dụng phổ biến nhất (chiếm khoảng 60% các công trình đã công bố) đã cho thấy sự ảnh hưởng rõ rệt đến sự tích lũy các HCTC trong nuôi cấy cơ quan và tế bào thực vật, theo sau là SA (15%) và JA (10%). Huyền phù tế bào, rễ bất định và rễ tơ được sử dụng phổ biến trong các hệ thống nuôi cấy có sử dụng chất kích kháng, cụm chồi và phôi ít được sử dụng hơn [57].



Hình 1.2. JA và các dẫn xuất của nó (Ho T.T. và cs, 2020) [57]

Salicylic acid là một chất kích kháng nội sinh hay chất kích kháng sinh học có nguồn gốc là các hormone nội sinh, được biết nhiều nhất với vai trò là

một chất cảm ứng truyền tín hiệu đến trong hệ thống kháng tạp nhiễm ở thực vật. SA nhanh chóng được tích lũy ở vị trí bị xâm nhiễm trong suốt quá trình tấn công của tác nhân gây bệnh và nó lan sang những phần khác của cây để cảm ứng đáp ứng phòng vệ trên diện rộng. SA kích hoạt các gen liên quan đến phản ứng phòng vệ và có ảnh hưởng lớn đến khả năng tích lũy các hợp chất thứ cấp ở thực vật, đặc biệt ở các cây dược liệu và các loài nhân sâm quý. SA là tín hiệu gây đáp ứng miễn dịch ở tất cả loài thực vật, nhưng tác động của nó ở mỗi loài cây rất khác nhau, trên từng bộ phận cũng không giống nhau [11], [132].

Dịch chiết nấm men (yeast extract-YE) cũng là một chất kích kháng ngoại sinh có nguồn gốc là sinh khối tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, trong đó YE chứa hàng loạt thành phần có thể kích thích phản ứng phòng vệ thực vật và dẫn đến sự gia tăng các hợp chất thứ cấp như chitin, N-acetylglucosamine oligomers, β -glucan, glycopeptides và ergosterol.... Vai trò của YE tuy chưa được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy loài cây bách bệnh nhưng đã có rất nhiều nghiên cứu cho thấy hiệu quả tăng cường sản xuất các hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy thực vật [11], [132].

1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình kích kháng

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.

1.3.3.1. Nồng độ chất kích kháng

Nồng độ chất kích kháng đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình kích

kháng. Namdeo và cs (2002) đã cho thấy sự tích lũy cao của ajmalicine trong nuôi cấy cây *Catharanthus roseus* khi xử lý kích kháng với các nồng độ khác nhau của dịch chiết từ *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* và *Fusarium moniliforme*. Sự tích lũy ajmalicine khi được kích kháng bởi 5,0% dịch chiết cao hơn khi được kích kháng ở nồng độ 0,5% dịch chiết. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ kích kháng lên 10% thì ảnh hưởng bất lợi đến sự tích lũy ajmalicine [101]. Đôi khi liều lượng cao của chất kích kháng được dùng để cảm ứng sự đáp ứng miễn dịch của tế bào, làm cho tế bào chết, nhưng nồng độ tối ưu của chất kích kháng vẫn được khuyến dùng trong quá trình cảm ứng [119].

1.3.3.2. Thời gian tiếp xúc với chất kích kháng

Tế bào *C. roseus* được kích kháng với dịch chiết của *T. viride*, *A. niger* và *F. moniliforme* trong thời gian 24, 48, 72 và 96 giờ. Ajmalicine tăng lên gấp 3 lần khi tế bào được xử lý với dịch chiết *T. viride* và khoảng 2 lần khi tế bào được xử lý với dịch chiết *A. niger* và *F. moniliforme* trong thời gian 48 giờ. Khi thời gian kích kháng tăng lên thì làm giảm hàm lượng ajmalicine [101].

1.3.3.3. Thời kỳ nuôi cấy

Thời gian cấy chuyền là thông số quan trọng trong sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học có sử dụng chất kích kháng. Tế bào *C. roseus* 20 ngày tuổi cho sản lượng ajmalicine cao hơn trong quá trình kích kháng, đạt 166 µg/g khô khi xử lý với *T. viride* [101].

1.3.3.4. Thành phần dinh dưỡng

Thành phần môi trường cũng đóng một vai trò quan trọng cho quá trình kích kháng. Theo Namdeo và cs (2002), sự tích lũy ajmalicine trong môi trường Zenk nhiều hơn so với môi trường MS [101].

Ngoài ra, ảnh hưởng của sự kích kháng cũng còn phụ thuộc vào đặc tính của chất kích kháng, dòng tế bào hoặc các dòng vi sinh vật sử dụng kích

kháng, sự có mặt của các chất điều hòa sinh trưởng, thành phần dinh dưỡng của môi trường và các điều kiện nuôi cấy [101].

1.3.4. Quá trình kích kháng và sản xuất các hợp chất thứ cấp ở thực vật

Thực vật sống được xem như một nhà máy hóa sinh không chỉ sản xuất các hợp chất trao đổi sơ cấp như đường, amino acid và acid béo mà còn sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp có ý nghĩa lớn trong ngành dược như alkaloid, glycoside, flavonoid, dầu thơm, tanin, resin... Hợp chất thứ cấp có thể là chất điển hình cho sự thích nghi với stress môi trường hoặc chúng có thể đáp ứng như hệ thống phòng thủ, bảo vệ hoặc là chất tấn công chống lại vi sinh vật, côn trùng và động vật ăn cỏ. Chúng thỉnh thoảng cũng được cho là chất thải hay sản phẩm tiết trong quá trình trao đổi chất ở thực vật [102].

Mặc dù có sự tiến bộ trong việc tổng hợp các chất hữu cơ hoặc bán tổng hợp đa dạng các hợp chất tương tự ở thực vật nhưng các hợp chất thứ cấp được chiết xuất từ thực vật vẫn có tầm quan trọng đáng kể về mặt thương mại [102]. Hiện nay, các nhà khoa học rất chú ý phát triển các phương thức thay thế cây hoàn chỉnh để sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp ở thực vật. Trọng tâm của phương thức này là sử dụng nuôi cấy mô và tế bào kết hợp với chất kích kháng và kỹ thuật sinh học phân tử để tăng cường con đường trao đổi chất chủ đạo đối với các hợp chất đặc trưng.

Khi thực vật bị nhiễm bởi các vi sinh vật gây bệnh, sự đáp ứng được kích hoạt nhanh với các phản ứng phòng thủ được điều hòa cả về không gian và thời gian. Các đáp ứng này bao gồm oxy hóa liên kết chéo của các protein thành tế bào, sản xuất phytoalexin, các enzyme thủy phân, phenol hóa các protein thành tế bào và cuối cùng tế bào thực vật chết do mất cảm. Vi sinh vật xâm nhiễm vào thực vật cảm ứng tổng hợp các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng sinh theo cách tương tự các nhân tố stress như chiếu tia UV, sốc

thẩm thấu, acid béo, muối vô cơ và ion kim loại nặng. Các phân tử kích thích sự sản xuất các hợp chất thứ cấp được gọi là chất kích kháng. Cả chất kích kháng sinh học và phi sinh học cảm ứng tích lũy sản phẩm không chỉ ở cây nguyên vẹn mà cả ở tế bào nuôi cấy như là kết quả của các phản ứng phòng thủ, bảo vệ hay tấn công [102].

Một số lượng lớn các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp được sản xuất bởi thực vật cùng với sự phát triển của kẻ thù tự nhiên, như các vi sinh vật gây bệnh, động vật ăn cỏ và các thực vật cạnh tranh khác. Một vài hợp chất này tích lũy ở các mô đặc trưng cho dù có hoặc không các tác nhân gây bệnh sinh học hay phi sinh học. Các hợp chất đó được biết như là phytoanticipin, bao gồm saponin, một lớp triterpenoid glycoalkaloid với hoạt tính kháng khuẩn được tích lũy trong các mô thực vật khác nhau (ví dụ, α -tomatine trong lá cây cà chua, avenacine A-1 trong rễ yến mạch) [136].

Khi thực vật có nguy cơ bị xâm nhiễm bởi vi sinh vật hoặc bị tổn thương thì có sự thay đổi trong quá trình trao đổi chất, dẫn đến sự tích lũy ở mức độ cao của chất kháng sinh đặc hiệu, hợp chất gây chán ăn (antifeeding), hoặc các hợp chất gây độc nói chung tại vị trí tấn công. Khi các hợp chất này được cảm ứng bởi các vi sinh vật gây bệnh, chúng thường được nhắc đến như là các phytoalexin và bao gồm nhiều chất như các dẫn xuất của phenylpropanoid, flavonoid, isoflavonoid, sesquiterpene và polyketid [53].

Một vài nghiên cứu đã chứng minh rằng sự nhận biết đặc hiệu giữa chất kích kháng vi sinh vật với các thụ thể thực vật tương ứng gây ra các tín hiệu đặc trưng làm kích hoạt các phản ứng phòng thủ. Thụ thể của chất kích kháng thực vật được xác định đặc tính đầu tiên là *Arabidopsis* FLS2, thụ thể này có thể nhận biết tiên mao của vi khuẩn. FLS2 được cho là kích hoạt sự đáp ứng phòng thủ khi xử lý tế bào nuôi cấy và cây *Arabidopsis* với tiên mao hoặc flg22 (một peptide gồm 22 amino acid). Sau đó nhiều thụ thể của các chất

kích kháng khác cũng đã được nghiên cứu [46].

Sự nhận biết các chất kích kháng bởi các thụ thể thường gây ra các sự kiện như sự phosphoryl hóa và dephosphoryl hóa ở màng plasma và các protein tế bào chất, các dòng chảy ion, đảo cực ở màng plasma, kiềm hóa môi trường ngoại bào và acid hóa môi trường nội bào. Các sự kiện này xảy ra trong vòng vài phút đến vài giờ sau khi nhận biết các chất kích kháng và ngay sau đó kích hoạt các đáp ứng tiếp theo. Sự hoạt hóa các NADPH oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen) và peroxidase gian bào một cách ồ ạt khi tiếp nhận kích thích và tích lũy ROS tạm thời, các chất này cùng với việc tạo ra các phân tử tín hiệu phòng thủ đặc trưng như ET, SA và JA, có thể tham gia cảm ứng các đáp ứng phòng thủ “trễ”, trong đó có sản xuất các hợp chất thứ cấp [46].

Các sự kiện sớm nhất được cảm ứng bởi chất kích kháng là hoạt hóa protein-G. Khi tiến hành thí nghiệm sử dụng các chất hoạt hóa và ức chế khác nhau để sản xuất benzophenanthridine alkaloid ở cỏ rễ máu (bloodroot); isoflavonoids ở đậu nành và β -thujaplicin ở *Cupressus lusitanica* đã cho thấy protein-G tham gia vào sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp khi được cảm ứng bởi các chất kích kháng [46].

Các dòng ion như dòng trao đổi K^+/H^+ , dòng Cl^- đi ra, và dòng ion đi vào Ca^{2+} còn là yếu tố quan trọng của con đường tín hiệu liên quan đến sự phòng thủ. Đặc biệt, vai trò của Ca^{2+} đã được nghiên cứu rộng rãi vì ion này là tín hiệu thứ cấp chủ đạo ở hầu hết các sinh vật. Dòng Ca^{2+} được cảm ứng bởi chất kích kháng là rất quan trọng cho sự tích lũy các hợp chất thứ cấp và các yếu tố khóa kênh Ca^{2+} có thể ức chế sự cảm ứng phytoalexin bởi chất kích kháng trong vài loài thực vật, như lúa hoặc *Cupressus lusitanica*. Tăng nồng độ Ca^{2+} trong tế bào chất làm hoạt hóa các phản ứng phòng thủ tiếp theo một cách trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua các cảm biến Ca^{2+} , như calmodulin và

Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK). Trong cây thuốc lá, yếu tố đối kháng calcium/calmodulin ức chế sự tích lũy sesquiterpene phytoalexin khi được kích thích bởi các chất kích kháng [46].

Sự phosphoryl hóa thuận nghịch các protein đích bởi protein kinase (PK) và phosphatase là cơ chế phổ biến để điều hòa chức năng của tế bào ở eukaryote. Các thí nghiệm phospho-proteomic chỉ ra sự phosphoryl hóa nhanh của một vài protein sau khi xử lý với chất kích kháng. Sự phosphoryl hóa protein có thể hoạt hóa trực tiếp các enzyme sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp bằng cách biến đổi hậu dịch mã, hoặc tham gia vào các đợt tín hiệu làm tăng sự biểu hiện của các gen tương ứng. Đặc biệt, các protein kinase được hoạt hóa bởi mitogen ở thực vật (MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase) là trung gian hoạt hóa các đáp ứng nói chung sau khi nhận biết mầm bệnh và các chất kích kháng có nguồn gốc từ mầm bệnh. MAPKs được nghiên cứu đặc tính rộng rãi nhất trong sự phòng thủ của thực vật là protein kinase được cảm ứng bởi SA (SIPK – SA-Induced Protein Kinase) và vết thương (WIPK – Wound-Induced Protein Kinase) ở thuốc lá; MAPK được cảm ứng bởi stress (SAMK – Stress-Activated MAPK) và stress muối (SIMK – Salt-Induced MAPK) ở cỏ linh lăng... Với sự hoạt hóa qua thụ thể trung gian, MAPK được chuyển vị đến nhân để chúng có thể tương tác với các yếu tố phiên mã và cảm ứng sự biểu hiện các gene phòng thủ [46].

1.3.5. Ứng dụng của các chất kích kháng lên sự tích lũy các hợp chất thứ cấp

1.3.5.1. Ảnh hưởng của chất kích kháng phi sinh học

Đa số các stress môi trường (nhiệt độ cao, thấp, hạn hán, phèn, mặn, UV và các mầm bệnh) có khả năng gây hại đối với thực vật. Sự kích kháng được sử dụng rộng rãi để tăng sự sản xuất hoặc giảm sự tổng hợp các hợp chất thứ

cấp trong nuôi cấy tế bào thực vật. Một số nhà nghiên cứu đã sử dụng nhiều chất kích kháng để tăng cường sự sản xuất các hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy cơ quan, mô, tế bào thực vật. Các stress môi trường như sự tấn công của các mầm bệnh, chiếu tia UV, cường độ ánh sáng cao, sự tổn thương, thiếu hụt dinh dưỡng, xử lý nhiệt độ và hóa chất diệt cỏ thường làm tăng sự tích lũy các phenylpropanoid [23].

Stress dinh dưỡng cũng ảnh hưởng đáng kể đến mức độ phenol hóa (phenolic) trong mô thực vật. Nồng độ của đa số các hợp chất thứ cấp mà thực vật sản xuất phụ thuộc nhiều vào điều kiện sinh trưởng và sự tác động của các con đường trao đổi chất để tích lũy các sản phẩm tự nhiên có liên quan. Ảnh hưởng của hạn hán hoặc stress muối gây ra nhiều phản ứng phổ biến ở thực vật, như sự mất nước trong tế bào gây ra stress thẩm thấu hay sự vận chuyển nước từ tế bào chất vào trong không bào [23].

Stress muối trong đất hoặc trong nước là một trong những stress chính, đặc biệt là trong vùng khô hạn và bán khô hạn, gây ra sự giới hạn mạnh về sự sinh trưởng và sản xuất của thực vật. Có giả thuyết rằng khi thực vật chịu stress, có sự thay đổi xảy ra giữa carbon với sản xuất sinh khối hoặc hình thành các hợp chất thứ cấp để bảo vệ cơ thể. Sự đáp ứng stress được cảm ứng khi thực vật ghi nhận stress ở mức độ tế bào. Hợp chất thứ cấp có chức năng bảo vệ trong sự đáp ứng lại các điều kiện stress sinh học và phi sinh học. Sự hình thành của phenyl amide và sự tích lũy nhanh của các polyamin trong hạt và cây thuốc lá dưới ảnh hưởng của các stress phi sinh học đã cho thấy vai trò chống oxy hóa của các hợp chất thứ cấp này [23].

MeJA đã được Wang và cs (2015) sử dụng để tăng sản xuất flavonoid trong nuôi cấy tế bào *Hypericum perforatum*. Khi bổ sung MeJA 100 $\mu\text{mol/L}$ vào môi trường trong 15 ngày đã thu được lượng flavonoid cao nhất là 280 mg/L, gấp 2,7 lần đối chứng. Nguyên nhân có thể do MeJA ức chế hoạt tính

catalase nhưng lại tăng hoạt tính phenylalanine ammonia lyase (PAL), những enzyme liên quan đến quá trình sinh tổng hợp flavonoid, từ đó tăng tổng hợp chất này trong quá trình nuôi cấy [140].

Năm 2016, Khojasteh và cs đã sản xuất thành công rosmarinic acid bằng nuôi cấy tế bào *Satureja khuzistanica* trong nồi phản ứng sinh học (bioreactor). Hai chất kích kháng là MeJA (100 μ M) và cyclodextrin (40 mM) đã được thử nghiệm riêng rẽ hoặc kết hợp. Kết quả cho thấy chỉ có MeJA khi dùng riêng rẽ đã tăng tích lũy rosmarinic acid gấp 3 lần đối chứng, đạt 3,9 g/L. Khi chuyển sang nuôi cấy trong các bioreactor, lượng rosmarinic acid tích lũy tối đa đạt 3,1 g/L [67].

Manivannan và cs (2016) nghiên cứu ảnh hưởng của MeJA, SA lên khả năng sinh tổng hợp các chất chống oxy hóa và các chất chuyển hóa thứ cấp trong nuôi cấy tế bào *Scrophularia kakudensis*. Tất cả các chất kích kháng đều có ảnh hưởng tích cực đến khả năng tích lũy các chất này trong tế bào. Trong đó, MeJA từ 150-200 μ M cho hiệu quả tổng hợp các chất nhóm phenol và flavonoid cao nhất [87].

Saeed (2017) khi nuôi cấy tế bào của rễ cây *Ajuga bracteosa* đã bổ sung thêm MeJA và PAA (phenylacetic acid). Kết quả cho thấy sinh khối tế bào đã tăng đáng kể, đạt tối đa 8,88 g/L dw ở ngày thứ 32 khi bổ sung MeJA 0,6 mg/L, và 8,24 g/L dw ở ngày thứ 40 khi bổ sung PAA 1,2 mg/L. Ngoài ra, khả năng tích lũy các hợp chất phenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hóa cũng tăng lên nhiều lần khi sử dụng hai loại chất kích kháng nói trên [121].

Estrada-Soto và cs (2018) đã nghiên cứu ảnh hưởng của MeJA và SA trong nuôi cấy callus lá của *Leptochinia caulescens* để sản xuất ursolic và oleanolic acid. Nhìn chung, cả hai loại chất kích kháng nói trên đều có ảnh hưởng tích cực lên quá trình sản xuất ursolic và oleanolic acid. Bổ sung MeJA trong 8 giờ đã cho kết quả tốt nhất, hàm lượng các triterpen tăng gấp 5 lần đối chứng [43].

Trong các nghiên cứu trước đây, hàm lượng 9-methoxycanthin-6-one trong rễ cây *Eurycoma longifolia* khá nhỏ. Trần Thu Trang và cs (2018) đã nghiên cứu thu được 9-methoxycanthin-6-one cao nhất từ rễ tơ chuyển gen ($1,139 \pm 0,20\%$ DW), trong khi hàm lượng chất này ở rễ cây tự nhiên chỉ đạt $0,164 \pm 0,25\%$ DW. Ba môi trường lỏng cơ bản bổ sung 3% sucrose đã được sử dụng để nghiên cứu sự phát triển và tích lũy 9-methoxycanthin-6-one. Sự phát triển nhanh nhất được ghi nhận khi sử dụng môi trường Shenck và Hildebrandt (SH) trong khi hàm lượng 9-methoxycanthin-6-one tích lũy đạt cao nhất được quan sát thấy khi sử dụng môi trường cây thân gỗ (WP) của McCown. Trong nghiên cứu này, so với đối chứng, việc sản xuất 9-methoxycanthin-6-one đã tăng lên đạt tối đa 2,6 lần và 4,0 lần sau khi bổ sung jasmonic acid và chiết xuất nấm men lần lượt vào môi trường nuôi cấy rễ tơ. Ngoài ra, nghiên cứu cũng ghi nhận rằng các cytokine IL-6 và TNF- α bị ức chế đáng kể bởi 9-methoxycanthin-6-one trong các tế bào RAW264.7 của chuột, đại thực bào phúc mạc và đại thực bào THP-1 ở người được kích thích bằng lipopolysaccharide. Kết quả này chỉ ra rằng nuôi cấy rễ tơ của cây bách bệnh là một giải pháp thay thế để tạo ra một nguồn sản xuất dồi dào chất kháng viêm 9-methoxycanthin-6-one phục vụ mục đích y học của con người [135].

1.3.5.2. Ảnh hưởng của các chất kích kháng sinh học

Chất kích kháng sinh học như các phân tử từ nấm, vi khuẩn, virus và động vật ăn cỏ, cũng như các chất có nguồn gốc từ thực vật được giải phóng tại vị trí bị tấn công có khả năng kích hoạt đáp ứng bảo vệ ở thực vật, bao gồm sự tích lũy phytoalexin [46].

Admeh và cs (2014) đã dùng dịch chiết của *A. niger*, *P. notatum*, YE và chitosan để kích thích sản xuất psoralen trong nuôi cấy tế bào cây *Psoralea corylifolia*. Bổ sung dịch chiết *A. niger* đã tăng lượng psoralen lên 9 lần so với đối chứng. Trong khi dùng *P. notatum*, YE và chitosan lượng psoralen thu

được ít hơn 4-7 lần. Nói chung, dịch chiết *A. niger* 1% cho hiệu quả cao nhất, hàm lượng psoralen đạt 9.850 µg/g sinh khối khô [22].

Nghiên cứu của Hasanloo và cs (2014) cho thấy, chitosan có khả năng kích thích tổng hợp silymarin trong nuôi cấy rễ tơ của loài *Silybum marianum*. Rễ tơ sau 30 ngày nuôi cấy được xử lý với chitosan có khối lượng phân tử trung bình. Hàm lượng silymarin tổng số tăng lên 5,26 lần và khối lượng khô của rễ tơ đạt cao nhất là 0,535 g sau 96 giờ xử lý với 30 mg/50 mL chitosan [55].

Hiệu quả của các chất kích kháng sinh học cũng được Ebrahimi và cs (2015) thử nghiệm trong nuôi cấy tế bào *Peganum harmala* để tăng sinh tổng hợp hai loại alkaloid β -carboline là harmaline và harmine. Nuôi cấy đã được xử lý với dịch chiết của các loại nấm (*Alternaria alternate*, *A. flavus*, *Coriolus versicolor*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp., *P. notatum* và *Rhizopus stonifer*), dịch thủy phân casein và YE ở các nồng độ khác nhau. Lượng harmine thu được cao nhất khi bổ sung YE 1.000 mg/L là 91,2 µg/g dw, gấp 1,68 lần đối chứng. Khi bổ sung dịch thủy phân casein từ 75-100 mg/L vào nuôi cấy, sinh khối tế bào đã tăng mạnh, lượng harmaline và harmine cũng tăng lần lượt gấp 1,61 và 1,46 lần đối chứng [42].

Silene vulgaris là một loài thực vật được phân bố rộng rãi ở Bắc Mỹ chứa các saponin loại oleanane có hoạt tính sinh học. Khả năng sản xuất saponin bằng nuôi cấy rễ tơ của loài này đã được Kim và cs (2015) nghiên cứu thành công. Rễ tơ của *S. vulgaris* được hình thành bằng cách lây nhiễm các mẫu lá với nấm chủng *Agrobacterium rhizogenes* khác nhau (LBA9402, R1000, A4, 13333 và 15834). Khi bổ sung MeJA vào môi trường nuôi cấy, khả năng tích lũy saponin triterpenoid trong rễ tơ có sự thay đổi đáng kể. Lượng segetalic acid và gypsogenic acid cao gấp 5 và 2 lần tương ứng so với đối chứng [68].

Arican (2016) nghiên cứu ảnh hưởng của các loại chất kích kháng sinh

học đến khả năng tổng hợp triterpene trong nuôi cấy tế bào *Alstonia scholaris*. Nuôi cấy được xử lý dịch chiết các loại nấm *Candida albicans*, *F. oxysporum*, *P. avelanum* và YE. Các chất kích kháng gây ra sự kích thích nhanh chóng quá trình trao đổi chất thứ cấp của các tế bào *A. scholaris* dẫn đến tăng tổng hợp triterpenoid. Khi tiếp xúc trong thời gian dài, một số dòng tế bào có khả năng tăng gấp đôi sản lượng của triterpene. YE là chất kích kháng tốt nhất cho tất cả các dòng tế bào được khảo sát với lượng ursolic acid và oleanolic acid tích lũy được tương ứng là 5 và 7 mg/g khô [28].

Hyoscyamine và scopolamine là hai loại alkaloid tropane rất có giá trị, thường được sử dụng để làm chất chống đông máu, chống co thắt, chống dị ứng, giảm đau và làm thuốc an thần. Các chất này được phát hiện có nhiều trong loài *Hyoscyamus reticulatus*. Để tìm phương pháp sản xuất hyoscyamine và scopolamine tốt nhất, Moharrami và cs (2017) đã thử nghiệm nuôi cấy rễ tơ của cây này mầm từ hạt được biến nạp chủng *A. rhizogenes* A7 có xử lý chất kích kháng sinh học ở các nồng độ và thời điểm khác nhau. Kết quả thu được cho thấy, YE ở 500 và 250 mg/L sau 48 giờ xử lý là tốt nhất, hàm lượng hyoscyamine và scopolamine đã tăng gấp 2 và 2,5 lần tương ứng so với đối chứng [93].

Năm 2018, Lee và cs đã nghiên cứu phương thức tăng khả năng tổng hợp saponin trong nuôi cấy tế bào *Kalopanax septem Lobus* bằng cách sử dụng chất kích kháng. Khi không bổ sung chất kích kháng, hàm lượng saponin tổng số thu được là 1,56 mg/60 mL sau 15 ngày nuôi cấy. Khi bổ sung coronatine 1 μ M, lượng saponin được tích lũy tăng lên 160%. Ngoài ra, các tác giả nhận thấy coronatine còn làm tăng biểu hiện sinh tổng hợp β -amyrin từ đó dẫn đến tích lũy oleanolic acid (tiền thân của oleanan-một loại saponin triterpene) [73].

Bên cạnh việc sử dụng riêng lẻ các loại chất kích kháng sinh học và phi

sinh học, rất nhiều công trình nghiên cứu đã sử dụng kết hợp các chất kích kháng để mang lại hiệu quả cao hơn. Artemisinin là chất thường được sử dụng để sản xuất thuốc chống sốt rét ở các nước châu Á và châu Phi. Ahlawat và cs (2014) đã thiết lập nuôi cấy rễ tơ cây *Artemisia annua* để sản xuất bằng cách bổ sung MeJA, dịch chiết nấm (*A. alternate*, *Curvularia limata*, *F. solani* và *Piriformospora indica*), farnesyl pyrophosphate và miconazole vào môi trường nuôi cấy. Kết quả xử lý riêng rẽ các chất kích kháng cho thấy hiệu quả cao nhất thu được khi sử dụng dịch chiết *P. indica*, hàm lượng artemisinin cao gấp 1,97 lần đối chứng. Tuy nhiên, khi kết hợp xử lý MeJA và *P. indica*, hàm lượng artemisinin đã tăng lên cao hơn, đạt 2,44 lần [20].

1.4. GIỚI THIỆU VỀ EURYCOMANONE

1.4.1. Tổng quan về eurycomanone

Một số lượng lớn các hợp chất thứ cấp đã được tìm thấy trong rễ cây bách bệnh như eurycomanone, eurycomaoside, eurycolactone, eurycomalactone, canthin-6-one alkaloids, quassinoid diterpenoids, β -carboline alkaloids, tirucallane-type triterpenes, biphenylneolignans, laurycolactone, và các dẫn xuất của squalene [44].

Các hợp chất trao đổi thứ cấp như eurycomanone, 9-methoxycanthin 6-one, 14,15- β -dihydroxyklaineanone và 13,21-epoxyeurycomanone được sử dụng như là chất chuẩn để tiêu chuẩn hóa dịch chiết hoặc các sản phẩm khác có nguồn gốc từ cây bách bệnh. Một số nghiên cứu đã cho thấy rằng eurycomanone là hợp chất có hàm lượng cao trong rễ cây bách bệnh, là hợp chất thuộc nhóm quassinoid có giá trị dược liệu chính, nó có khả năng phục hồi năng lượng, tăng cường khối lượng cơ và xương và cải thiện vấn đề giới tính [14].

Eurycomanone chỉ được tìm thấy duy nhất trong cây bách bệnh, có nhiều nhất ở trong rễ [21]. 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 loét (antiulcer activity), gây độc các dòng tế bào ung thư và kháng sốt rét [71].

Bằng các phương pháp sắc ký, Đoàn Mạnh Dũng và cs (2018) đã phân lập được hợp chất eurycomanone từ cây bách bệnh (*E. longifolia* J.). Cấu trúc của hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và ESI-MS (electrospray ionization-mass spectrometry - Ion hóa tia điện-khối phổ). Hợp chất này được tinh sạch (độ tinh khiết trên 99,5%) bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế, và được sử dụng để làm chất chuẩn để phân tích hàm lượng eurycomanone trong các mẫu dược liệu bách bệnh bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS-liquid chromatography- mass spectrometry). Các tác giả đã xây dựng được chương trình sắc ký sử dụng hệ thống LC-MS/MS như sau: pha tĩnh cột sắc ký EC-C18 ($100 \times 2,1$ mm; $2,7$ μm), pha động: ACN (acetonitrile) (A) – nước chứa 0,1% HCOOH (B) trong thời gian 5 phút với tỉ lệ tăng từ 15% đến 60% A, tốc độ dòng $0,3$ mL/phút, thể tích tiêm mẫu: 1 μL ; nhiệt độ buồng cột: 35 $^{\circ}\text{C}$; dung môi pha mẫu: $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ là 70:30 (v/v). Điều kiện khối phổ bao gồm nguồn ion hóa ESI, loại ion dương, nhiệt độ nguồn ion hóa là 300°C , chế độ chạy MRM với ion sơ cấp m/z 409,1 và ion thứ cấp là m/z 391,0. Kết quả cho thấy hàm lượng eurycomanone cao nhất khi thu hái ở Bắc Giang ($3,1336 \pm 0,0005$ mg/g), thấp nhất ở Đắk Nông ($0,1716 \pm 0,0001$ mg/g). Hợp chất eurycomanone là thành phần hoạt chất chính và được coi là chất đặc trưng của bách bệnh nói riêng và các loài *Eurycoma* nói chung [1].

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) [18].

1.4.2. Sản xuất eurycomanone bằng nuôi cấy mô tế bào

Nuôi cấy rễ tơ cây bách bệnh đã được phát triển bằng cách sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* để sản xuất hóa chất có nguồn gốc từ cây này. Ảnh hưởng của ba chất kích kháng: methyl jasmonate, salicylic acid và dịch chiết nấm men ở các nồng độ khác nhau đã được đánh giá ảnh hưởng đến việc sản xuất 9-methoxycanthin-6-one trong rễ tơ. Các mẫu nuôi cấy được tạo ra ở giai đoạn đầu tăng trưởng theo cấp số nhân, tiếp theo là quá trình chiết xuất 9-methoxycanthin-6-one bằng cách sử dụng methanol kết hợp phương pháp HPLC. Kích kháng với methyl jasmonate ở tất cả các nồng độ làm tăng 9-methoxycanthin-6-one lên 1-3 lần và xử lý với nồng độ 0,1 mM cho hiệu quả nhất trong việc tăng cường sản xuất 9-methoxycanthin-6-one, đạt đến 3.902 mg/g khối lượng khô sau 7 ngày (168 giờ) kích kháng [16].

Phan Tường Lộc và cs (2020) đã nghiên cứu tạo rễ tơ có khả năng sinh trưởng mạnh và tổng hợp eurycomanone cao nhằm tạo ra nguồn vật liệu *in vitro* có chất lượng ổn định. Hai dòng rễ tơ R1, R2 chọn lọc được có khả năng tăng trưởng mạnh, với mức nhân sinh khối trong 2 tuần lần lượt là 16; 15,5 (g/g, khối lượng tươi) trên môi trường SH lỏng với 3% sucrose. Các dòng rễ này có nhiều tiềm năng để được tiếp tục nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy tối ưu cho việc sản xuất sinh khối sử dụng hoạt chất [6].

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.

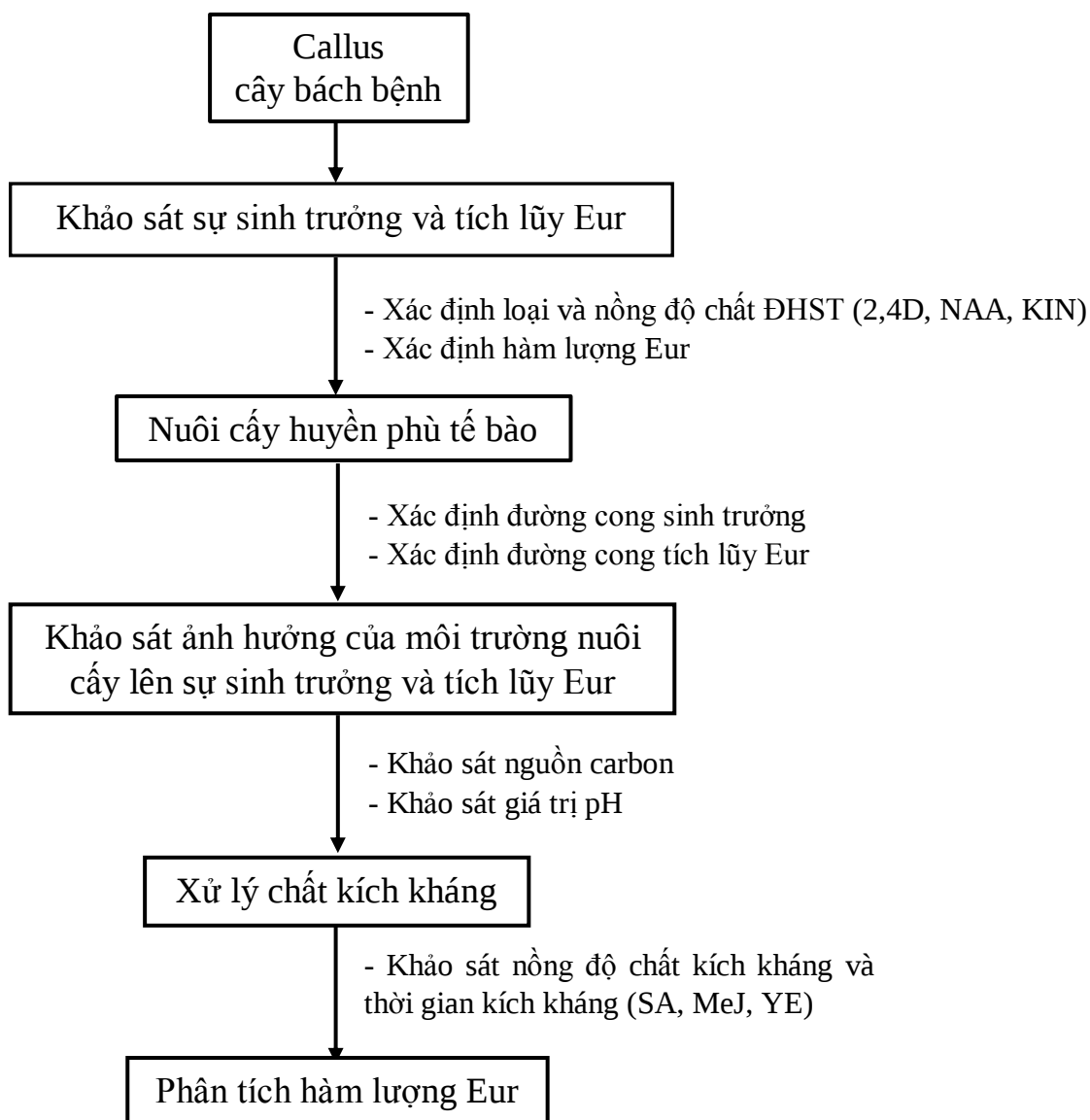


Hình 2.1. Cây bách bệnh 3 năm tuổi (bên trái) và 2 năm tuổi (bên phải) [84]



Hình 2.2. Callus cây bách bệnh sau 14 ngày nuôi cấy

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm

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) [99] 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 121⁰C (1 atm) trong 20 phút.

Mẫu thí nghiệm được cấy trong các bình tam giác có thể tích 250 mL chứa 50 mL môi trường, đặt trong phòng nuôi cấy có nhiệt độ ổn định ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), cường độ chiếu sáng 2.000-3.000 lux và thời gian chiếu sáng 8-10 giờ/ngày, ngoại trừ nuôi cấy tế bào là 500 lux.

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.

Các chất ĐHST được pha với dung môi thích hợp và bổ sung vào môi trường nuôi cấy trước khi khử trùng.

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 [13], [75].

Chỉ số sinh trưởng (GI-growth index) của tế bào được xác định bởi công thức:

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

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.

Xây dựng đường cong sinh trưởng: tế bào được lọc và rửa sạch môi trường với nước cất bằng hệ thống lọc chân không, cân để xác định khối lượng tươi, sau đó, tế bào được sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi, cân để xác định khối lượng khô, số liệu thu được dùng để xây dựng đường cong sinh trưởng của tế bào.

Xây dựng đường cong tích lũy: dịch chiết methanol của sinh khối khô tế bào (mục 2.2.7) được phân tích HPLC để xác định hàm lượng eurycomanone (mục 2.2.8). Số liệu thu được dùng để xây dựng đường cong tích lũy 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

Chuẩn bị chất kích kháng

Các chất kích kháng YE, MeJA (95%) và SA (99%) được cung cấp bởi hãng Merck (Đức). Sau khi pha dung dịch mẹ, dung dịch YE được hấp khử trùng, dung dịch MeJA và SA được lọc qua màng lọc 0,025 trước khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

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 (có nguồn carbon và pH đã xác định ở mục 2.2.4 và 2.2.5) 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 [16], [82], [83]. Đối chứng là công thức không bổ sung chất kích kháng (đã xác định ở mục 2.2.5). Sau thời gian nuôi cấy nhất định (được 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.

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 (đã xác định ở trên). Sau thời gian nuôi cấy nhất định (đã xác định ở mục 2.2.3), 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) [91] 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 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 (tuổi của cây được xác định tương đối bằng cách phỏng vấn người dân).

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) [108] 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 (Đường chuẩn eurycomanone được trình bày ở phần Phụ lục).

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. Trong thí nghiệm nuôi cấy callus, mỗi bình nuôi cấy từ 8-10 mẫu.

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

Theo các tài liệu đã công bố, callus cây bách bệnh thường sinh trưởng tốt trên các môi trường MS cơ bản có bổ sung 2,4-D, NAA và KIN [60], [103], [126]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát khả năng phối hợp của các chất này lên sự tích lũy sinh khối của callus cây bách bệnh, trong đó, các chất 2,4-D, NAA được sử dụng riêng rẽ hay kết hợp với KIN.

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

Khoảng 3 g callus được cấy lên môi trường MS có bổ sung các chất ĐHST với các nồng độ khác nhau, sau 2 tuần nuôi cấy callus được thu, xác định khối lượng tươi và khô để đánh giá khả năng sinh trưởng của callus. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng (2,4-D, NAA và KIN) lên khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh được trình bày ở các bảng 3.1, 3.2 và 3.3).

3.1.1.1. Ảnh hưởng của 2,4-D

Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của 2,4-D lên khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh được trình bày ở bảng 3.1. Qua bảng 3.1 cho thấy 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, callus có màu vàng đậm, rắn và rời rạc.

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). Chú thích này dùng chung cho tất cả các bảng.

3.1.1.2. Ảnh hưởng của NAA

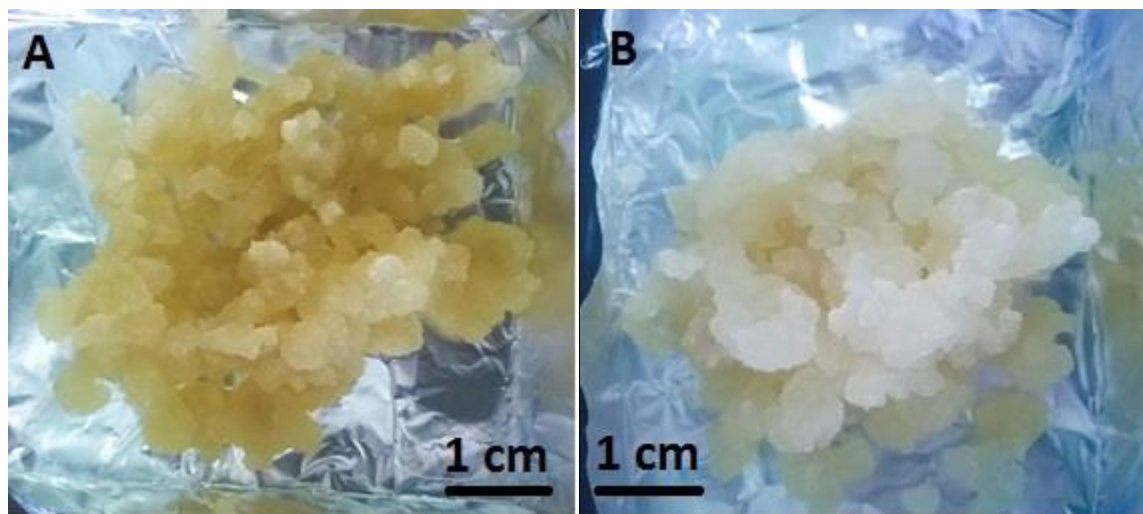
Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của NAA lên khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh được trình bày ở bảng 3.2.

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

Qua bảng 3.2 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, callus có màu vàng đậm, rắn, rời rạc (Hình 3.1 A). 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), callus có màu vàng nhạt và mỏng nước (Hình 3.1 B).



Hình 3.1. Callus sinh trưởng trên môi trường có 1,25 mg/L NAA (A) và 2,25 mg/L NAA (B) sau 14 ngày nuôi cấy.

3.1.2. Ảnh hưởng của kết hợp các chất ĐHST

Trong nội dung nghiên cứu ảnh hưởng của các chất ĐHST 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.

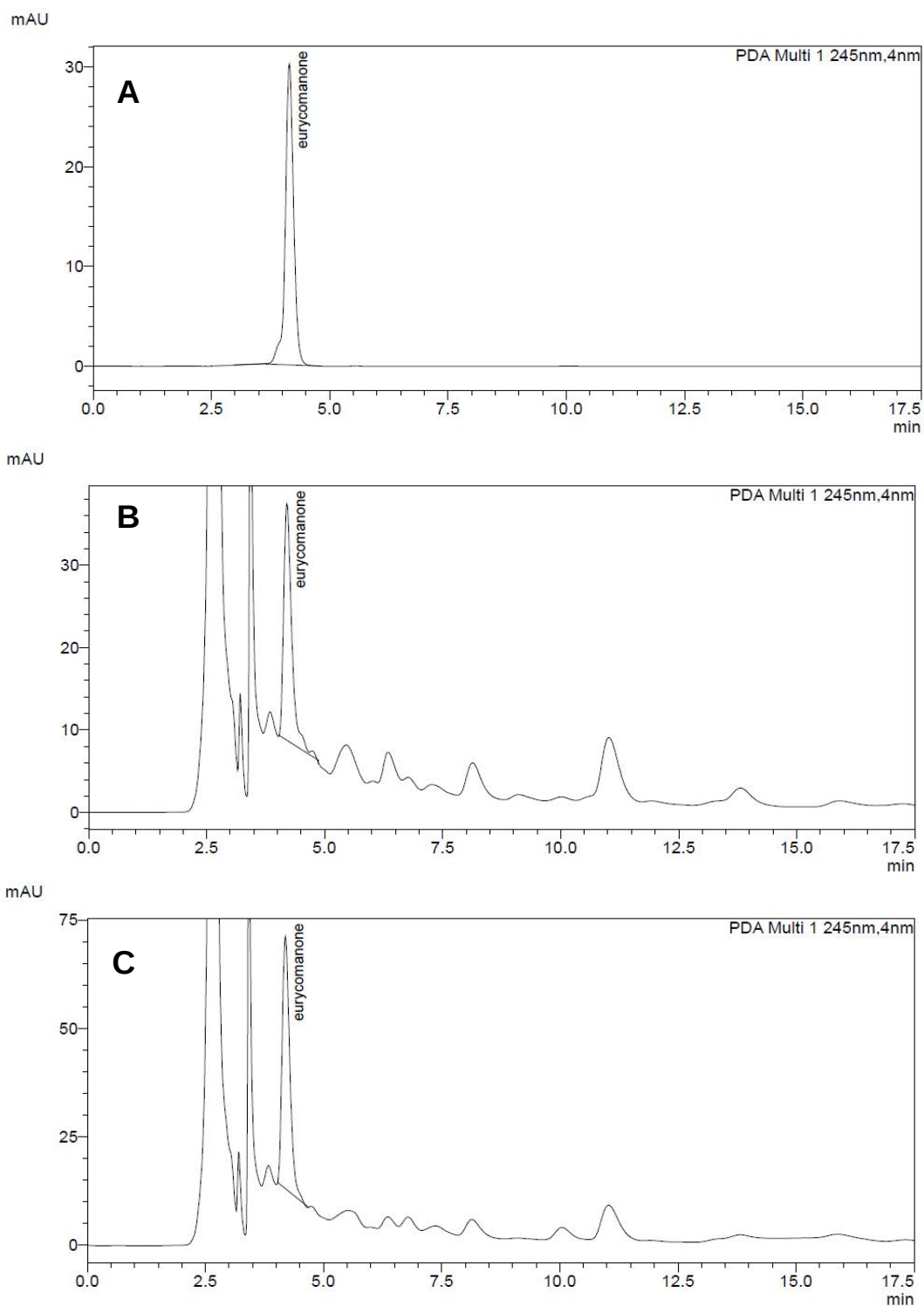
Kết quả kết hợp giữa 1,25 mg/L NAA với các nồng độ khác nhau của KIN (0,50-2,00 mg/L, mỗi công thức chênh nhau 0,25 mg) được trình bày ở bảng 3.3. Kết quả cho thấy sinh khối callus đạt cao nhất (30,98-32,34 g tươi/bình, tương ứng với 1,26-1,31 g khô/bình) thu nhận từ môi trường MS chứa 0,75 – 1,00 mg/L KIN, GI đạt tương ứng là 10,3-10,7. 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 ĐHST.

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 (GI)	Hình thái callus
	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	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

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 nuôi cấy 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) (Hình 3.2). Như vậy, có thể khẳng định có sự sinh tổng hợp eurycomanone trong callus cây bách bệnh, đây là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu nuôi cấy tế bào huyền phù cây bách bệnh nhằm sản xuất eurycomanone sau này.



Hình 3.2. Phổ HPLC phân tích hàm lượng eurycomanone trong callus.

A. Eurycomanone chuẩn (Diện tích peak (S): 366964), **B.** Dịch chiết callus 14 ngày tuổi của cây bách bệnh (S: 340054), **C.** Dịch chiết rễ cây bách bệnh khoảng 5 năm tuổi trồng trong điều kiện tự nhiên (S: 645974).

Tóm lại, môi trường cơ bản MS có bổ sung 1,25 mg/L NAA và 1,00 mg/L KIN cho hiệu quả tốt nhất, callus sinh trưởng mạnh với chỉ số sinh trưởng đạt 10,07, khối lượng tươi lên tới 32,34 g/bình, tương ứng với khối lượng khô là 1,31 g/bình. Hàm lượng eurycomanone trong callus là 0,17 mg/g chất khô, bằng khoảng 8% so với mẫu rễ cây tự nhiên khoảng 5 năm tuổi.

3.2. THIẾT LẬP NUÔI CÂY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO

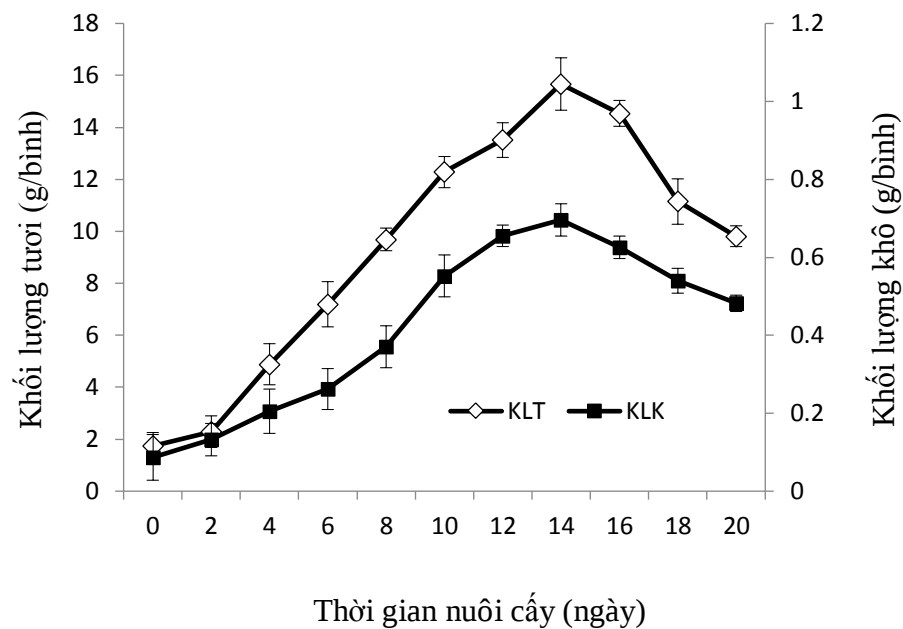
Kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật có nhiều triển vọng và ứng dụng lâu dài trong việc sản xuất các hợp chất tự nhiên, đặc biệt là các chất dùng trong y học. Hướng nghiên cứu này sẽ dẫn đến sự ổn định về mặt chất lượng và số lượng sản phẩm, ít phụ thuộc vào tự nhiên. Đồng thời, là nguồn nguyên liệu cho những thí nghiệm sinh lý, hóa sinh và ứng dụng để tách chiết các hợp chất thứ cấp khác nhau [5]. Các nghiên cứu cho thấy rằng, nuôi cấy tế bào thực vật có khả năng sản xuất các sản phẩm thứ cấp với hàm lượng lớn hơn so với các chất đó được chiết từ cây ngoài tự nhiên [78]. Ưu điểm của chúng là có thể cung cấp sản phẩm một cách liên tục và đáng tin cậy.

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

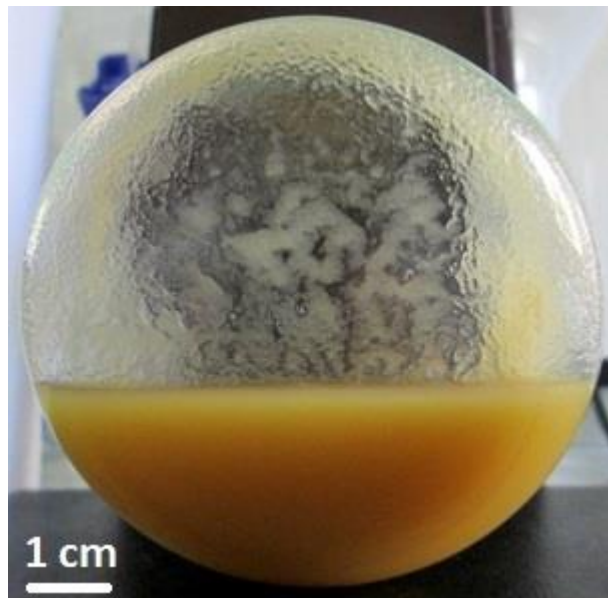
Trong nghiên cứu này, tế bào cây bách bệnh được nuôi cấy trong môi trường lỏng nhằm tạo nguồn nguyên liệu cho quá trình nghiên cứu sản xuất eurycomanone sau này. Để xác định thời điểm sinh trưởng cực đại của tế bào bách bệnh khi nuôi cấy huyền phù, chúng tôi đã chuyển 3 g callus (tương đương 1,7 g sau khi hút chân không) vào bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường MS lỏng bổ sung 3% sucrose; 1,25 mg/L NAA và 1,00 mg/L KIN với tốc độ lắc 120 vòng/phút để theo dõi đường cong sinh trưởng của tế bào trong 20 ngày.

Kết quả nghiên cứu được trình bày trong các hình từ 3.3-3.5 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 rất ngắn sau đó nhanh chóng chuyển

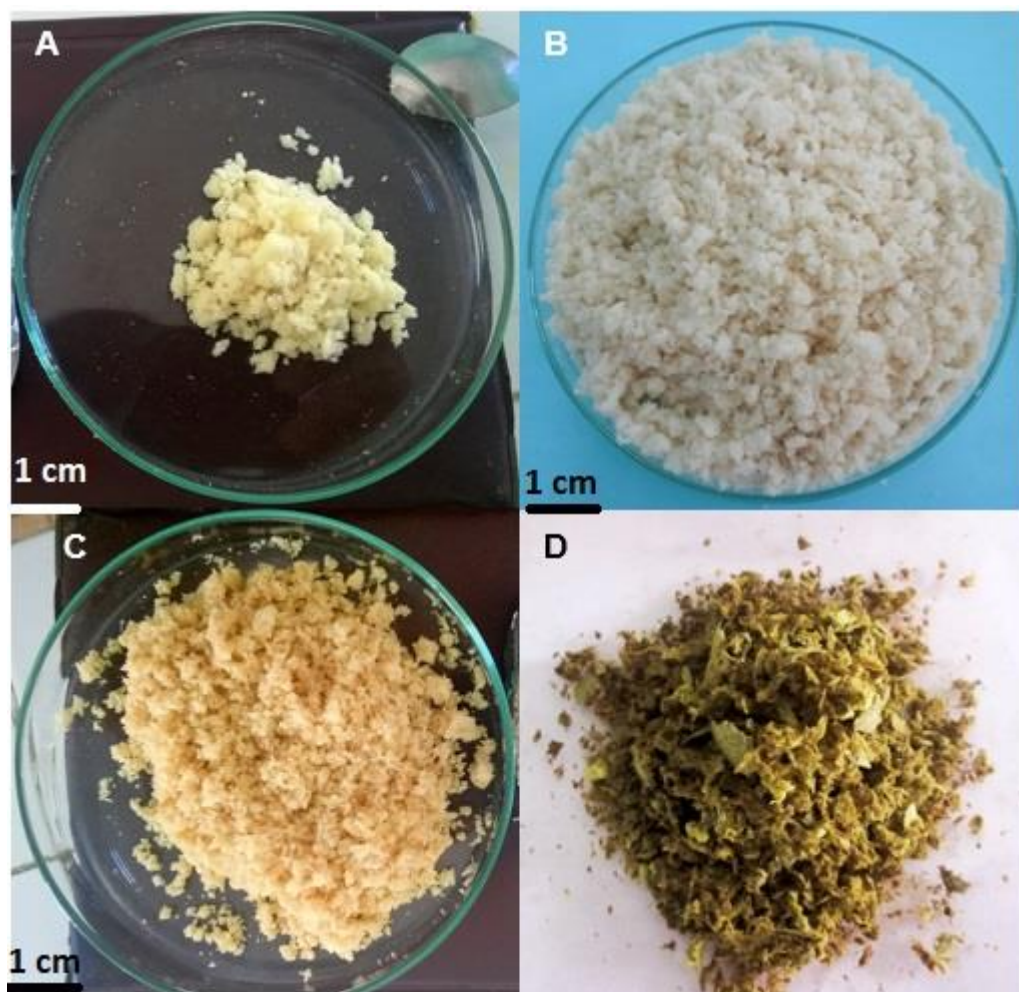
qua pha chết. Với tỷ lệ tiếp mẫu khoảng 1,7 g mẫu bầu đầu, sinh trưởng tế bào đạt cực đại vào ngày thứ 14, khối lượng tươi thu được là khoảng 15,67 g/bình (0,69 g khô/bình), cao gấp 9,21 lần sinh khối tươi ban đầu.



Hình 3.3. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù cây bách bệnh sau 20 ngày nuôi cấy (KLT: Khối lượng tươi, KKK: Khối lượng khô).

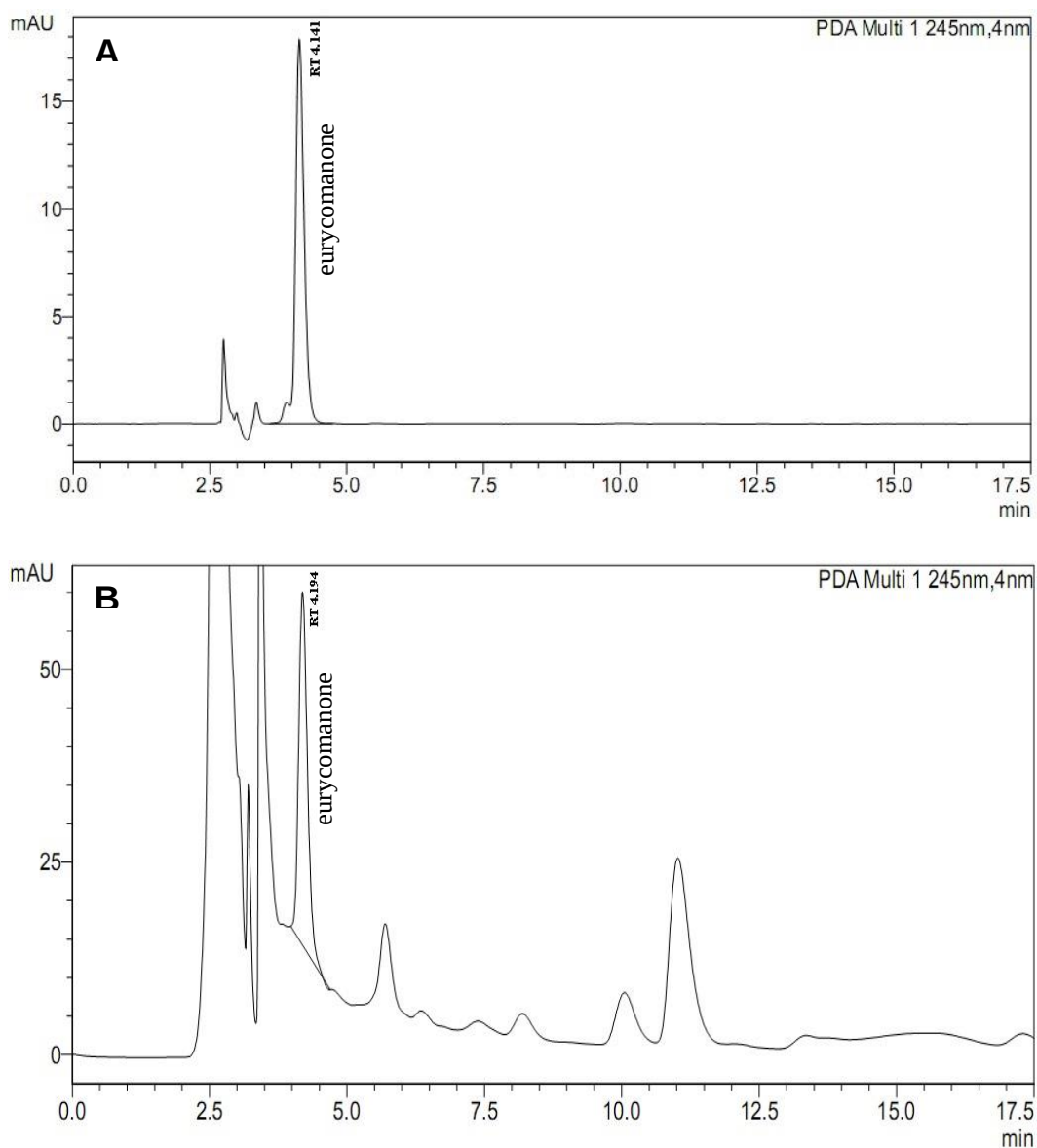


Hình 3.4. Tế bào huyền phù trong bình tam giác 250 mL chứa 50mL môi trường sau 14 ngày nuôi cấy



Hình 3.5. Sinh khối tươi và khô của tế bào cây bách bệnh. **A.** Sinh khối tươi sau 6 ngày, **B.** Sinh khối tươi sau 14 ngày, **C.** Sinh khối tươi sau 20 ngày, **D.** Sinh khối khô sau 14 ngày.

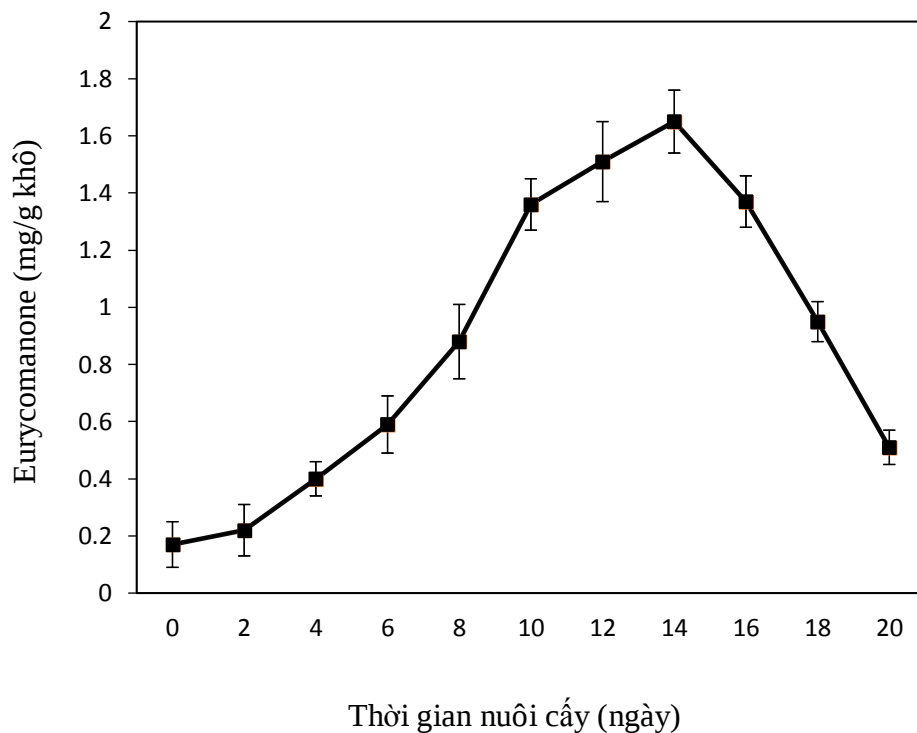
Phân tích HPLC được tiến hành trên dịch chiết tế bào và kết quả cho thấy một peak với thời gian lưu là 4,194 phút, tương tự như của chất chuẩn eurycomanone (4,141 phút) (Hình 3.6). Như vậy, eurycomanone đã được tổng hợp trong tế bào *in vitro* cây bách bệnh và sự biến đổi sinh học đường như không có sai khác ý nghĩa.



Hình 3.6. Phổ HPLC phân tích hàm lượng eurycomanone trong tế bào.

A. Eurycomanone chuẩn (S: 198580), **B.** Dịch chiết eurycomanone từ tế bào huyền phù 14 ngày tuổi (S: 509469)

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 3.7).



Hình 3.7. Đường cong tích lũy eurycomanone của tế bào huyền phù cây bách bệnh sau 20 ngày nuôi cấy

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

Nguồn carbon 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 [25]. Ngoài ra, chúng cũng có thể là phân tử tín hiệu và đóng vai trò tương tự chất ĐHST thực vật, 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 gene mã hoá enzyme [61].

Mặc dù sucrose và glucose được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy tế bào thực vật. Tuy nhiên, mỗi loài lại thích hợp với một nguồn carbon khác nhau cần cho quá trình hình thành các sản phẩm trao đổi chất của chúng. Trong nuôi cấy tế bào thực vật, nhiều loại đường đơn cũng đã được sử dụng như glucose, fructose, sorbitol, galactose...[89]. Do đó, việc khảo sát nguồn cung cấp carbon và nồng độ thích hợp là cần thiết.

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

Nguồn carbon	Khối lượng tươi	Khối lượng khô	Eurycomanone
(%)	(g)	(g)	(mg/g)
Glucose	2	17,58 ^b	0,43 ^c
	3	20,30 ^a	0,59 ^b
	4	12,57 ^c	0,44 ^c
Sucrose	2	17,62 ^b	0,44 ^c
	3	17,43 ^b	0,72 ^a
	4	18,00 ^b	0,61 ^b
Fructose	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các nguồn carbon được sử dụng là sucrose, fructose và glucose ở nồng độ 2-4%. 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. Trong nuôi cấy sinh khối để sản xuất hợp chất thứ cấp, sự tích lũy sinh khối khô đóng vai trò rất quan trọng, vì thế công thức môi trường có sự tích lũy sinh khối khô cao nhất là sucrose 3% được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ở môi trường nuôi cấy chứa sucrose 3%, sự sản xuất eurycomanone của tế bào đạt cao nhất (1,70 mg/g khô, tương ứng với 1,224 mg/bình). Ảnh hưởng của nồng độ glucose lên sự tích lũy eurycomanone thấp hơn sucrose, hàm lượng eurycomanone đạt 1,36 mg/g chất khô ở nồng độ 4% glucose và thấp nhất là 0,47 mg/g chất khô ở nồng độ 2%.

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 (1,269 mg/bình).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào huyền phù cây bách bệnh

pH	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (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

Như vậy, kết quả thu được tốt nhất khi nuôi tế bào trong bình tam giác chứa 50 mL môi trường lỏng bổ sung 3% sucrose, pH 5,75, với tỷ lệ tiếp mẫu là 3 g. 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.

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

Trong nghiên cứu này, các nồng độ khác nhau của dịch chiết nấm men (20-50 mg/L), methyl jasmonate (0,01-1 mM), và salicylic acid (0,01-1 mM) ảnh hưởng lên khả năng sinh trưởng và tích lũy eurycomanone của tế bào sau

14 ngày nuôi cấy đã được xác định.

3.3.1.1. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men

Dịch chiết nấm men là một chất kích kháng sinh học, được sử dụng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật để tăng khả năng kích thích bộ máy bảo vệ, từ đó gia tăng sản xuất các hợp chất thứ cấp [54].

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), kết quả này cao hơn đối chứng khoảng 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

MeJA và jasmonic acid là những hợp chất ĐHST thực vật có vai trò trong sự lão suy của thực vật, tham gia vào con đường truyền tín hiệu ngoại sinh (stress, vết thương, sinh vật gây bệnh) và cảm ứng hoạt động của hệ

thống bảo vệ ở thực vật. MeJA khởi động sự phiên mã mRNA *de novo* của các gen *PAL* dẫn tới sự tạo phenylalanine ammonia-lyase, enzyme đầu tiên của con đường phenylpropanoid liên quan chặt chẽ đến sự sản xuất các hợp chất thứ cấp (HCTC) ở thực vật (Brincat và cs, 2002) (dẫn theo Lê Thị Thủy Tiên và cs, 2010) [9]. MeJA đã được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi làm chất kích kháng trong sản xuất các HCTC từ nuôi cấy tế bào thực vật [133].

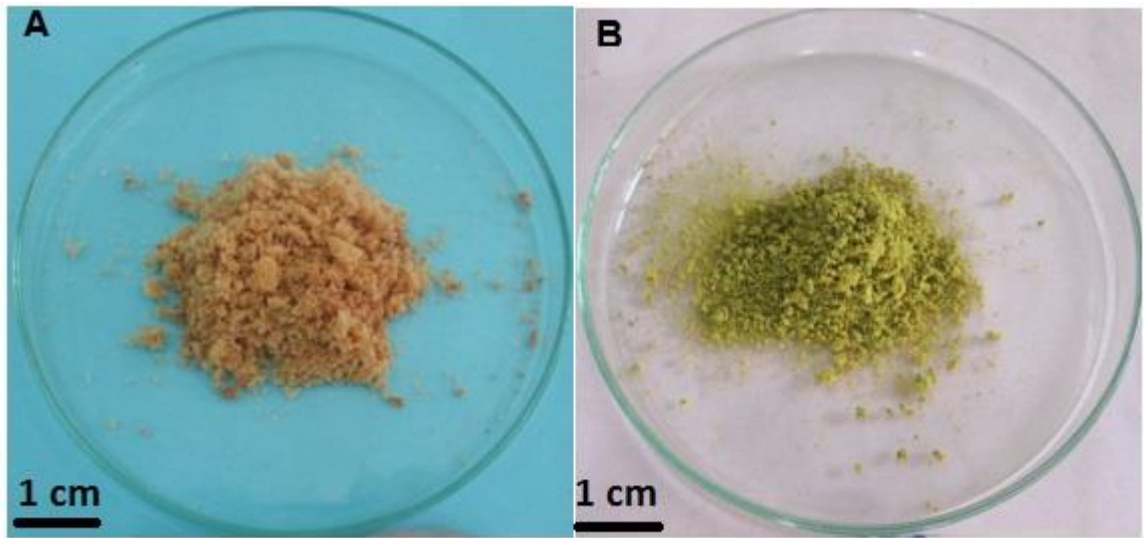
Khác với khi xử lý bằng YE, kích kháng bằng MeJA ảnh hưởng một cách rõ rệt đến sự sinh trưởng của tế bào bách bệnh. Sự sinh trưởng của tế bào giảm một cách đáng kể khi nồng độ MeJA tăng từ 0,01- 0,50 mM. Ở nồng độ 1,00 mM MeJA, tế bào hóa nâu, không phát triển (Bảng 3.7 và Hình 3.8).

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 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.



Hình 3.8. Sinh khối tươi (A) và khô (B) của tế bào khi xử lý 0,02 mM MeJA sau 14 ngày nuôi cấy.

3.3.1.3. Ảnh hưởng của salicylic acid

Salicylic acid là một hợp chất tín hiệu thực vật quan trọng trong việc kích hoạt các gene liên quan đến cơ chế bảo vệ. Khi sử dụng làm chất kích kháng, SA ảnh hưởng đến khả năng tích lũy các hợp chất liên quan đến cơ chế bảo vệ. SA được biết như là tác nhân chống chịu tương tác thực vật gây bệnh, nhưng không phải là chất cảm ứng vạn năng trong sản xuất các chất chuyển hóa bảo vệ thực vật [35]. Theo Taguchi và cs (2001), SA tích lũy ở các vị trí mầm bệnh để tấn công và kích thích hệ thống bảo vệ thực vật và việc sản xuất các hợp chất thứ cấp [129]. 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.

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).

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.

3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời điểm kích kháng

Thời điểm bổ sung chất kích kháng là yếu tố quan trọng sẽ ảnh hưởng đến phản ứng của tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro*. Các nồng độ tối ưu của YE (200 mg/L), MeJA (0,02 mM) và SA (0,02 mM) từ khảo sát phía trên sẽ được sử dụng để tìm thời điểm cảm ứng thích hợp với mục đích cải thiện sự tích lũy eurycomanone trong nuôi cấy huyền phù tế bào cây bách bệnh.

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

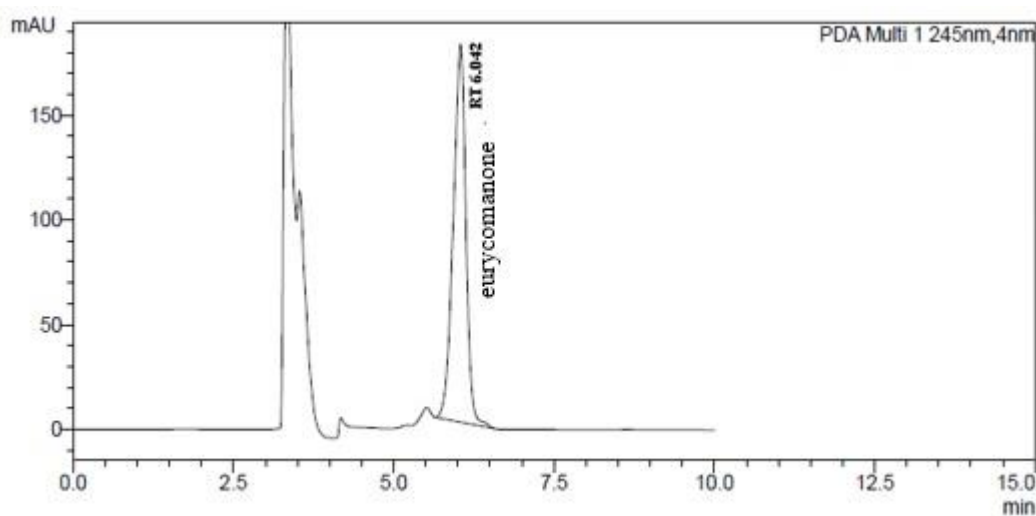
Đối với sinh trưởng của tế bào, YE khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở các thời điểm 8 và 12 ngày có tác dụng làm tăng khả năng sinh trưởng của tế bào, tuy nhiên, không có sự khác biệt trong tích lũy chất khô giữa các công thức (Bảng 3.9).

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

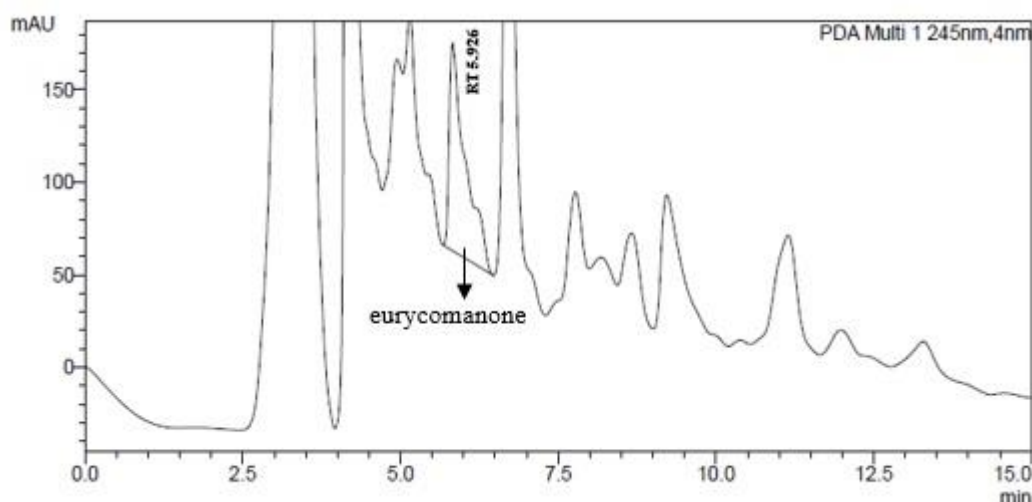
khô (tương ứng 3,125 mg/bình), cao gấp 3,68 và 2,98 lần so với mẫu đối chứng không được xử lý chất kích kháng và mẫu rễ của cây 5 năm tuổi.

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



Hình 3.9. Phổ HPLC của eurycomanone chuẩn trong thí nghiệm thời điểm kích kháng (S: 2472518)



Hình 3.10. Phổ HPLC của dịch chiết eurycomanone khi kích kháng YE 200 mg/L sau 6 ngày nuôi cấy (S: 2000849)

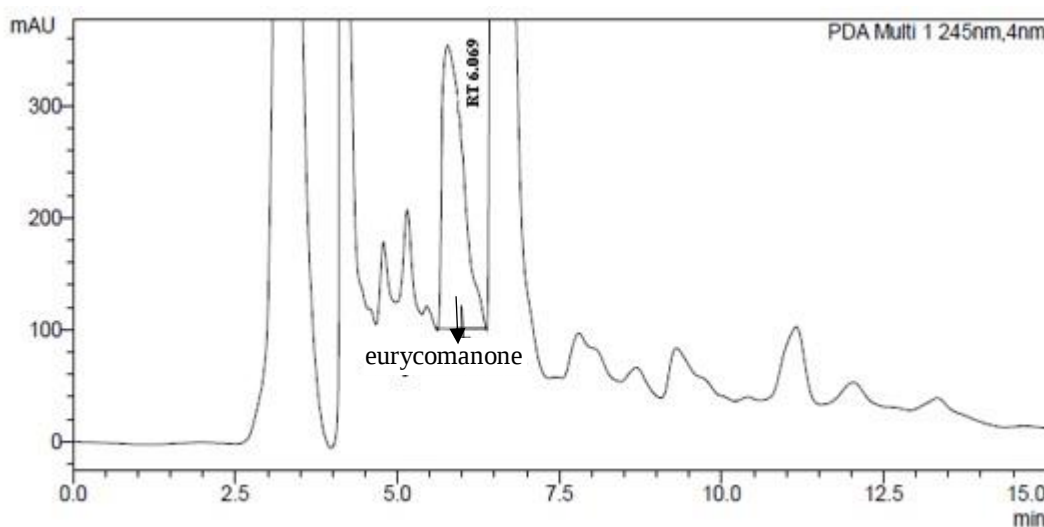
3.3.2.2. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng MeJA lên sự tích lũy eurycomanone

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 ở ngày thứ 4 và ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy 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 không được xử lý và mẫu rễ của cây 5 năm tuổi.

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



Hình 3.11. Phổ HPLC của dịch chiết eurycomanone khi kích kháng MeJA 0,02 mM sau 4 ngày nuôi cấy (S: 5932797)

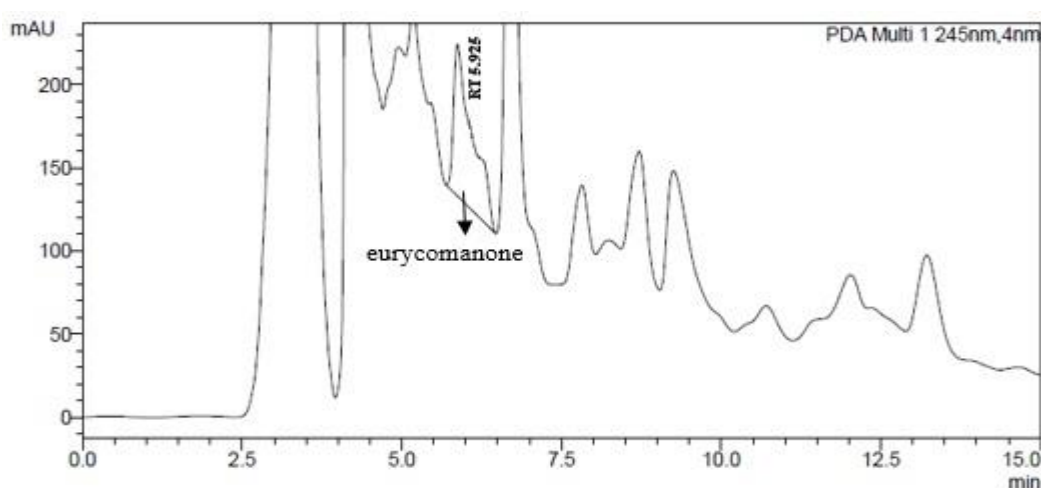
3.3.2.3. Ảnh hưởng của thời điểm kích kháng SA lên sự tích lũy eurycomanone

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. Đối với SA, 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, Hình 3.12). 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 3.11. 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



Hình 3.12. Phổ HPLC của dịch chiết eurycomanone khi kích kháng SA 0,02 mM sau 4 ngày nuôi cấy (S: 1863577)

Tổng hợp kết quả của các công thức xử lý tốt nhất được trình bày ở bảng 3.12. Trong các công thức xử lý, 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 9,548 mg/bình, cao hơn 10 lần so với mẫu đối chứng là tế bào không xử lý chất kích kháng, khoảng 8 lần so với mẫu tự nhiên (rễ cây bách bệnh khoảng 5 năm tuổi).

Bảng 3.12. Tổng hợp kết quả xử lý kích kháng tốt nhất của từng chất

Chất kích kháng	Thời điểm kích kháng (ngày)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Eurycomanone (mg/g)	Eurycomanone (mg/bình)
YE 200 mg/L	6	16,67	0,50	6,25	3,125
MeJA 0,02 mM	4	9,21	0,55	17,36	9,548
SA 0,02 mM	4	16,00	0,47	5,20	2,444
ĐC	0	17,43	0,72	1,70	1,224
Mẫu tự nhiên	-	-	-	2,09	-

Chương 4

BÀN 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. Siregar và cs (2003) đã cảm ứng tạo callus trên lá của 9 cây bách bệnh khác nhau trên môi trường MS bổ sung 10 mg/L NAA. Sau 4 tuần nuôi cấy, sinh khối callus đạt 2,723-3,816 g tươi (sai khác không có ý nghĩa) với khối lượng khô tương ứng là 0,106-0,141 g. Sinh khối callus được cấy chuyển duy trì ở môi trường tương tự sau mỗi 4 tuần [126]. Theo Hussein và cs (2005), callus phát sinh phôi của cây bách bệnh hình thành trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D [60]. 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% [86]. 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), thấp hơn đối với NAA, với chỉ số sinh trưởng (GI) là 7,8 trên môi trường bổ sung 1,25 mg/L NAA, sinh khối callus từ 3 g nuôi cấy ban đầu đạt đến 23,59 g tươi (tương ứng với 0,93 g khô) (Bảng 3.2).

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. Ví dụ: Balubena và cs (2009) sản xuất sinh khối callus của cây *Piper solmsianum* (Piperaceae) trên môi trường bổ sung 0,2 mg/L 2,4-D và 2 mg/L BA [31]. Zakaria và cs (2011) đã cảm ứng và sản xuất sinh khối callus của cây *Papaver orientale* L. (Papaveraceae) trên môi trường tương tự chứa 0,5 mg/L BA (benzyladenine) và 0,5 hoặc 1 mg/L NAA [147]. Theo nghiên cứu của Adhikari và Pant (2013), sự sinh trưởng tạo callus tốt nhất là trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BAP và 1,5 mg/L NAA sau 8 tuần nuôi cấy [19].

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. Chẳng hạn, Galih và Esyanti (2014) đã sử dụng môi trường Zenk để nuôi cấy callus cây bách bệnh, các tác giả đã bổ sung vào môi trường 0,5 mg/L NAA và 0,5 mg/L KIN để nuôi cấy callus trước khi chuyển qua chính môi trường này (không có agar) để nuôi cấy lỏng [48]. 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. Siregar và cs (2004) nuôi cấy huyền phù tế bào của cây bách bệnh trên môi trường MS bổ sung 1 mg/L NAA. Kết quả cho thấy từ 1 g ban đầu đã thu được khoảng 5 g tươi (0,3 g khô) [127]. Chan 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 [38]. Natanael và cs (2014) đã tiến hành nuôi cấy tế bào bằng việc cấy chuyển mô callus từ nuôi cấy rắn vào môi trường lỏng có bổ sung 1,1 ppm 2,4-D và 1 ppm KIN [103].

So với các đối tượng khác đã được công bố, thời gian sinh trưởng của tế bào huyền phù cây bách bệnh tương đương với tế bào cây nghệ đen là 14 ngày [77], nhưng ngắn hơn các loại tế bào khác như rau má 24 ngày [81] hay cà gai leo 28 ngày [82].

4.2.2. Sự tích lũy eurycomanone trong nuôi cấy huyền phù

Nuôi cấy tế bào huyền phù thực vật từ lâu đã được xem là một phương thức thay thế có nhiều tiềm năng trong sản xuất các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có giá trị cao nhờ tính đồng nhất của quần thể tế bào *in vitro*, sự sẵn có một lượng lớn nguyên liệu, và tốc độ sinh trưởng nhanh của chúng [97].

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. Chẳng hạn, hàm lượng anthocyanin ở callus của cây hoa cúc (*Rudbeckia hirta*) chiếm đến 4,97% trong khi hoa của cây này trong tự nhiên, nơi tích lũy chủ yếu anthocyanin, chỉ có 0,28% [85]. Nguyễn Hoàng Lộc và cs (2010, 2011) đã nghiên cứu sản xuất solasodine từ callus cây cà gai leo *in vitro* và thu được kết quả cho thấy, hàm lượng solasodine tích lũy trong callus cao hơn khoảng 8,5 lần so với tách chiết từ rễ cây tự nhiên 1 năm tuổi [79]. Tiếp tục nghiên cứu nuôi cấy tế bào cà gai leo

trong chai tam giác, các tác giả nhận thấy solasodine tích lũy trong tế bào huyền phù cao hơn trong callus [80].

Trong nuôi cấy tế bào thực vật, các hợp chất thứ cấp tích lũy nhiều nhất vào cuối giai đoạn sinh trưởng cực đại. Đã có những bằng chứng rõ ràng cho thấy có mối quan hệ ngược giữa tốc độ sinh trưởng và khả năng sản xuất các chất thứ cấp. Khi tốc độ sinh trưởng cao, các quá trình sơ cấp của tế bào là phân chia tế bào và sản xuất sinh khối tế bào đã diễn ra mạnh mẽ. Ngược lại, trong pha tĩnh khi sự sinh trưởng giảm, lúc này hoạt động sản xuất và tích lũy các chất thứ cấp mới tăng lên [137].

Hợp chất thứ cấp ở thực vật thường được tìm thấy ở trong tất cả các tế bào, tuy nhiên, trong đa số trường hợp, chúng chỉ được sinh tổng hợp ở một số cơ quan, bộ phận nhất định sau đó được vận chuyển đến các cơ quan dự trữ dựa vào sự phân cực của chúng. Các hợp chất ưa nước như alkaloid, glucosinolate hay tannin được dự trữ ở không bào hay các tế bào dị hình (idioblast), trong khi đó các nhóm ưa lipid như các chất có gốc terpene được dự trữ ở màng thylakoid hoặc lớp biểu bì, ống dẫn nhựa và trichomes. Các bộ phận dự trữ có thể là lá, chồi, rễ, hoa, callus, phôi soma và các nơi dự trữ đặc biệt như các lông tiết (glandular trichomes), biểu bì (periderm) hay lớp bản (phellem) [62]. Trong nuôi cấy tế bào, phần lớn các tài liệu đã công bố đều cho thấy các hợp chất sau khi được tổng hợp sẽ được dự trữ nội bào, do đó, đánh giá khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp chỉ được thực hiện đối với các chất được dự trữ nội bào. Ví dụ, Sato và cs (1993) nhận thấy khi nuôi cấy tế bào cây *Coptis japonica*, alkaloid được dự trữ ở không bào, magnoflorine và papaverine được dự trữ một phần ở không bào và chủ yếu là có trong dịch nội bào [122].

Theo Cai và cs (2012), trong nuôi cấy tế bào các hợp chất chủ yếu tập trung ở nội bào, không tiết ra môi trường, đây là điểm cản trở hiệu quả quy

trình sản xuất do phải tốn thêm chi phí thu nhận, tách chiết... Do đó, nhiều biện pháp đã được tác giả đề xuất để thúc đẩy quá trình tiết các chất thứ cấp ra môi trường ngoại bào, tập trung vào các giải pháp phá vỡ thành tế bào bằng các tác nhân vật lý (xung điện, siêu âm, áp suất cao), hóa học (dung dịch có cường độ ion mạnh, thay đổi pH, sử dụng dimethylsulfoxide, Tween 20 hay chitosan) hay sinh học (cellulase, pectolyase...) [36].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, khả năng tích lũy eurycomanone trong nội bào đã được đánh giá. Trong nuôi cấy huyền phù, eurycomanone 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 được thu thập từ Muar (Johor, Malaysia) là chỉ gần 1,4 mg/g khô [91].

Theo Ncube và cs (2015), trong điều kiện bình thường, thực vật chỉ sản xuất ra một lượng hợp chất thứ cấp ở mức tối thiểu theo nhu cầu của cơ thể và chúng không đóng vai trò lớn đối với các hoạt động sống sơ cấp của tế bào [104]. Khi gặp các điều kiện bất lợi của môi trường, hợp chất thứ cấp mới được sản xuất nhiều hơn trong tế bào để chống lại các tác nhân bên ngoài [36]. Do vậy, trong điều kiện nuôi cấy bình thường, sự tích lũy hợp chất thứ cấp thường tỷ lệ thuận với sự tích lũy sinh khối, do hàm lượng hợp chất tích lũy trong mỗi tế bào là giống nhau, sự sai khác thường không lớn.

Kết quả của chúng tôi cũng tương tự kết quả nghiên cứu khả năng sản xuất jaceosidin của tế bào *S. medusa*. Hàm lượng jaceosidin và sinh khối tế bào đều đạt cực đại vào ngày thứ 14 của quá trình nuôi cấy [149]. Ngoài ra, quá trình tích lũy các hợp chất thứ cấp không giống nhau giữa các loài khác nhau, không phải loài thực vật nào cũng tăng cường tích lũy các hợp chất thứ cấp khi sinh trưởng của tế bào đi vào pha ổn định. Khi nuôi cấy tế bào *T.*

cordifolia, Rao và cs (2008) nhận thấy rằng trong khi khối lượng khô tế bào đạt cực đại (9,9 g/L) sau 36 ngày nuôi cấy, thì hàm lượng berberine trong tế bào lại thu được cao nhất vào ngày 24 trong pha log của tế bào (3,8 mg/g khối lượng khô) [114].

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). Kết quả này cũng tương tự với kết quả nuôi cấy tế bào cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) [134], dây thìa canh [72], hay cây sâm Ấn Độ (*Withania somnifera*) [100].

Sucrose được xem là nguồn carbon thích hợp nhất cho sinh trưởng của tế bào thực vật, nồng độ thường dùng là từ 2-7%. Sucrose vừa cung cấp năng lượng vừa là một thành phần trong sinh tổng hợp các chất thứ cấp. Tốc độ tăng trưởng sinh khối thực vật luôn liên quan trực tiếp tới sự tiêu thụ sucrose. Vai trò của sucrose trong việc tăng tích lũy sinh khối khô tế bào có thể do ảnh hưởng của nó lên tubulin, một protein chịu trách nhiệm trong sinh trưởng và phát triển của tế bào. Trên môi trường mà tất cả các nguồn dinh dưỡng ở mức dư thừa, sự gia tăng nồng độ sucrose sẽ dẫn đến tăng sinh khối khô. Một số nghiên cứu như nuôi cấy tế bào cây *Solanum eleagnifolium*, *Solanum chrysotrichum* hay *Psoralea corylifolia*... tế bào tăng sinh khối khô cùng với việc tăng nồng độ sucrose. Tuy nhiên, khi nồng độ sucrose quá cao sẽ dẫn đến áp suất thẩm thấu vượt giới hạn cho phép của tế bào, vì thế ảnh hưởng xấu lên sinh trưởng của chúng [3].

Liang và cs (2004) nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ sucrose (2-5%)

đến việc sản xuất các hợp chất puerarin và isoflavone trong nuôi cấy rễ của cây *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth (Fabaceae). Kết quả cho thấy bổ sung 3% sucrose vào môi trường là tốt nhất để tích lũy puerarin và isoflavone. Hàm lượng cao nhất của puerarin (5,147 mg/g khô) thu được sau 12 ngày nuôi cấy trong khi hàm lượng cao nhất của isoflavone (khoảng 27,76 mg/g khô) đạt được sau 16 ngày nuôi cấy [74]. Theo Qian và cộng sự (2009), rosmarinic acid được tích lũy được tăng cường bởi các nồng độ sucrose được thêm vào trong môi trường nuôi cấy cây *Coleus blumei* Benth. (Lamiaceae). Khi hàm lượng sucrose là 6%, callus và tế bào tích lũy lần lượt là 33,7% và 10,1% rosmarinic acid. Hàm lượng sucrose cao hơn ($\geq 5\%$) có ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển của cây [111]. Manuhara và (2015) chỉ ra rằng nồng độ khác nhau (3-6%) của sucrose ảnh hưởng đến sinh khối và hàm lượng saponin trong nuôi cấy rễ cây *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. (Talinaceae). Sinh khối tối đa đạt được trên môi trường MS bổ sung 6% sucrose cao hơn khoảng ba lần so với đối chứng [88].

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. Tế bào và mô thực vật đòi hỏi pH tối ưu cho sinh trưởng và phát triển trong nuôi cấy. Độ pH ảnh hưởng đến sự di chuyển của các ion và đối với hầu hết các môi trường nuôi cấy, pH 5,0-6,0 trước khi khử trùng được xem là tối ưu. Độ pH của môi trường còn ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình hấp thụ các chất dinh dưỡng từ môi trường vào tế bào [5].

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, trong đó 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), khi nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên sự sản xuất canthin-6-one alkaloid từ nuôi cấy tế bào cây bách bệnh, tác giả nhận thấy pH 5,75 là tối ưu cho nuôi cấy tế bào cây này [127].

Bên cạnh nuôi cấy tế bào, việc nuôi cấy rễ tơ cây bách bệnh để thu nhận eurycomanone cũng đã được nhiều tác giả nghiên cứu, Phan Tường Lộc và cs (2020) đã nghiên cứu tạo rễ tơ có khả năng sinh trưởng mạnh và tổng hợp eurycomanone cao nhằm tạo ra nguồn vật liệu *in vitro* có chất lượng ổn định. Hai dòng rễ tơ R1 và R2 chọn lọc có hàm lượng eurycomanone lần lượt là 0,017 và 0,022 mg/g chất khô, thấp hơn trong tế bào của chúng tôi [6].

Sau khi nhân giống *in vitro* thành công, Võ Châu Tuấn và cs (2016) đã đánh giá sự tích lũy eurycomanone trong rễ cây *in vitro* khi trồng ở ngoài điều kiện tự nhiên ở tỉnh Quảng Nam. Kết quả cho thấy, hàm lượng eurycomanone tích lũy trong rễ cây cấy mô tăng theo thời gian trồng, từ 0,177-0,178 mg/g ở cây 1 năm tuổi lên 0,213-0,225 mg/g khô ở cây 1,5 năm tuổi). Không có sự khác biệt về hàm lượng tích lũy của hợp chất này ở cây nuôi cấy mô và cây hữu tính được trồng cùng một khoảng thời gian cũng như ở các địa điểm khác nhau [12].

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. Chẳng hạn, các chất kích kháng như MeJA, Ag⁺, chitosan và dịch chiết từ nấm (polysaccharide) ở các nồng độ khác nhau đều ức chế sinh trưởng của tế bào *Taxus chinensis* [148]. Kết quả

nghiên cứu của Frankfater và cs (2009) về ảnh hưởng của MeJA và SA lên sự tạo thành gossypol, 6-methoxygossypol và 6,6'-dimethoxygossypol trong nuôi cấy rễ tơ cây *G. barbadense* cũng cho thấy MeJA có tác dụng ức chế quá trình sinh trưởng của tế bào [47].

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, trong thành phần của YE được cho là có chứa một số cation như Zn^{2+} , Ca^{2+} và Co^{2+} có vai trò như là các chất kích kháng phi sinh học. Bên cạnh đó YE cũng là một hợp chất bao gồm nhiều thành phần khác nhau, ngoài các amino acid, vitamin và khoáng chất, nó còn có thể chứa các thành phần chất kích kháng khác chưa được xác nhận [110]. Cơ chế tác động chính xác của YE lên tế bào thực vật hiện nay vẫn chưa được làm rõ. Tuy nhiên, sự truyền tín hiệu cảm ứng được xem là một hệ thống nhiều thành phần có chức năng phức tạp trong các phản ứng bảo vệ khác nhau của tế bào thực vật, giống như: các kênh ion, sự hoạt hóa tác nhân phân bào khởi động protein kinase hoặc con đường jasmonic acid hoặc SA [117], [124]. 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, sự tác động của các nồng độ YE khác nhau lên sinh trưởng của tế bào cũng không quá rõ (Bảng 3.6).

MeJA là một hợp chất tạo hương dễ bay hơi lần đầu tiên được tìm thấy trong hoa của cây *Jasminum grandiflorum*, sau đó được chứng minh là phân bố rộng rãi trong giới thực vật. MeJA được ghi nhận như một chất điều hòa cần thiết cho sự sống tế bào, có vai trò trung gian trong quá trình phát triển khác nhau (nảy mầm, tạo rễ, sinh sản, chín quả, già yếu) và các phản ứng bảo vệ tế bào chống lại các stress sinh học và phi sinh học (tổn thương do côn trùng gây ra, điều kiện bất lợi của môi trường như hạn hán, nhiệt độ thấp, độ

mặn) [39]. Jasmonate ngoại sinh khi ứng dụng vào thực vật đã cho thấy có ảnh hưởng đến sự biểu hiện về hình thái và sinh lý. Jasmonate kết hợp với sự tích lũy của các hợp chất thứ cấp đã thể hiện sự đáp ứng bảo vệ ở thực vật. MeJA làm tăng hàm lượng shikonin và dẫn xuất của nó trong nuôi cấy tế bào cây *Onosma paniculatum*, MeJA còn tăng cường sinh tổng hợp IAA nội sinh ở thực vật [128].

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. Ảnh hưởng của MeJA ngoại sinh lên hàm lượng của các amine sinh học bao gồm putrescine, spermidine, tyramine, cadaverine và 2-phenylethylamine trong cây kiều mạch (*Fagopyrum esculentum*) cũng đã được nghiên cứu [23].

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 không bổ sung MeJA (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. Thanh và cs (2005) đã sử dụng MeJA để tổng hợp ginsenoside trong nuôi cấy huyền phù tế bào của nhân sâm trong bioreactor 5 L. Nhóm tác giả tiến hành thăm dò bổ sung vào môi trường nuôi cấy MeJA các nồng độ từ 50-400 μ M, sau 25 ngày nuôi cấy sinh khối tươi và sinh khối khô của tế bào giảm 1,06 và 1,10 lần so với tế bào nuôi cấy không bổ sung MeJA [133].

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 ảnh hưởng của SA và chất kích kháng tách chiết từ nấm (F5) ở các nồng độ riêng rẽ và phối hợp lên khả năng sản xuất taxol trong nuôi cấy huyền phù tế bào *Taxus chinensis*. Yu và cs (2001) nhận thấy khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy 50 mg/L F5 hoặc 50 mg/L SA hoặc phối hợp 50 mg/L F5 và 50 mg/L SA đều ức chế sinh trưởng của tế bào, sinh khối thấp nhất khi sử

dụng phối hợp 50 mg/l F5 và 50 mg/l SA [145]. Nuôi cấy rễ tơ *B. candida* bổ sung SA (0,01-1,00 mM) ở thời điểm sau 18 ngày, Pitta-Alvarez và cs (2000) nhận thấy sinh trưởng tế bào bị ảnh hưởng, sinh khối tươi chỉ đạt 40% (480 mg) so với đối chứng sau 72 giờ cảm ứng [110]. Loc và cs (2012) cũng có cùng kết quả sinh khối tế bào rau má (*Centella asiatica*) sau 24 ngày nuôi cấy giảm so với đối chứng ở tất cả các nồng độ SA (50-200 μ M) bổ sung tại các thời điểm khác nhau (5-15 ngày) [81].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, SA có tác dụng làm tăng khả năng sinh trưởng của tế bào trong một số trường hợp. Kết quả trình bày ở bảng 3.8 cho thấy khi bổ sung 0,02 mM SA, sinh khối tế bào tăng so với khi không bổ sung SA. Tuy nhiên, đây là trường hợp cá biệt, tất cả các công thức thí nghiệm khác 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

Theo Hussain và cộng sự (2012), xử lý chất kích kháng ức chế sự phát triển rễ tơ của cây *Panax ginseng* đồng thời tăng cường việc sản xuất saponin [59]. Zhao và cộng sự (2010) đã nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích kháng sinh học và phi sinh học như ion kim loại, polysacharide... lên sự tăng trưởng và tích lũy tanshinone ở nuôi cấy tế bào cây *Salvia miltiorrhiza*. Trong số này bạc nitrate, cadmium chloride và YE có hiệu quả nhất để kích thích sản xuất tanshinone, làm tăng lượng tanshinone trong tế bào lên gấp 10 lần [150]. Hakkim và cs (2011) đã nghiên cứu ảnh hưởng của các chất kích kháng là YE (0,1-1,0 g/L) và MeJA (100-500 μ M) lên sự sinh trưởng và tích lũy rosmarinic acid trong nuôi cấy tế bào cây *Ocimum sanctum*. Kết quả nghiên cứu cho thấy xử lý 0,5 g/L YE sau 18 ngày sinh khối tế bào lẫn hàm lượng rosmarinic acid đều cao hơn khoảng 7 lần so với đối chứng, xử lý 100 μ M

MeJA tăng 8,6 lần so với đối chứng không xử lý chất kích kháng [52].

Trong quá trình kích kháng, chất kích kháng có thể tác động đến chu trình sinh tổng hợp của các hợp chất thứ cấp, làm thay đổi thời điểm tích lũy hợp chất thứ cấp trong cây. Tuy nhiên, nhiều công bố cho thấy khi xử lý chất kích kháng, thời điểm tích lũy sinh khối và hợp chất thứ cấp cực đại không đổi so với khi không xử lý chất kích kháng. Ví dụ, solasodine và sinh khối tế bào cà gai leo (*Solanum hainanense*) không thay đổi thời điểm tích lũy cực đại khi xử lý bằng 150 μ M SA [27]. Do đó, với đề tài nghiên cứu này, thời gian thu tế bào để đánh giá hàm lượng eurycomanone trong thí nghiệm xử lý chất kích kháng tương tự như trong thí nghiệm không xử lý chất kích kháng.

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, trong đó YE ở nồng độ 200 mg/L thu được hàm lượng eurycomanone cao gấp đôi so với đối chứng không bổ sung YE. Các công thức thí nghiệm khác sự tích lũy eurycomane không có sự sai khác đáng kể (Bảng 3.6)

Đối với YE, các nghiên cứu sử dụng YE để tăng mức độ tích lũy các hợp chất thứ cấp đã được một số tác giả công bố. Chẳng hạn, nuôi cấy rễ tơ cây rau sam đã được Pirian và cs (2013) thực hiện để sản xuất noradrenaline. Các tác giả đã sử dụng YE ở các nồng độ 0,125-1 g/L để cảm ứng làm tăng quá trình sản xuất noradrenaline, thời gian cảm ứng 2 ngày. Các tác giả nhận thấy liều lượng 0,25 và 0,5 g/L YE là thích hợp nhất, hàm lượng noradrenaline tăng 3-4 lần so với đối chứng [109]. Khi bổ sung dịch chiết nấm men, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* vào môi trường nuôi cấy *Hypericum triquetrifolium* Turra ở các nồng độ từ 0,1-0,75 mg/L, Azeez và cs (2013) nhận thấy các chất kích kháng này có vai trò khác nhau trong việc sản xuất các hợp chất thứ cấp.

Đối với nấm men (0,5 mg/L), hàm lượng p-OH-benzoic acid và chlorogenic acid tăng lên đáng kể so với đối chứng. Rutin, hypersoid và quercitin tăng lên đáng kể so với đối chứng khi được xử lý kích kháng ở tất cả các công thức [29]. Cai và cộng sự (2014) đã nghiên cứu ảnh hưởng của YE đến việc sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp và cảm ứng các phản ứng tự vệ của thực vật trong môi trường nuôi cấy tế bào của *Malus domestica*. Kết quả cho thấy YE tăng cường sản xuất phenolic acid lên gấp 2 lần sau 3 ngày nuôi cấy. Trong số các phenolic acid chiếm ưu thế, sản xuất p-coumaric acid được kích thích bởi YE lên tới 5,1 lần. Nồng độ chlorogen acid cũng tăng gấp 2,7 lần trong vòng 3 ngày nuôi cấy bằng phương pháp xử lý bằng YE. Tuy nhiên, hoạt tính phenylalanine amoniacyl-lyase giảm tới 33% [37].

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 bạch bệnh rõ rệt hơn cả YE và SA, hàm lượng eurycomanone thu được đạt gần gấp đôi.

Nhiều công trình nghiên cứu đã công bố cho thấy sử dụng MeJA khá phổ biến trong việc tăng cường sản xuất hợp chất thứ cấp từ nuôi cấy tế bào thực vật. Zabala và cộng sự (2010) đã nhận thấy tác dụng tích cực của MeJA lên việc sản xuất peruvoside trong tế bào *Thevetia peruviana* [146]. Bonfill và cs (2011) đã nghiên cứu sử dụng MeJA để tăng khả năng tích lũy centelloside và phytosterol trong nuôi cấy tế bào rau má (*Centella asiatica*). Khi bổ sung 100 μ M MeJA vào môi trường nuôi cấy, các tác giả thu được hàm lượng centelloside cao gấp 6,9 lần so với mẫu không được bổ sung MeJA [33]. Khi bổ sung MeJA vào môi trường nuôi cấy rễ tơ cây *Silene vulgaris*, khả năng tích lũy saponin triterpenoid trong rễ tơ có sự thay đổi đáng kể. Lượng

segetalic acid và gypsogenic acid cao gấp 5 và 2 lần tương ứng so với đối chứng [68].

Nhiều nghiên cứu đã công bố cho thấy nồng độ MeJA thích hợp để tổng hợp các hợp chất thứ cấp thường cao hơn nghiên cứu của chúng tôi, thường từ 100 μ M trở lên. Chẳng hạn, Krzyzanowska và cộng sự (2012) cũng công bố sự tích lũy rosmarinic acid cao nhất (12% DW) trong các tế bào *Mentha piperita* sau khi bổ sung 100 μ M MeJA vào môi trường nuôi cấy, tăng gần 1,5 lần so với mẫu đối chứng [69]. Nopo-olazabal và cs (2014) nghiên cứu sản xuất stilbenoid ở rễ cây *Vitis rotundifolia* khi xử lý 100 μ M MeJA hoặc 10 mM H_2O_2 trong 96 giờ. Kết quả cho thấy hàm lượng stilbenoids đạt cao nhất khi xử lý MeJA sau 12 giờ nuôi cấy [107].

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. Các nghiên cứu liên quan đến hiệu quả kích kháng của SA về tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp trong cây thuốc đã được tiến hành để tăng giá trị kinh tế của những loài được nghiên cứu. Sesquiterpenes trong *Panax ginseng* đã tích lũy rất cao sau khi nuôi cấy rễ được xử lý bằng SA [113]. Nghiên cứu của Gorni và Pacheco (2016) trên cây *Achillea millefolium* L. cho thấy 0,5 mM SA kích thích tăng sinh khối rễ, tổng số chất khô, tỷ lệ gốc/chồi, hàm lượng diệp lục (a) và diệp lục (a + b). Việc sử dụng SA ở mức 0,5 và 1 mM đem lại hiệu quả tốt nhất trong việc kích kháng để sản xuất dầu thiết yếu và phenolic tổng số [50].

Kết quả phân tích hàm lượng eurycomanone trong tế bào cây bách bệnh cho thấy sự tích lũy 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) sử dụng SA để tăng cường tích lũy podophyllotoxin trong nuôi cấy tế bào của *Linum album*. Khi bổ sung 10 μ M SA vào ngày thứ ba của mẫu nuôi cấy, 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 [144].

Đối với SA, việc xử lý chất kích kháng ở nồng độ trung bình 0,10-0,15 mM SA thường mang lại kết quả tốt. Trên tế bào rau má, Loc và cs (2012) nhận thấy 0,1 mM SA cho hiệu quả cảm ứng tốt nhất, hàm lượng asiaticoside tăng lên 5 lần so với tế bào không xử lý chất kích kháng, trong khi đó xử lý 4 g/L YE giúp hàm lượng asiaticoside tăng lên 3,5 lần [80]. Wang và cs (2004) đã nghiên cứu sử dụng SA vào sản xuất taxol trong nuôi cấy huyền phù tế bào cây *Taxus chinensis* var. *mairei*. Kết quả cho thấy khi bổ sung SA ở nồng độ 145 μ M, taxol được tích lũy tối đa là 0,119 μ M [141].

4.3.3. Ảnh hưởng của thời gian kích kháng

Thời điểm xử lý chất kích kháng cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và tích lũy các sản phẩm thứ cấp của tế bào thực vật. Trong nghiên cứu của chúng tôi, kết quả trình bày ở bảng 3.9-3.11 cho thấy 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. Yamamoto và cộng sự (1995) đã chứng minh

flavanone tích lũy trong mô sẹo của cây *Sophora flavescens* cao hơn mẫu đối chứng 5 lần khi bổ sung 2-8 mg/mL YE vào trong môi trường nuôi cấy ban đầu [143]. Trong khi đó, Zhao và cộng sự (2010) đã thu được một lượng tanshinone cao gấp 10 lần so với đối chứng từ nuôi cấy tế bào *Salvia miltiorrhiza* khi xử lý mẫu với 100 mg/L YE vào ngày thứ 18 của quá trình nuôi cấy [150].

Krzyzanowska và cộng sự (2012) đã bổ sung 100 μ M MeJA vào môi trường nuôi cấy huyền phù tế bào cây *Mentha piperita* sau 7 ngày nuôi cấy để tăng cường khả năng sản xuất rosmarinic acid. Kết quả chỉ ra rằng hàm lượng rosmarinic acid đạt cực đại là 117,95 mg/g khô sau 24 giờ [69]. Zabala và cộng sự thu được hàm lượng peruvside cao nhất (8,93 mg/L) khi bổ sung 100 mg/L MeJA vào môi trường nuôi cấy tế bào cây *Thevetia peruviana* tại thời điểm ban đầu [146]. Nghiên cứu của Rahimi và cộng sự (2014) chỉ ra rằng sesquiterpene của *Panas ginseng* tích lũy cao nhất trong 24 giờ sau khi nuôi cấy rễ trong môi trường có bổ sung 200 μ M SA [113]. Coste và cộng sự (2011) cũng đã nghiên cứu ảnh hưởng của SA lên khả năng tích lũy hypericins (hypericin và pseudohypericin) khi nuôi cấy rễ của cây *Hypericum hirsutum* và *H. maculatum*. Xử lý SA 50 μ M cho thấy tăng cường sinh tổng hợp hypericin lên 7,98 lần và pseudohypericin lên 13,58 lần ở cây *H. hirsutum*. Trong khi ở cây *H. maculatum*, việc xử lý với 200 μ M SA làm tăng sản xuất hypericin lên 2,2 lần và pseudohypericin lên 3,94 lần [40].

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. 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 khô, cao hơn 10 lần so với mẫu đối chứng là tế bào không xử lý chất kích kháng. Tương tự, SA 0,02 mM hoặc YE 200 mg/L được thêm vào môi trường tại ngày thứ 4 và thứ

6 của quá trình nuôi cấy đã kích thích tích lũy euryconomanone lần lượt lên tới 5,2 mg/g và 6,25 mg/g khô, cao hơn mẫu đối chứng lần lượt là 1,46 và 1,69 lần.

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 chất kích kháng 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Hữu Tùng, Hoàng Văn Trung, Nguyễn Đình Luyện (2018), “Phân lập và xác định hàm lượng eurycomanone trong cây mật nhân (*Eurycoma longifolia* J.) bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS)”, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 127(1B), tr. 153-162.
2. Phan Văn Kiệm (2009), *Nghiên cứu hóa học và hoạt tính sinh học của một số cây thuốc dân tộc Việt Nam nhằm tạo sản phẩm thuốc có giá trị cao phục vụ cuộc sống*, Báo cáo tổng kết nhiệm vụ hợp tác quốc tế theo nghị định thư Việt Nam-Italia (2006-2008), Bộ khoa học và Công nghệ.
3. Bùi Văn Lê, Nguyễn Ngọc Hồng (2006), “Ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật và đường saccharose lên dịch nuôi cấy huyền phù tế bào dừa cạn (*Catharanthus roseus*)”, *TC Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 9(6), tr. 5-66.
4. Nguyễn Hoàng Lộc (2013), *Sản xuất một số hợp chất dược phẩm bằng nuôi cấy tế bào thực vật và cây trồng chuyển gen*, Nxb Đại học Huế.
5. Nguyễn Hoàng Lộc (2011), *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật-Các khái niệm và ứng dụng*, NXB Đại học Huế.
6. Phan Tường Lộc, Đặng Thị Ngọc, Nguyễn Huỳnh Cẩm Tú, Hoàng Văn Dương, Trần Thị Ngọc Hà (2020), “Cảm ứng tạo rễ tơ cây bá bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* và chọn dòng rễ tổng hợp eurycomanone cao”, *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2020*, tr. 866-871.
7. Nguyễn Thành Mến, Hoàng Thanh Trường, Huỳnh Thị Mỹ Trang, Nguyễn Đăng Thông (2014), “Đặc điểm phân bố, sinh thái của Hoàng Liên Ô Rô (*Mahonia nepalensis* DC.), Bá Bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack.) ở Lâm Đồng”, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 3, tr. 3424-3432.

8. Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến (2012), “Công nghệ sinh học thực vật trong thế kỉ XXI: Triển vọng và thách thức”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50(6), tr. 859-874.
9. Lê Thị Thủy Tiên, Bùi Trang Việt, Nguyễn Đức Lượng (2010), “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*, 13(T3), tr. 67-77.
10. Trần Thu Trang, Phạm Bích Ngọc, Chu Nhật Huy, Hoàng Thị Thu Hằng, Nguyễn Trung Nam, Chu Hoàng Hà (2017), “Khảo sát một số hoạt tính sinh học trong cao chiết methanol từ rễ tơ và rễ tự nhiên cây bá bệnh (*Eurycoma Longifolia* Jack)”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 33(2), tr. 67-73.
11. Trần Thu Trang (2020), *Nghiên cứu tăng cường tích lũy một số alkaloid có hoạt tính sinh học từ sinh khối rễ tơ cây bá bệnh (Eurycoma longifolia Jack) nuôi cấy trên hệ thống bioreactor 20 lít*. Luận án Tiến sĩ Sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ.
12. Võ Châu Tuấn, Trần Quang Dân (2016), Đánh giá sự tích lũy hoạt chất eurycomanone trong rễ cây mật nhân (*Eurycoma longifolia jack*) nuôi cấy mô trồng ngoài tự nhiên, *Tạp chí Khoa học Xã hội, Nhân văn & Giáo dục*, 6, pp. 35-40.
13. Võ Châu Tuấn, Trần Quang Dân, Bùi Thị Thơ (2016), Nuôi cấy và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết tế bào callus cây mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack), *Tạp chí Khoa học Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 5(102), pp. 155.

Tiếng Anh

14. Abd Aziz N.A., Hasham R., Sarmidi M.R., Suhaimi S.H., Idris M.K.H. (2021), A review on extraction techniques and therapeutic value of polar

bioactives from Asian medicinal herbs: Case study on *Orthosiphon aristatus*, *Eurycoma longifolia* and *Andrographis paniculata*, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(2), pp. 143-165.

15. Abdulghani M., Hussin A.H., Sulaiman S.A., Chan K.L. (2012), The ameliorative effects of *Eurycoma longifolia* Jack on testosterone-induced reproductive disorders in female rats, *Reproductive Biology*, 12(2), pp. 247-255.

16. Abdullah N., Ismail I., Hassan N.H., Basherudin N. (2016), 9-methoxycanthin-6-one production in elicited hairy roots culture of *Eurycoma longifolia*, *AIP Conference Proceedings*, 1784(1), pp. 020023.

17. Abraham F., Bhatt A., Keng C.L., Indrayanto G., Sulaiman S.F. (2011), Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of *Curcuma mangga* *in vitro* plantlets, *African Journal of Biotechnology*, 10(40), pp. 7787-7795.

18. Abubakar B., Salleh F., Wagiran A. (2017), Chemical composition of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) and the quality control of its herbal medicinal products, *Journal of Applied Sciences*, 17, pp. 324-338.

19. Adhikari S.R., Pant B. (2013), Induction and proliferation of *in vitro* mass of callus of *Withania omnifera* (L.) Dunal, *Research in Plant Sciences*, 1(3), pp. 58-61.

20. Ahlawat S., Saxena P., Alam P., Wajid S., Abdin M.Z. (2014), Modulation of artemisinin biosynthesis by elicitors, inhibitor, and precursor in hairy root cultures of *Artemisia annua* L., *Journal of Plant Interactions*, 9(1), pp. 811-824.

21. Ahmad N., Samiulla D.S., Teh B.P., Zainol M., Zolkifli N.A., Muhammad A., Matom E., Zulkapli A., Abdullah N.R., Ismail Z., Syed Mohamed A.F. (2018), Bioavailability of eurycomanone in its pure form and in a standardised *Eurycoma longifolia* water extract, *Pharmaceutics*, 10(3), pp.

22. Ahmed S.A., Baig M.M.V. (2014), Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L., *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), pp. 499-504.
23. Akula R., Ravishankar G.A. (2011), Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), pp. 1720-1731.
24. Al-Adhroey A.H., Nor Z.M., Al-Mekhlafi H.M., Mahmud R. (2010), Ethnobotanical study on some Malaysian anti-malarial plants: A community based survey, *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), pp. 362-364.
25. André S.B., Mongomake K., Kouassi M., Edmond K.K., Kone T., Kouakou T., Kouadio J. (2015), Effects of plant growth regulators and carbohydrates on callus induction and proliferation from leaf explant of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenacea), *Int J Agric Crop Sci*, 8, pp. 118-127.
26. Ang H.H., Sim M.K. (1998), Evaluation of pendiculation activities in male rats after oral administration of *Eurycoma longifolia* Jack, *Pharmaceutical Biology*, 36(2), pp. 144-146.
27. Anh N.H.T., An T., Dung V., Loc N.H. (2016), Effect of salicylic acid on the biosynthesis of solasodine in cell suspension culture of *Solanum hainanense* Hance, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 17, pp. 14-20.
28. Arıcan E. (2016), Elicitation triterpene yield in *Alstonia scholaris* cell cultures via synergetic organisms, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(5), pp. 915-920.
29. Azeez T.H.A., Ibrahim K.M. (2013), Effect of biotic elicitors on secondary metabolite production in cell suspensions of *Hypericum triquetrifolium*, *Bulletin UASVM Horticulture*, 70(1), pp. 26-33.

30. Badrhadad A., Piri K., Ghiasvand T. (2013), Increasing of alpha-tocopherol in cell suspension cultures *Elaeagnus angustifolia* L., *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5, pp. 1328-1331.
31. Balbuena T.S., Santa-Catarina C., Silveira V., Kato M.J., Floh E.I.S. (2009), *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae), *Acta Botanica Brasilica*, 23, pp. 274-281.
32. Bhat R., Karim A.A. (2010), Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): A review on its ethnobotany and pharmacological importance, *Fitoterapia*, 81(7), pp. 669-679.
33. Bonfill M., Mangas S., Moyano E., Cusido R., Palazón J. (2011), Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104(1), pp. 61-67.
34. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001), Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science*, 161(5), pp. 839-851.
35. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Radchenko S.V., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2002), Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes, *Journal of Biotechnology*, 97, pp. 213-221.
36. Cai Z., Kastell A., Knorr D., Smetanska I. (2012), Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures, *Plant Cell Reports*, 31(3), pp. 461-477.
37. Cai Z., Kastell A., Smetanska I. (2014), Chitosan or yeast extract enhance the accumulation of eight phenolic acids in cell suspension cultures of *Malus*

× *domestica* Borkh, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(1), pp. 93-99.

38. Chan L.K., Ang S.W., Bhatt A. (2010), Elicitation effect on cell biomass and production of alkaloids in cell suspension culture of the tropical tree *Eurycoma longifolia*, *UNED Research Journal*, 2(2), pp. 239-244.

39. Cheong J.J., Choi Y.D. (2003), Methyl jasmonate as a vital substance in plants, *TRENDS in Genetic*, 19(7), pp. 409-413.

40. Coste A., Vlase L., Halmagyi A., Deliu C., Coldea G. (2011), Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2), pp. 279-288.

41. Darise M., Kohda H., Mizutani K., Tanaka O. (1983), Revision of configuration of the 12-hydroxyl group of eurycomanone and eurycomanol, quassinoids from *Eurycoma longifolia*, *Phytochemistry*, 22(6), pp. 1514.

42. Ebrahimi M., Zarinpanjeh N. (2015), Bio-elicitation of β -carboline alkaloids in cell suspension culture of *Peganum harmala* L., *Journal of Medicinal Plants*, 14, pp. 35-49.

43. Estrada-Soto S., Vergara-Martínez V., Arellano J., C. Rivera-Leyva J., Castillo-España P., Flores Flores A., T. Cardoso-Taketa A., Perea-arango I. (2018), Methyl jasmonate and salicylic acid enhanced the production of ursolic and oleanolic acid in callus cultures of *Lepechinia caulescens*, *Pharmacognosy Magazine*, 13, pp. 886-889.

44. Ezzat S.M., Okba M.M., Ezzat M.I., Aborehab N.M., Mohamed S.O. (2019), Rho-Kinase II inhibitory potential of *Eurycoma longifolia* new isolate for the management of erectile dysfunction, *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2019, pp. 4341592.

45. Farouk A.E., Benafri A. (2007), Antibacterial activity of *Eurycoma longifolia* Jack. A Malaysian medicinal plant, *Saudi Med J*, 28(9), pp. 1422-1424.
46. Ferrari S. (2010), Biological elicitors of plant secondary metabolites: mode of action and use in the production of nutraceuticals, *Adv Exp Med Biol*, 698, pp. 152-166.
47. Frankfater C.R., Dowd M.K., Triplett B.A. (2009), Effect of elicitors on the production of gossypol and methylated gossypol in cotton hairy roots, *Plant Cell Tissue Organism Culture*, 98, pp. 341-349.
48. Galih P.R., Esyanti R.R. (2014), Effect of immobilization on cell growth and alkaloid contents in cell-aggregate culture of *Eurycoma longifolia* Jack., *International Journal of Chemical, Environmental and Biological sciences*, 2, pp. 90-93.
49. Gautam P.L., Raina R., Srivastavs U., Raychaudhuri S.P., Singh B.B. (1998), *Prospects of medicinal plants*, Indian Society of Plant Genetic Resources, NBPGR, New Delhi.
50. Gorni P., Pacheco A. (2016), Growth promotion and elicitor activity of salicylic acid in *Achillea millefolium* L, *African Journal of Biotechnology*, 15, pp. 657-665.
51. Hai Dang N., Choo Y.Y., Tien Dat N., Hoai Nam N., Van Minh C., Lee J.H. (2016), 7-Methoxy-(9H- β -Carbolin-1-il)-(E)-1-Propenoic Acid, a β -Carboline Alkaloid From *Eurycoma longifolia*, Exhibits Anti-Inflammatory Effects by Activating the Nrf2/Heme Oxygenase-1 Pathway, *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(3), pp. 659-670.
52. Hakkim F.L., Kalyani S., Essa M., Girija S., Song H. (2011), Production of rosmarinic in *Ocimum sanctum* cell cultures by the influence of sucrose, phenylalanine, yeast extract, and methyl jasmonate, *International Journal of Biological and Medical Research*, 2(4), pp. 1070-1074.

53. Hammerschmidt R., Dann E.K. (1999), The role of phytoalexins in plant protection, *Novartis Found Symp*, 223, pp. 175-187.
54. Hamza M.A. (2013), Effect of yeast extract (biotic elicitor) and incubation periods on selection of *Lupinus termis* explant *in vitro*, *Journal of Applied Sciences Research*, 9(7), pp. 4186-4192.
55. Hasanloo T., Eskandari S., Najafi F. (2014), Chitosan (middle-viscous) as an effective elicitor for silymarin production in *Silybum marianum* hairy root cultures, *Research Journal of Pharmacognosy*, 1, pp. 9-13.
56. Hasnida N. (2012), Micropropagation and production of eurycomanone, 9-methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets, *African Journal of Biotechnology*, 11, pp.
57. Ho T.T., Murthy H.N., Park S.Y. (2020), Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), pp.
58. Husen R., Pihie A.H.L., Nallappan M. (2004), Screening for antihyperglycaemic activity in several local herbs of Malaysia, *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2), pp. 205-208.
59. Hussain M.S., Fareed S., Ansari S., Rahman M.A., Ahmad I.Z., Saeed M. (2012), Current approaches toward production of secondary plant metabolites, *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4(1), pp. 10-20.
60. Hussein S., Ibrahim R., Kiong A.L.P., Fadzillah N.M., Daud S.K. (2005), Micropropagation of *Eurycoma longifolia* Jack via formation of somatic embryogenesis, *Asian Journal of Plant Sciences*, 4, pp. 472-485.
61. Ilczuk A., Jagiełło-Kubiec K., Jacygrad E. (2013), 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*, 12(3), pp. 23-33.

62. Isah T. (2019), Stress and defense responses in plant secondary metabolites production, *Biological Research*, 52(1), pp. 39.
63. Ismail Z., Ismail N., Lassa J. (1999), *Malaysian herbal monograph*, Malaysian Monograph Committee, Kuala Lumpur.
64. Jeong G.T., Park D.H. (2005), Enhancement of growth and secondary metabolite biosynthesis: Effect of elicitors derived from plants and insects, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(1), pp. 73.
65. Jiwajinda S., Santisopasri V., Murakami A., Hirai N., Ohigashi H. (2001), Quassinoids from *Eurycoma longifolia* as plant growth inhibitors, *Phytochemistry*, 58(6), pp. 959-962.
66. Kardono L.B., Angerhofer C.K., Tsauri S., Padmawinata K., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. (1991), Cytotoxic and antimalarial constituents of the roots of *Eurycoma longifolia*, *J Nat Prod*, 54(5), pp. 1360-1367.
67. Khojasteh A., Mirjalili M., Palazon J., Eibl R., Cusido R. (2016), Methyl jasmonate-enhanced production of rosmarinic acid in cell cultures of *Satureja khuzistanica* in a bioreactor, *Engineering in Life Sciences*, 16(8), pp. 740-749.
68. Kim Y.B., Reed D.W., Covello P.S. (2015), Production of triterpenoid sapogenins in hairy root cultures of *Silene vulgaris*, *Natural Product Communications*, 10(11), pp. 1919-1922.
69. Krzyzanowska J., Czubacka A., Pecio L., Przybys M., Doroszevska T., Stochmal A., Oleszek W. (2012), The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha × piperita* cell suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108(1), pp. 73-81.
70. Kuo P.C., Damu A.G., Lee K.H., Wu T.S. (2004), Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*, *Bioorg Med Chem*, 12(3), pp. 537-544.

71. Lahrita L., Hirosawa R., Kato E., Kawabata J. (2017), Isolation and lipolytic activity of eurycomanone and its epoxy derivative from *Eurycoma longifolia*, *Bioorg Med Chem*, 25(17), pp. 4829-4834.
72. Lee E.J., Mobin M., Hahn E.J., Paek K.Y. (2006), Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*, *J Plant Biol*, 49(6), pp. 427-431.
73. Lee J.K., Eom S.H., Hyun T.K. (2018), Enhanced biosynthesis of saponins by coronatine in cell suspension culture of *Kalopanax septemlobus*, *3 Biotech*, 8(1), pp. 59.
74. Liang P., Shi H.P., Qi Y. (2004), Effect of sucrose concentration on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloides* hairy roots, *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 37, pp. 384-990.
75. Ling A., Phua G., Tee C.-S., Hussein S. (2010), Optimization of protoplast isolation protocols from callus of *Eurycoma longifolia*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, pp. 1778-1785.
76. Liu P., Li H., Luan R., Huang G., Liu Y., Wang M., Chao Q., Wang L., Li D., Fan H., Chen D., Li L., Matsuzaki K., Li W., Koike K., Zhao F. (2019), Identification of β -carboline and canthinone alkaloids as anti-inflammatory agents but with different inhibitory profile on the expression of iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages, *J Nat Med*, 73(1), pp. 124-130.
77. Loc N.H., Ha T.T.T., Hirata Y. (2006), Effect of several factors on cell biomass production of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) in bioreactor, *Vietamese J Biotechnol*, 4(2), pp. 213-220.
78. Loc N.H., An N.T.T. (2010), Asiaticoside production from cell culture of centella (*Centella asiatica* L. Urban), *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, pp. 1065-1070.

79. Loc N.H., Anh N.H.T., Binh D.H.N., Yang M.S., Kim T.G. (2010), Production of glycoalkaloids from callus cultures of *Solanum hainanense* Hance, *Journal of Plant Biotechnology*, 37, pp. 96-101.
80. Loc N.H., Thanh L.T.H. (2011), Solasodine production from cell culture of *Solanum hainanense* Hance, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(3), pp. 581-586.
81. Loc N.H., Giang N.T. (2012), Effects of elicitors on the enhancement of asiaticoside biosynthesis in cell cultures of centella (*Centella asiatica* L. Urban), *Chemical Papers*, 66(7), pp. 642-648.
82. Loc N.H., Anh N.H.T., Khuyen L.T.M., An T.N.T. (2014), Effects of yeast extract and methyl jasmonate on the enhancement of solasodine biosynthesis in cell cultures of *Solanum hainanense* Hance, *J Plant Biochem Biotechnol*, 3(1), pp. 1-6.
83. Loc N.H., Giang N.T., Huy N.D. (2016), Effect of salicylic acid on expression level of genes related with isoprenoid pathway in centella (*Centella asiatica* (L.) Urban) cells, *3 Biotech*, 6(1), pp. 86-93.
84. Loc N.H., Lan P.T.N., Thi Yen V., Dat H. (2018), Some physiological and biochemical characteristics of *Eurycoma longifolia* Jack tree grown in the arboretum, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 19, pp. 249-255.
85. Luczkiewicz M., Cisowski W. (2001), Optimisation of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(1), pp. 57-68.
86. Mahmood M., Normi R., Subramaniam S. (2010), Optimization of suitable auxin application in a recalcitrant woody forest plant of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) for callus induction, *African Journal of Biotechnology*, 9(49), pp. 8417-8428.
87. Manivannan A., Soundararajan P., Park Y.G., Jeong B.R. (2016), Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and

enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), pp. 399.

88. Manuhara Y.S.W., Kristanti A.N., Utami E.S.W., Yachya A. (2015), Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon-type bubble bioreactor, *Asian Pac J Trop Biomed*, 5, pp. 1027-1032.

89. Mello M.O., Dias C.T.S., Amaral A.F.C., Melo M. (2001), Growth of *Bauhinia forficata* Link, *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Phaseolus vulgaris* L. cell suspension cultures with carbon sources, *Scientia Agricola*, 58, pp. 481-485.

90. Misawa M. (1994), *Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolite*, FAO Agricultural Services Bulletin.

91. Mohamad M., Ali M.W., Ripin A., Ahmad A. (2013), Effect of extraction process parameters on the yield of bioactive compounds from the roots of *Eurycoma longifolia*, *Jurnal Teknologi (Science and Engineering)*, 60, pp. 51-57.

92. Mohamed A.N., Vejayan J., Yusoff M.M. (2015), Review on *Eurycoma longifolia* pharmacological and phytochemical properties, *Journal of Applied Sciences*, 15, pp. 831-844.

93. Moharrami F., Hosseini B., Farjaminezhad M., Sharafi A. (2017), Effects of yeast extract on antioxidant activity and tropane alkaloids production in hairy roots cultures of *Hyoscyamus reticulatus* L., *Scientific Journal Management System*, 33(3), pp. 466-480.

94. Mohd Effendy N., Mohamed N., Muhammad N., Naina Mohamad I., Shuid A.N. (2012), *Eurycoma longifolia*: medicinal plant in the prevention and treatment of male osteoporosis due to androgen deficiency, *Evidence-*

based complementary and alternative medicine : eCAM, 2012, pp. 125761-125761.

95. Mohd Ridzuan M.A., Sow A., Noor Rain A., Mohd Ilham A., Zakiah I. (2007), *Eurycoma longifolia* extract-artemisinin combination: parasitemia suppression of *Plasmodium yoelii*-infected mice, *Trop Biomed*, 24(1), pp. 111-118.

96. Morita H., Kishi E., Takeya K., Itokawa H., Iitaka Y. (1993), Highly oxygenated quassinoids from *Eurycoma longifolia*, *Phytochemistry*, 33(3), pp. 691-696.

97. Moscatiello R., Baldan B., Navazio L. (2013), *Plant Cell Suspension Cultures*. In Maathuis FJM, ed. *Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols*. Totowa, NJ, Humana Press: 77-93

98. Mulabagal V. T.H.S. (2004), Plant cell cultures- an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites, *Int J Appl Sci Engin*, 2, pp. 29-48.

99. Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15(3), pp. 473-497.

100. Nagella P., Murthy H.N. (2010), Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A, *Biores Technol*, 101(17), pp. 6735-6739.

101. Namdeo A.G., Patil S., Fulzele D.P. (2002), Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*, *Biotechnology Progress*, 18(1), pp. 159-162.

102. Namdeo A.G. (2007), Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review, *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), pp. 69-79.

103. Natanael J., Esyanti R.R., Manurung R. (2014), Growth kinetics and secondary metabolite production of *Eurycoma longifolia* Jack cell culture

elicited by UV in flask scale and bubble column bioreactor scale, *Int J Tech Res Appl*, 2, pp. 29-32.

104. Ncube B., Van Staden J. (2015), Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit, *Molecules*, 20(7), pp.

105. Ngoc P.B., Pham T.B., Nguyen H.D., Tran T.T., Chu H.H., Chau V.M., Lee J.-H., Nguyen T.D. (2016), A new anti-inflammatory β -carboline alkaloid from the hairy-root cultures of *Eurycoma longifolia*, *Natural Product Research*, 30(12), pp. 1360-1365.

106. Nguyen-Pouplin J., Tran H., Tran H., Phan T.A., Dolecek C., Farrar J., Tran T.H., Caron P., Bodo B., Grellier P. (2007), Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam, *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), pp. 417-427.

107. Nopo-Olazabal C., Condori J., Nopo-Olazabal L., Medina-Bolivar F. (2014), Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of *Vitis rotundifolia* treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide, *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, pp. 50-69.

108. Norhidayah A., Vejayan J., Yusoff M.M. (2015), Detection and quantification of eurycomanone levels in Tongkat Ali herbal products, *Journal of Applied Sciences*, 15(7), pp. 999-1005.

109. Pirian K., Piri K. (2013), Influence of yeast extract as a biotic elicitor on noradrenaline production in hairy root culture of *Portulaca oleracea* L., *International Journal of Plant Production*, 4(11), pp. 2960-2964.

110. Pitta-Alvarez S.I., Spollansky T.C., Guilietti A.M. (2000), The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, pp. 252-258.

111. Qian J., Guiping L., Xiujun L., Xincan H., Hongmei L. (2009), Influence of growth regulators and sucrose concentrations on growth and rosmarinic

acid production in calli and suspension cultures of *Coleus blumei*, *Nat Prod Res*, 23(2), pp. 127-137.

112. Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T. (2003), Elicitation of plants and microbial cell systems, *Biotechnol Appl Biochem*, 37(Pt 1), pp. 91-102.

113. Rahimi S., Devi B.S.R., Khorolragchaa A., Kim Y.J., Kim J.H., Jung S.K., Yang D.C. (2014), Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots, *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(6), pp. 811-817.

114. Rao B., Kumar V., Amrutha N., Jalaja N., Vaidyanath K., Rao A., Polavarap S., Kishor P. (2008), Effect of growth regulators, carbon source and cell aggregate size on berberine production from cell cultures of *Tinospora cordifolia* Miers, *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2(2), pp. 269-276.

115. Rao S.R., Ravishankar G.A. (2002), Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol Adv*, 20, pp. 101-153.

116. Rehman S.U., Choe K., Yoo H.H. (2016), Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology, *Molecules*, 21(3), pp. 331.

117. Rhee H.S., Cho H.-Y., Son S.Y., Yoon H.S.-Y., J.M. J.M.P. (2010), Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101, pp. 295-302.

118. Riksa P., Rizkita R.E. (2014), Effect of UV elicitation on callus growth, alkaloid and terpenoid contents in *Eurycoma longifolia* Jack, *Int'I Journal of Advances in Chemical Engg & Biological Sciences*, 1(1), pp. 12-15.

119. Roewer I.A., Cloutier N., Nessler C.L., De Luca V. (1992), Transient induction of tryptophan decarboxylase (TDC) and strictosidine synthase (SS)

genes in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Plant Cell Rep*, 11(2), pp. 86-89.

120. Ruan J., Li Z., Zhang Y., Chen Y., Liu M., Han L., Zhang Y., Wang T. (2019), Bioactive constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*, *Molecules*, 24(17), pp.

121. Saeed S., Ali H., Khan T., Kayani W., Khan M.A. (2017), Impacts of methyl jasmonate and phenyl acetic acid on biomass accumulation and antioxidant potential in adventitious roots of *Ajuga bracteosa* Wall ex Benth., a high valued endangered medicinal plant, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(1), pp. 229-237.

122. Sato H., Tanaka S., Tabata M. (1993), Kinetics of alkaloid uptake by cultured cells of *Coptis japonica*, *Phytochemistry*, 34(3), pp. 697-701.

123. Shafiqul Islam A.K.M., Ismail Z., Saad B., Othman A.R., Ahmad M.N., Shakaff A.Y.M. (2006), Correlation studies between electronic nose response and headspace volatiles of *Eurycoma longifolia* extracts, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 120(1), pp. 245-251.

124. Sharma M., Sharma A., Ashwani K., Kumar B.S. (2011), Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus, *American Journal of Plant Physiology*, 6(2), pp. 50-71.

125. Sheper T. (2001), *Advances in biochemical engineering biotechnology-plant cell*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

126. Siregar L.A.M., Chan L.K., Boey P.L. (2003), Selection of cell source and the effect of pH and MS macronutrients on biomass production in cell cultures of tongkat ali (*Eurycoma longifolia* Jack), *J Plant Biotechnol*, 5, pp. 131-135.

127. Siregar L.A.M., Chan L.K., Boey P.L. (2004), Effect of cell source and pH of culture medium on the production of canthin-6-one alkaloids from the

cell cultures of Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack), *Plant Biotechnol*, 6, pp. 125-130.

128. Sudha G., Ravishankar G.A. (2003), Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill, *Current Science*, 85(8), pp. 1212-1217.

129. Taguchi G., Yazawa T., Hayashida N., Okazaki M. (2001), Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin, *Journal of Biochemistry*, 268, pp. 4086-4094.

130. Taiz L., Zeiger E. (2006), *Plant physiology*, Sinauer Associates, Inc Publisher, Massachusetts.

131. Tambi M.I., Imran M.K. (2010), *Eurycoma longifolia* Jack in managing idiopathic male infertility, *Asian J Androl*, 12(3), pp. 376-380.

132. Thakur M., Bhattacharya S., Khosla P.K., Puri S. (2019), Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, pp. 1-12.

133. Thanh N.T., Murthy H.N., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y. (2005), Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension culture of *Panax ginseng* in 5L balloon type bubble bioreactor, *Apply Microbiology Biotechnology*, 67, pp. 197-201.

134. Thanh N.T., Ket N.V., Paek K.Y. (2007), Effecting of medium composition on biomass and ginsenoside production in cell suspension culture of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, *VNU Journal of Science, Natural Sciences and Technology*, 23, pp. 269-274.

135. Tran T.T., Nguyen N.T., Pham N.B., Chu H.N., Nguyen T.D., Kishimoto T., Van Chau M., Chu H.H. (2018), Hairy root cultures of *Eurycoma*

longifolia and production of anti-inflammatory 9-Methoxycanthin-6-one, *Natural Product Communications*, 13(5), pp. 1934578X1801300507.

136. VanEtten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A., Farmer E.E. (1994), Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins", *Plant Cell*, 6(9), pp. 1191-1192.

137. Veerashree V., Anuradha C.M., Vadlapudi K. (2012), Elicitor-enhanced production of gymnemic acid in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br., *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 108, pp. 27-35.

138. Veersham C. (2004), *In Elicitation: Medicinal Plant Biotechnology*, CBS Publisher, India.

139. Wahab N.A., Mokhtar N.M., Halim W.N.H.A., Das S. (2010), The effect of eurycoma longifolia Jack on spermatogenesis in estrogen-treated rats, *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 65(1), pp. 93-98.

140. Wang J., Qian J., Yao L., Lu Y. (2015), Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*, *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), pp. 5.

141. Wang Y.D., Yuan Y.J., Wu J.C. (2004), Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. mairei, *Biochemical Engineering Journal*, 19, pp. 259-265.

142. Wink M. (1999), *Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual plant reviews*, Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield.

143. Yamamoto H., Ichimura M., Inoue K. (1995), Stimulation of prenylated flavanone production by mannans and acidic polysaccharides in callus culture of *Sophora flavescens*, *Phytochem*, 40, pp. 77-81.

144. Yousefzadi M., Sharifi M., Behmanesh M., Ghasempour A., Moyano E., Palazon J. (2010), Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell

cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis, *Biotechnol Lett*, 32(11), pp. 1739-1743.

145. Yu L.J., Lan W.Z., Qin W.M., Xu H.B. (2001), Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*, *Process Biochemistry*, 37(5), pp. 477-482.

146. Zabala M.A., Angarita M., Restrepo J.M., Caicedo L.A., Perea M. (2010), Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(3), pp. 233-238.

147. Zakaria R.A., Hour M.H., Zare N. (2011), Callus production and regeneration of the medicinal plant *Papaver orientale*, *Afr J Biotechnol*, 10, pp. 11152-11156.

148. Zhang C.H., Mei X.G., Liu L., Yu L.J. (2000), Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*, *Biotechnology Letters*, 22, pp. 1561-1564.

149. Zhao D., Xing J., Li M., Lu D., Zhao Q. (2001), Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, pp. 227-234.

150. Zhao J.L., Zhou L.G., Wu J.Y. (2010), Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), pp. 137-144.

PHỤ LỤC

1. Bảng thành phần môi trường cơ bản MS

Bảng 1. Thành phần và cách pha môi trường MS cơ bản (Murashige T., Skoog F., 1962) [99]

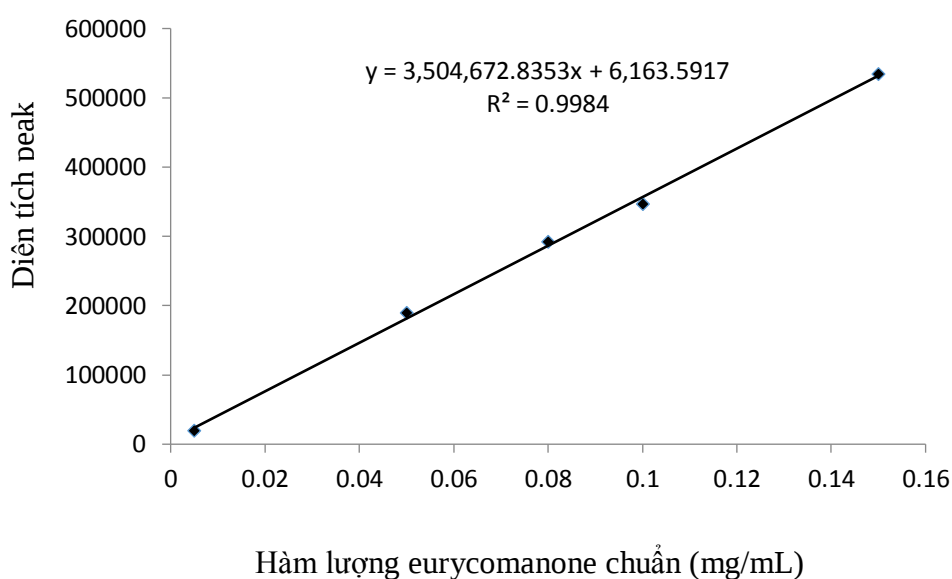
Dung dịch stock		Nồng độ (mg/ml)	Nồng độ trong dung dịch mẹ (g/l)		Dung tích dùng cho 1 lít môi trường
MS1	KNO ₃	1900		95	20 ml
	KH ₂ PO ₄	170	(x10)	8.5	
	NH ₄ NO ₃	1650		82.5	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370		18.5	
MS2	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	(x20)	22	10 ml
MS3	H ₃ BO ₄	6.2	(x20)	0.31	10 ml
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3		1.115	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		0.00125	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		0.00125	
	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8.6		0.43	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		0.0125	
	KI	0.83		0.0415	
MS4	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	(x20)	1.39	10 ml
	Na ₂ -EDTA	37.3		1.865	
MS5	Myo-inositol	100	(x20)	5	10 ml
	Thiamine.HCl	0.1		0.005	
	Pyridoxine.HCl	0.5		0.025	
	Nicotinic acid	0.5		0.025	
	Glycine	2		0.1	

Nồng độ trong dung dịch mẹ được tính pha trong 1 L đối với MS1, còn từ MS2 trở đi là pha trong 500 ml.

2. Xây dựng đường chuẩn eurycomanone

Tiến hành chạy HPLC mẫu eurycomanone chuẩn với các nồng độ 0,005; 0,05; 0,08; 0,1 và 0,15 mg/mL thu được các peak eurycomanone ở từng nồng độ và diện tích tương ứng của các peak eurycomanone đó.

Từ đó, sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel để tiến hành xây dựng đồ thị đường chuẩn với trục tung là diện tích peak eurycomanone chuẩn và trục hoành là hàm lượng eurycomanone chuẩn tương ứng.



Hình 1. Đường chuẩn eurycomanone

Phương trình đường chuẩn: $y = 3.504.672,8353 x + 6.163,5917$

Trong đó: - x: hàm lượng eurycomamnone (mg/L)

- y: diện tích peak eurycomanone

- $R^2 = 0,9984$

* Hàm lượng eurycomanone trong mẫu phân tích được tính theo công thức:

$$a = b.m.n$$

Trong đó: - a: hàm lượng eurycomanone trong mẫu phân tích (mg/g)

- b: hàm lượng eurycomanone tính theo đường chuẩn
- m: hệ số pha loãng mẫu trước khi phân tích HPLC
- n: hệ số quy đổi về 1g

3. Bố trí thí nghiệm nuôi cấy



Hình 2. Nuôi cấy tế bào huyền phù cây bách bệnh