

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

PHẠM THỊ MỸ TRÂM

**NUÔI CÂY TẾ BÀO XẠ ĐEN (*Ehretia asperula* Zollinger et
Moritzi) *IN VITRO* ĐỂ THU NHẬN SINH KHỐI CÓ KHẢ
NĂNG TỔNG HỢP ACID ROSMARINIC**

Ngành: Công nghệ Sinh học
Mã số ngành: 62420201

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

TP. HỒ CHÍ MINH - NĂM 2023

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn 1: PGS. TS. Lê Thị Thủy Tiên

Người hướng dẫn 2: PGS. TSKH. Ngô Kế Sương

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án họp tại

.....
.....

vào lúc giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM
- Thư viện Đại học Quốc gia TP.HCM
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP.HCM

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của đề tài

Xạ đen trước đây được biết đến với tên khoa học là *Celastrus hindsii*, thuộc họ Celastraceae. Năm 2009, tên khoa học chính xác của Xạ đen được xác định lại là *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi, thuộc họ Boraginaceae [1]. Năm 1999, Lê Thế Trung và cộng sự đã phát hiện nhóm hợp chất chính ở Xạ đen là flavonoid, quinone, saponin triterpenoid và pyrocatechin có khả năng ức chế khối u ác tính [2]. Nhiều hợp chất từ Xạ đen cũng ức chế tăng trưởng của vi khuẩn gây bệnh, điển hình là *Staphylococcus aureus* [3], *Bacillus subtilis* [4].

Xạ đen chứa nhiều hợp chất thuộc nhóm phenolic, đặc biệt là acid rosmarinic (RA) [5], [6]. RA trong lá Xạ đen có khả năng kháng oxy hóa tốt hơn so với α -tocopherol [5]. Năm 2016, quy trình chiết xuất RA từ lá Xạ đen khô được thiết lập [7]. Theo Le và cộng sự (2021), RA và methyl rosmarinate được phân lập từ dịch chiết ethanol của lá Xạ đen có khả năng chống lại sự chết của tế bào võng mạc (R28) do stress oxy hóa hay chất kích thích gây ra [8].

RA là một hợp chất phenolic, được tìm thấy với một hàm lượng đáng kể ở thực vật thuộc họ Boraginaceae và Lamiaceae, có nhiều hoạt tính sinh học có giá trị như khả năng kháng khuẩn, kháng virus, kháng oxy hóa, chống dị ứng, viêm khớp, hen suyễn và kháng tế bào ung thư [9], [10], [11]. Ngoài việc thu nhận từ cây ngoài tự nhiên, RA cũng đang được nghiên cứu và thu nhận bằng phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật ở qui mô pilot [12].

Hiện nay ở Việt Nam, Xạ đen được dùng chủ yếu trong việc hỗ trợ điều trị ung thư. Các công trình nghiên cứu ở Xạ đen chủ yếu là việc thu nhận các hợp chất thứ cấp và đánh giá tác dụng dược lý của chúng từ cây ngoài tự nhiên. Vì vậy, sự chủ động thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là RA từ Xạ đen rất cần thiết. Đề tài: **“Nuôi cấy tế bào Xạ đen (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi) *in vitro* để thu nhận sinh khối có khả năng tổng hợp acid rosmarinic”** được thực hiện nhằm góp phần cung cấp các thông tin cần thiết cho việc tạo sinh khối thực vật chứa RA trong điều kiện có kiểm soát.

Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Nghiên cứu thiết lập các điều kiện nuôi cấy và môi trường thích hợp để thu nhận sinh khối Xạ đen *in vitro* có khả năng tổng hợp RA.

Ý nghĩa khoa học

Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp các dữ liệu khoa học về các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến sự tăng sinh và tổng hợp RA trong nuôi cấy tế bào Xạ đen *in vitro*.

Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả nghiên cứu góp phần xác định điều kiện môi trường thích hợp để nuôi cấy huyền phù tế bào Xạ đen có khả năng tổng hợp RA, làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo hướng tới cung cấp nguồn nguyên liệu ổn định cho ngành dược liệu.

Tính mới của luận án

Tạo được dòng tế bào mô sẹo (bờ, có màu trắng đến vàng nhạt) từ lá của cây Xạ đen *in vitro* thích hợp cho sự nuôi cấy huyền phù tế bào.

Xác định được một số yếu tố thích hợp (điều kiện chiếu sáng, thể tích môi trường, tốc độ lắc, chất điều hòa sinh trưởng thực vật) cho sự tăng sinh của huyền phù tế bào Xạ đen.

Xác định được một số yếu tố thích hợp (cường độ chiếu ánh sáng, kích thước cụm tế bào, nồng độ đường, nồng độ chitosan) cho sự tổng hợp RA của huyền phù tế bào Xạ đen.

Đã ghi nhận khả năng kháng oxy hóa của cao chiết từ sinh khối tế bào huyền phù tương đương với cao chiết từ lá Xạ đen ngoài vườn và không gây độc tế bào HEK293 khi sử dụng nồng độ cao chiết dưới 400 µg/mL.

Nội dung nghiên cứu

Tạo mô sẹo Xạ đen – nguồn vật liệu *in vitro* cho nuôi cấy huyền phù tế bào.

Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào Xạ đen.

Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự tích lũy sinh RA của huyền phù tế bào Xạ đen.

Cấu trúc luận án

Luận án gồm 123 trang, 20 bảng, 20 hình và 182 tài liệu tham khảo, bao gồm các phần: Mở đầu; Chương 1. Tổng quan; Chương 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu; Chương 3. Kết quả và thảo luận; Chương 4. Kết luận và kiến nghị; Danh mục công trình đã công bố; Tài liệu tham khảo; Phụ lục.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Cây Xạ đen

Xạ đen có tên khoa học là *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi, thuộc họ Vòi voi (Boraginaceae) [1], được mô tả lần đầu tiên bởi Zollinger và Moritzi vào những năm 1840 [13]. Xạ đen mọc nhiều ở Trung Quốc, Việt Nam, Myanmar, Thái Lan. Ở Việt Nam, Xạ đen phân bố chủ yếu tại các tỉnh Hà Nam, Quảng Ninh, Ninh Bình, Hòa Bình, Thừa Thiên - Huế, Gia Lai, Vườn quốc gia Cúc Phương, Vườn quốc gia Ba Vì [14].

1.2 Acid rosmarinic

RA là một hợp chất thứ cấp có giá trị, hiện diện ở nhiều loài thực vật từ họ rêu sùng (Anthocerotaceae), dương xỉ (Blechnaceae) đến cây một lá mầm và hai lá mầm, đặc biệt trong họ Lamiaceae và Boraginaceae [15]. RA có nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý như kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng virus, kháng viêm, điều trị tiểu đường, bảo vệ tim mạch, bảo vệ gan, bảo vệ thận, chống lão hóa và chống trầm cảm. RA cũng hỗ trợ kháng ung thư theo nhiều hướng tác động khác nhau, bao gồm ức chế sự tăng sinh, di căn của khối u và cảm ứng quá trình tự chết của tế bào ung thư một cách chọn lọc [11]. Việc thu nhận RA từ nuôi cấy *in vitro* được thực hiện ở nhiều loài thực vật như: *Lithospermum erythrorhizon* [16], *Satureja khuzistanica* [17], *Ocimum basilicum* L. [18].

1.3 Nuôi cấy tế bào Xạ đen

Các nghiên cứu về nuôi cấy tế bào Xạ đen đến nay vẫn còn rất ít. Năm 2019, Hong và Minh ghi nhận mô sẹo Xạ đen thu được bởi phát triển tốt trên môi trường MS bổ sung nước dừa 10%, sucrose 30 g/L, BA 0,1 mg/L và 2,4-D 2,0 mg/L. Huyền phù tế bào Xạ đen tăng sinh tốt nhất trên máy lắc tròn với tốc độ lắc 140 vòng/phút và mật độ tế bào ban đầu là 40% so với thể tích môi trường. Hàm lượng saponin cao nhất đạt 71,1 $\mu\text{g/g}$ DW khi bổ sung MeJA 10 mg/L vào môi trường nuôi cấy [19]. Tiếp đó, Nguyễn Võ Thu Thảo và cộng sự (2021) đã báo cáo rằng huyền phù tế bào Xạ đen phát triển tốt trên môi trường B5 có sucrose 30 g/L, NAA 1,5 mg/L với hàm lượng phenolic đạt 47,74 mg GAE/g DW và hàm lượng RA đạt 43,61 mg/g DW sau 15 ngày nuôi cấy [20].

CHƯƠNG 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

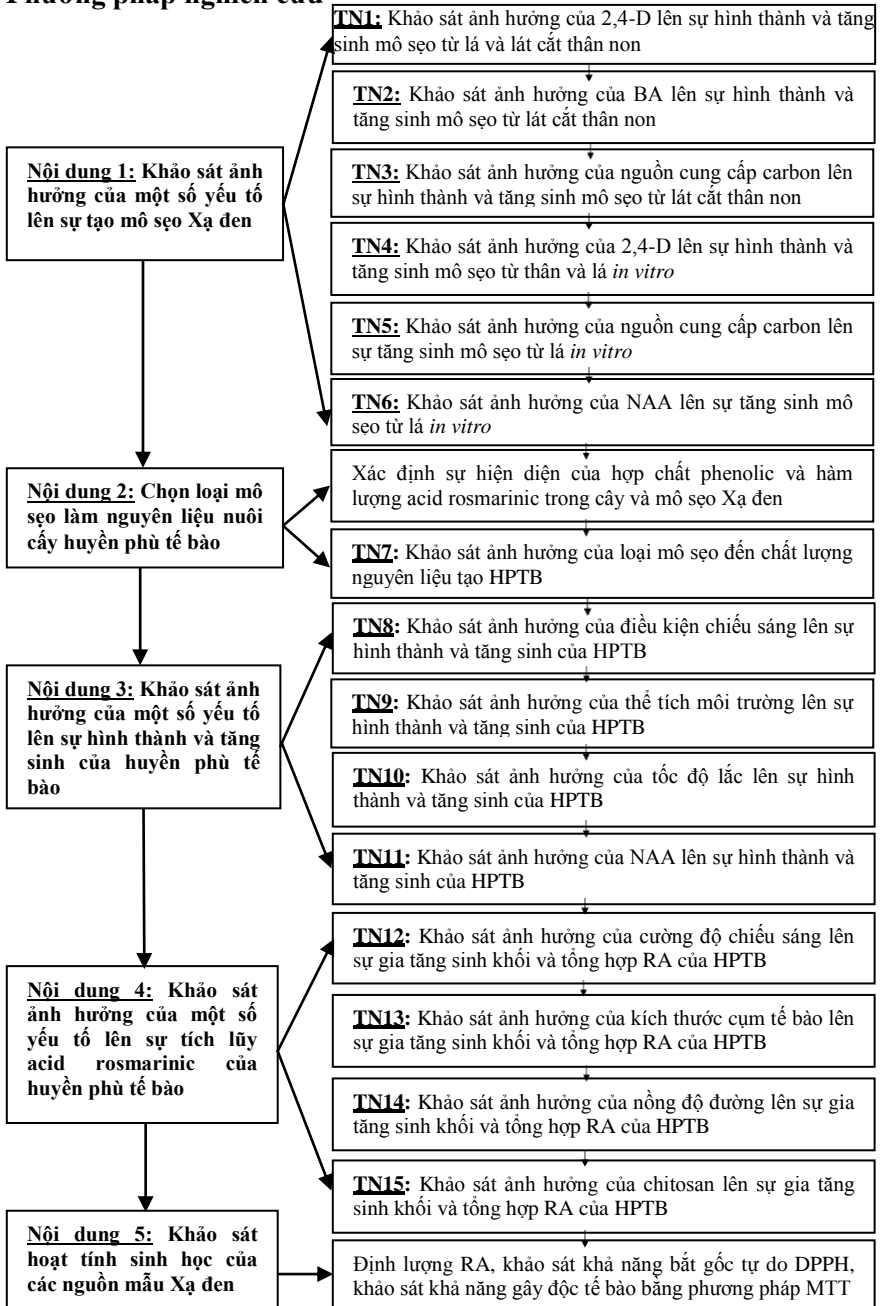
Vật liệu sử dụng trong nuôi cấy tế bào Xạ đen *in vitro*: đoạn thân non (1 – 2 tuần tuổi) của cây ngoài vườn 2 năm tuổi (Hình 2.1A) và lá của cây *in vitro* 12 – 14 tuần tuổi (Hình 2.1B).



Hình 2.1 Vật liệu sử dụng trong nuôi cấy tế bào Xạ đen *in vitro*. (A) Cây Xạ đen ngoài vườn; (B) Cây Xạ đen *in vitro*

Tế bào phôi thận lạnh tính (HEK293) do Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, TP.HCM cung cấp được dùng trong thí nghiệm khảo sát khả năng gây độc tế bào của các nguồn mẫu Xạ đen.

2.2 Phương pháp nghiên cứu



Hình 2.2 Sơ đồ tổng hợp các thí nghiệm nghiên cứu

2.2.1 Vi nhân giống cây Xạ đen

Đoạn thân của cây ngoài vườn được rửa nhiều lần bằng xà phòng, khử trùng lần lượt với ethanol 70%/1 phút và dung dịch javel 20%/10 phút, sau đó, rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng [21]. Mẫu cây được cắt thành từng đoạn 3 cm mang chồi ngủ và đặt lên môi trường nuôi cấy tạo cây Xạ đen *in vitro*.

2.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự tạo mô sẹo Xạ đen

2.2.2.1 Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự tạo mô sẹo từ cây Xạ đen ngoài vườn

a. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lá và lát cắt thân non

2,4-D với dãy nồng độ khảo sát: 0,4; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0 mg/L.

b. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lát cắt thân non

BA với dãy nồng độ khảo sát: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 và 0,5 mg/L.

c. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của nguồn cung cấp carbon lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lát cắt thân non

Nguồn cung cấp carbon (fructose, glucose, sucrose) với dãy nồng độ khảo sát: 20; 30 và 40 g/L.

d. Khảo sát sự tăng sinh của mô sẹo từ lát cắt thân non theo thời gian

Mẫu cây thân non được đặt lên môi trường B5 bổ sung glucose 30 g/L, 2,4-D 0,4 mg/L, BA 0,1 mg/L, than hoạt tính 0,5 mg/L, agar 7,5 g/L nhằm theo dõi sự tăng sinh và xác định thời gian cấy chuyển mô sẹo. Quá trình theo dõi kết thúc khi sinh khối mô sẹo bắt đầu giảm.

2.2.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự tạo mô sẹo từ cây Xạ đen *in vitro*

a. Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ thân và lá *in vitro*

2,4-D với dãy nồng độ khảo sát: 0,4; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0 mg/L.

b. Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của nguồn cung cấp carbon lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá *in vitro*

Nguồn cung cấp carbon (fructose, glucose, sucrose) với dãy nồng độ khảo sát: 20; 30 và 40 g/L.

c. Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng của NAA lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá *in vitro*

NAA với dãy nồng độ khảo sát: 0,4; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 và 5,0 mg/L.

d. Khảo sát sự tăng sinh của mô sẹo từ lá *in vitro* theo thời gian

Mẫu cấy từ lá *in vitro* được đặt lên môi trường B5 bổ sung glucose 30 g/L, 2,4-D 0,4 mg/L, BA 0,1 mg/L, than hoạt tính 0,5 mg/L, agar 7,5 g/L, nhằm theo dõi sự tăng sinh và xác định thời gian cấy chuyên mô sẹo. Quá trình theo dõi kết thúc khi sinh khối mô sẹo bắt đầu giảm.

2.2.3 Xác định sự hiện diện của hợp chất phenolic và hàm lượng acid rosmarinic trong cây và mô sẹo Xạ đen

Xác định sự hiện diện của hợp chất phenolic và hàm lượng RA trong cây và mô sẹo, làm cơ sở cho việc lựa chọn nguồn mô sẹo thích hợp làm nguyên liệu tạo huyền phù tế bào.

2.2.4 Thí nghiệm 7: Khảo sát ảnh hưởng của loại mô sẹo đến chất lượng nguyên liệu tạo huyền phù tế bào

Hai loại mô sẹo từ lá *in vitro* sau 2 lần chuyển (15 tuần) bao gồm mô sẹo có màu trắng đến vàng nhạt (mô sẹo T) và mô sẹo có màu vàng đậm đến nâu (mô sẹo V) được chuyển sang môi trường B5 bổ sung glucose 30 g/L, 2,4-D 0,4 mg/L, BA 0,1 mg/L, than hoạt tính 0,5 mg/L và agar 7,5 g/L. Các chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.5 Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự gia tăng sinh khối và tích lũy acid rosmarinic của huyền phù tế bào Xạ đen

2.2.4.1 Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

a. Thí nghiệm 8: Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

Hai điều kiện chiếu sáng khảo sát: trong tối hoàn toàn và chiếu sáng liên tục với cường độ ánh sáng 1500 lux.

c. Thí nghiệm 9: Khảo sát ảnh hưởng của thể tích môi trường lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

1 g mô sẹo được chuyển vào bình tam giác 100 mL với thể tích môi trường nuôi cấy khảo sát: 10; 20; 30; 40 50 mL.

d. Thí nghiệm 10: Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

Tốc độ lắc khảo sát: 60; 90; 120 và 150 vòng/phút, trên máy lắc vòng.

e. Thí nghiệm 11: Khảo sát ảnh hưởng của NAA lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

NAA với dãy nồng độ khảo sát: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/L.

2.2.6 Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự tích lũy acid rosmarinic của huyền phù tế bào

a. Thí nghiệm 12: Khảo sát ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp acid rosmarinic của huyền phù tế bào

Cường độ chiếu sáng khảo sát: tối, 2000 lux, và 4000 lux.

b. Thí nghiệm 13: Khảo sát ảnh hưởng của kích thước cụm tế bào lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp acid rosmarinic của huyền phù tế bào

Tế bào có kích thước khảo sát: >0,125 μm ; <0,125 μm và không qua rây.

c. Thí nghiệm 14: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp RA của huyền phù tế bào

Glucose với dãy nồng độ khảo sát: 30; 45; 60 và 70 g/L.

d. Thí nghiệm 15: Khảo sát ảnh hưởng của chitosan lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp RA của huyền phù tế bào

Đến giai đoạn sinh trưởng ổn định của huyền phù tế bào (giai đoạn đạt sinh khối cao nhất), chitosan được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với dãy nồng độ khảo sát: 50; 100 và 150 mg/L để khảo sát ảnh hưởng của chitosan lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp RA sau 24; 48 và 72 giờ.

2.2.7 Khảo sát hoạt tính sinh học của các nguồn mẫu Xạ đen

Mẫu khô từ lá ngoài vườn và *in vitro*, mô sẹo từ lá *in vitro*, sinh khối tế bào huyền phù từ mô sẹo lá *in vitro* được dùng để khảo sát hàm lượng RA, khả năng bắt gốc tự do DPPH và khả năng gây độc tế bào bằng phương pháp MTT.

2.2.8 Xử lý số liệu

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình và độ lệch chuẩn của 3 lần lặp lại ($M \pm SD$) và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV.

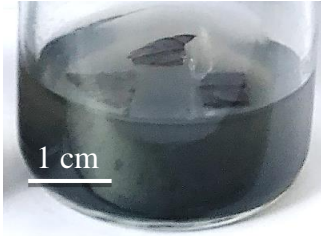
CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự tạo mô sẹo Xạ đen

3.1.1 Sự tạo mô sẹo từ cây ngoài vườn

3.1.1.1 Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lá non

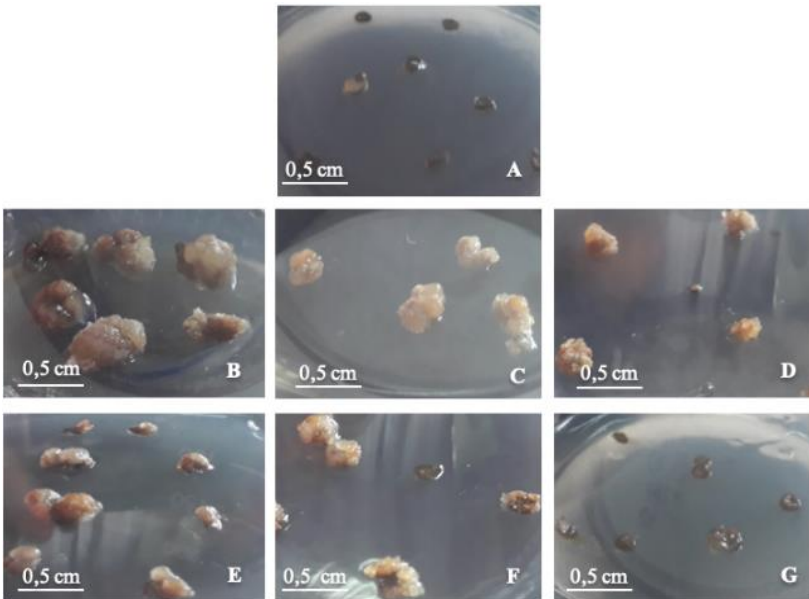
Đối với mẫu cây lá non, tất cả các nghiệm thức đều không có sự xuất hiện mô sẹo ở các vị trí vết cắt cũng như trên bề mặt lá. Các mẫu lá đều bị nâu sau 1 tuần, bị đen sau 2 tuần và chết sau 4 tuần nuôi cấy (Hình 3.1).



Hình 3.1 Mẫu lá non Xạ đen ngoài vườn sau 4 tuần nuôi cấy

3.1.1.2 Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lát cắt thân non

Sau 4 tuần, mô sẹo xốp xuất hiện ở các nghiệm thức có 2,4-D nồng độ từ 0,4 – 2,5 mg/L, trong đó khối lượng tươi của mô sẹo cao nhất ở nghiệm thức có 2,4-D 0,4 mg/L. Không có sự hình thành mô sẹo ở nghiệm thức không bổ sung 2,4-D hoặc 2,4-D 3,0 mg/L (Bảng 3.1; Hình 3.2).



Hình 3.2 Mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen ngoài vườn sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung BA 0,1 mg/L và 2,4-D với nồng độ khác nhau. (A) 2,4-D 0 mg/L; (B) 2,4-D 0,4 mg/L; (C) 2,4-D 1,0 mg/L; (D) 2,4-D 1,5 mg/L; (E) 2,4-D 2,0 mg/L; (F) 2,4-D 2,5 mg/L; (G) 2,4-D 3,0 mg/L

Bảng 3.1 Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen ngoài vườn sau 4 tuần nuôi cấy

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật (mg/L)		Tỉ lệ mẫu cấy hình thành mô sẹo xốp (%)	Khối lượng mô sẹo tươi (mg/mẫu)	Hình thái mô sẹo
2,4-D	BA			
0 (ĐC)	0	-	-	
0,4	0,1	85,22 ± 2,42 ^a	48,33 ± 8,39 ^a	Vàng, xốp, mọng nước
1,0		83,96 ± 6,10 ^a	38,0 ± 2,0 ^b	Vàng nhạt, xốp, mọng nước
1,5		66,44 ± 4,56 ^b	26,33 ± 2,52 ^c	Vàng nhạt, xốp, mọng nước
2,0		67,27 ± 9,17 ^b	23,0 ± 3,61 ^c	Vàng nhạt, xốp, mọng nước
2,5		36,80 ± 1,07 ^c	18,67 ± 5,51 ^c	Vàng nhạt, xốp, mọng nước
3,0		-	-	-

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

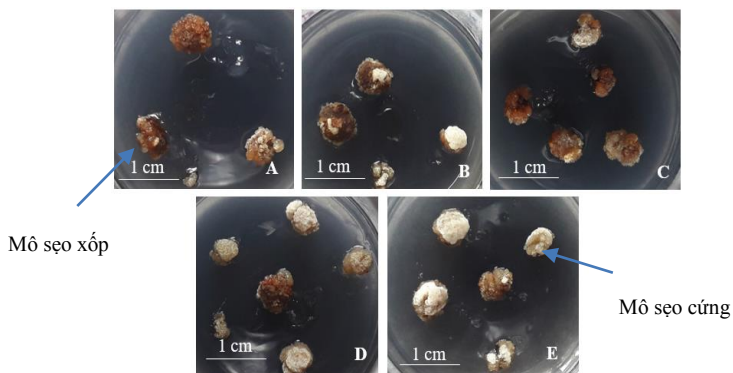
3.1.1.3 Ảnh hưởng của BA lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lát cắt thân non

Sau 4 tuần, trên môi trường B5 bổ sung BA 0,1 mg/L, tỉ lệ mô sẹo xốp đạt cao nhất với 84,12%, khối lượng tươi đạt 55,33 mg/mẫu, mô sẹo có màu vàng nhạt. (Bảng 3.2; Hình 3.3).

Bảng 3.2 Ảnh hưởng của BA lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen ngoài vườn sau 4 tuần nuôi cấy

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật (mg/L)		Tỉ lệ mẫu cấy hình thành mô sẹo xốp (%)	Khối lượng mô sẹo tươi (mg/mẫu)	Hình thái mô sẹo
2,4-D	BA			
	0,1 (ĐC)	84,12 ± 5,23 ^a	55,33 ± 8,02 ^a	Vàng nhạt đến vàng, xốp, mọng nước
	0,2	50,0 ± 10,0 ^b	31,33 ± 3,06 ^c	Vàng đậm, vừa xuất hiện mô sẹo xốp và mô sẹo cứng
0,4	0,3	54,62 ± 5,04 ^b	44,33 ± 6,51 ^{ab}	Vàng, vừa xuất hiện mô sẹo xốp và mô sẹo cứng
	0,4	50,88 ± 10,11 ^b	38,33 ± 11,37 ^{bc}	Vàng đậm, vừa xuất hiện mô sẹo xốp và mô sẹo cứng
	0,5	34,44 ± 5,09 ^c	36,67 ± 3,06 ^{bc}	Vàng đậm, vừa xuất hiện mô sẹo xốp và mô sẹo cứng

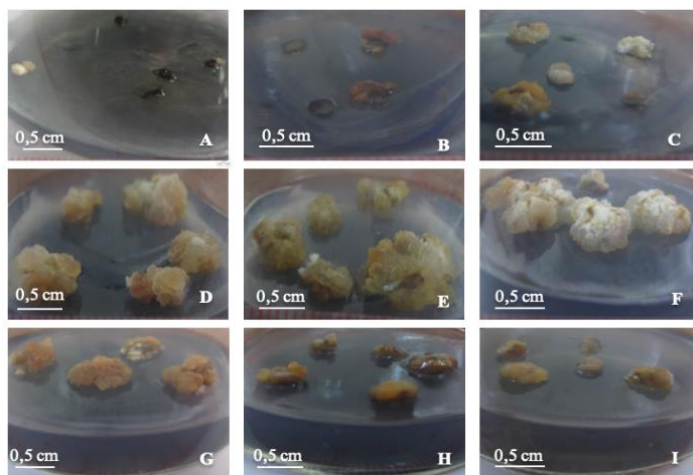
Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$.



Hình 3.3 Mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen ngoài vườn sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung 2,4-D 0,4 mg/L và BA với nồng độ khác nhau. (A) BA 0,1 mg/L; (B) BA 0,2 mg/L; (C) BA 0,3 mg/L; (D) BA 0,4 mg/L; (E) BA 0,5 mg/L

3.1.1.4 Ảnh hưởng của nguồn cung cấp carbon lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lát cắt thân non

Mô sẹo đạt khối lượng cao nhất ở nghiệm thức chứa glucose 30 g/L (165,0 mg/mẫu), mô sẹo nở to, kích thước lớn hơn so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 3.3; Hình 3.4).



Hình 3.4 Mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen ngoài vườn sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung đường với nồng độ khác nhau. (A) Fructose 20 g/L; (B) Fructose 30 g/L; (C) Fructose 40 g/L; (D) Glucose 20 g/L; (E) Glucose 30 g/L; (F) Glucose 40 g/L; (G) Sucrose 20 g/L; (H) Sucrose 30 g/L; (I) Sucrose 40 g/L

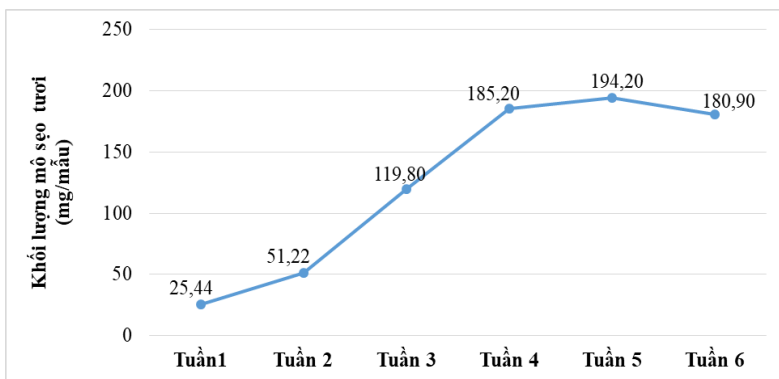
Bảng 3.3 Ảnh hưởng của nguồn cung cấp carbon lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen ngoài vườn sau 4 tuần nuôi cấy

Loại đường	Nồng độ (g/L)	Tỉ lệ mẫu cây hình thành mô sẹo xốp (%)	Khối lượng mô sẹo tươi (mg/mẫu)	Hình thái mô sẹo
Fructose	20	26,11 ± 6,73 ^d	15,33 ± 7,23 ^c	Vàng nhạt, xốp
	30	33,13 ± 4,47 ^{cd}	23,67 ± 10,26 ^c	Vàng đậm, xốp
	40	41,11 ± 8,39 ^c	37,0 ± 5,57 ^{bc}	Vàng nhạt, xốp
Glucose	20	100 ± 0,0 ^a	156,0 ± 55,87 ^a	Trắng đến vàng nhạt, xốp, mọng nước, xuất hiện nhiều tế bào màu trắng nhỏ tăng sinh kém
	30	100 ± 0,0^a	165,0 ± 44,51^a	Vàng nhạt, xốp, mọng nước, kích thước lớn
	40	100 ± 0,0 ^a	124,0 ± 7,55 ^a	Trắng đến vàng nhạt, xuất hiện nhiều tế bào màu trắng nhỏ tăng sinh kém
Sucrose	20	89,63 ± 10,02 ^b	70,33 ± 30,44 ^b	Vàng, xốp, mọng nước
	30	85,73 ± 2,16 ^b	52,33 ± 6,03 ^{bc}	Vàng, xốp, mọng nước
	40	82,22 ± 1,92 ^b	40,0 ± 12,12 ^{bc}	Vàng đậm, xốp, mọng nước

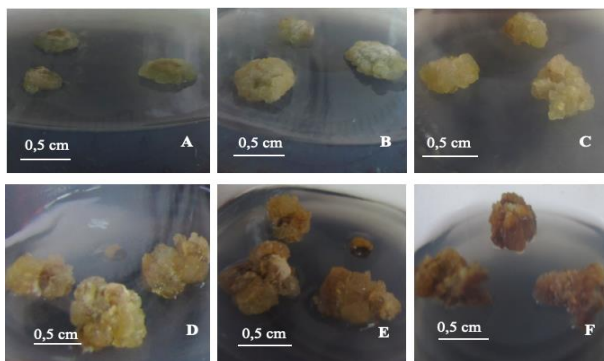
Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$.

3.1.1.5 Sự tăng sinh của mô sẹo từ lát cắt thân non theo thời gian

Khối lượng mẫu cây tăng từ tuần 1 đến tuần 5 và giảm ở tuần 6 (Hình 3.5; Hình 3.6).



Hình 3.5 Đường cong sinh trưởng của mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen ngoài vườn được nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung glucose 30 g/L, 2,4-D 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L

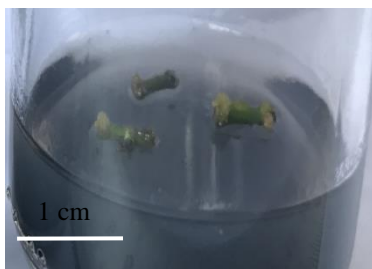


Hình 3.6 Mô sẹo từ lát cắt thân non Xạ đen ngoài vườn được nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung glucose 30 g/L, 2,4-D 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L. (A) Sau 1 tuần; (B) Sau 2 tuần; (C) Sau 3 tuần; (D) Sau 4 tuần; (E) Sau 5 tuần; (F) sau 6 tuần

3.1.2 Sự tạo mô sẹo từ cây *in vitro*

3.1.2.1 Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ thân *in vitro*

Sau 4 tuần nuôi cấy, chỉ một số nghiệm thức có sự hình thành mô sẹo rất nhỏ ở hai đầu của đoạn thân. Nhiều nghiệm thức không có sự hình thành mô sẹo, mẫu cấy bị nâu đen và sẹo phát triển kém, không thích hợp làm nguyên liệu cho quá trình nuôi cấy huyền phù tế bào (Hình 3.7).



Hình 3.7 Mẫu thân Xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

3.1.2.2 Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lá *in vitro*

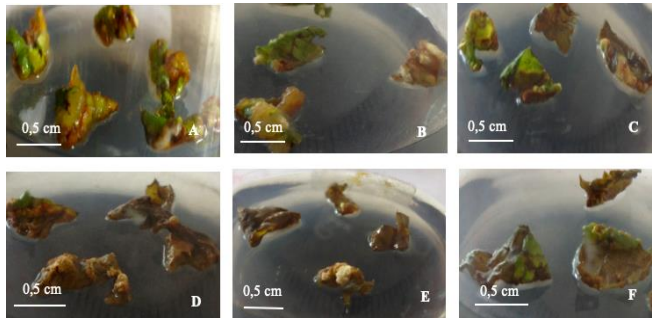
Sau 4 tuần, nghiệm thức có BA 0,1 mg/L và 2,4-D 0,4 mg/L cho tỉ lệ tạo mô sẹo cao nhất (85,19%), khối lượng tươi mô sẹo cũng cao nhất (642,33

mg/mẫu), mô sẹo có màu vàng xanh, trong và xốp. Nghiệm thức chứa BA 0,1 mg/L và 2,4-D nồng độ từ 2,0 – 3,0 mg/L không cảm ứng sự hình thành mô sẹo, tất cả mẫu cấy đều bị đen và chết sau 4 tuần (Bảng 3.4; Hình 3.8).

Bảng 3.4 Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành và tăng sinh mô sẹo từ lá Xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật (mg/L)		Tỉ lệ mẫu cấy hình thành mô sẹo xốp (%)	Khối lượng mô sẹo tươi (mg/mẫu)	Hình thái mô sẹo
2,4-D	BA			
0,4 (ĐC)		85,19 ± 6,41^a	642,33 ± 68,49^a	Vàng xanh, trong, xốp
1,0		66,67 ± 11,11 ^a	108,0 ± 18,68 ^b	Vàng xanh, trong, xốp
1,5		37,04 ± 16,98 ^b	31,0 ± 6,25 ^b	Vàng nhạt, xốp
2,0	0,1	-	-	-
2,5		-	-	-
3,0		-	-	-

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



Hình 3.8 Mô sẹo từ lá Xạ đen *in vitro* sau 4 tuần được nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung BA 0,1 mg/L và 2,4-D có nồng độ khác nhau. (A) 2,4-D 0,4 mg/L; (B) 2,4-D 1,0 mg/L; (C) 2,4-D 1,5 mg/L; (D) 2,4-D 2,0 mg/L; (E) 2,4-D 2,5 mg/L; (F) 2,4-D 3,0 mg/L

3.1.2.3 Ảnh hưởng của nguồn cung cấp carbon lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá *in vitro*

Môi trường có glucose 30 g/L giúp mô sẹo tăng sinh nhanh với sinh khối tăng cao nhất sau 4 tuần (139,0 mg/mẫu) và chỉ số tăng trưởng đạt 2,11. Mô sẹo trên môi trường chứa glucose 30 g/L không bị chuyển sang màu vàng đậm hoặc

nâu sau 4 tuần nuôi cấy. Trong khi đó, ở nghiệm thức có sử dụng fructose (20 – 40 g/L) và sucrose 40 g/L, khối lượng mô sẹo tăng không nhiều (Bảng 3.5)

Bảng 3.5 Ảnh hưởng của nguồn cung cấp carbon lên sự tăng sinh mô sẹo lá Xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Loại đường	Nồng độ (g/L)	Sự gia tăng khối lượng mô sẹo tươi (mg/mẫu)	Chỉ số tăng trưởng (GI)
Fructose	20	43,0 ± 25,16 ^{de}	0,93 ± 0,54 ^{bcd}
	30	55,67 ± 10,07 ^{cde}	1,14 ± 0,22 ^{abcd}
	40	38,67 ± 27,06 ^e	0,68 ± 0,50 ^d
Glucose	20	90,0 ± 41,58 ^{bcd}	1,73 ± 0,77 ^{abc}
	30	139,0 ± 13,86^a	2,11 ± 0,37^a
	40	98,33 ± 41,79 ^{abc}	1,90 ± 0,93 ^{ab}
Sucrose	20	119,67 ± 28,29 ^{ab}	1,81 ± 0,49 ^{abc}
	30	110,67 ± 3,06 ^{ab}	1,91 ± 0,49 ^{ab}
	40	36,67 ± 31,02 ^e	0,86 ± 0,73 ^{cd}

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

3.1.2.4 Ảnh hưởng của NAA lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá *in vitro*

Ở môi trường bổ sung BA 0,1 mg/L và 2,4-D 0,4 mg/L, khối lượng mô sẹo tăng cao nhất (281,67 mg/mẫu) với chỉ số tăng trưởng 12,36 (Bảng 3.6).

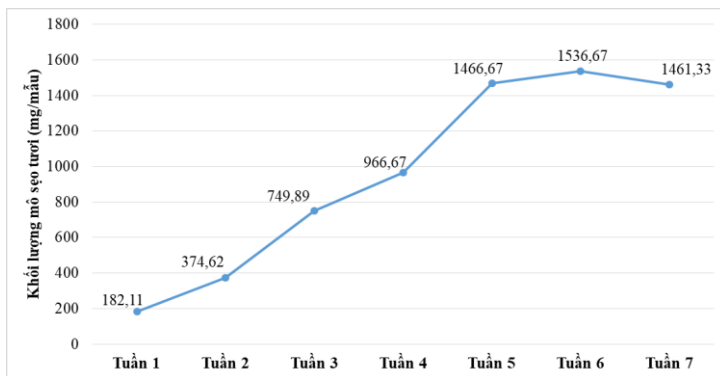
Bảng 3.6 Ảnh hưởng của NAA lên sự tăng sinh mô sẹo từ lá Xạ đen *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

NAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	Sự gia tăng khối lượng mô sẹo tươi (mg/mẫu)	Chỉ số tăng trưởng (GI)
0	0,4 (ĐC)		281,67 ± 58,23^a	12,36 ± 2,73^a
0,4	0		156,67 ± 38,89 ^b	2,94 ± 0,66 ^b
1,0	0		148,33 ± 44,88 ^{bc}	3,65 ± 0,71 ^b
2,0	0	0,1	105,0 ± 26,63 ^{bc}	3,30 ± 1,07 ^b
3,0	0		83,67 ± 7,37 ^c	2,53 ± 0,65 ^b
4,0	0		106,0 ± 53,33 ^{bc}	3,53 ± 1,98 ^b
5,0	0		102,0 ± 22,54 ^{bc}	4,11 ± 1,84 ^b

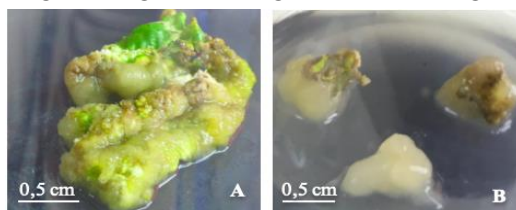
Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$.

3.1.2.5 Sự sinh trưởng của mô sẹo từ lá *in vitro*

Mẫu cấy gia tăng khối lượng từ tuần 1 đến tuần 6, sau đó giảm dần ở tuần 7.



Hình 3.9 Đường cong sinh trưởng của mô sẹo từ lá Xạ đen *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường B5 có glucose 30 g/L, 2,4-D 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L

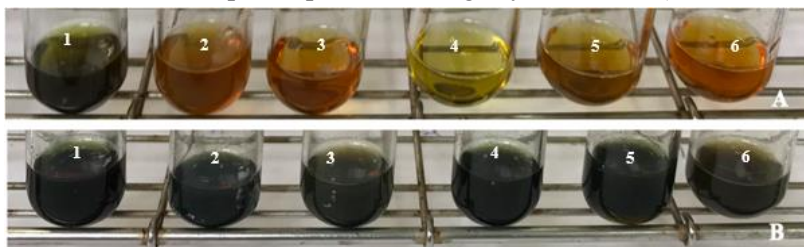


Hình 3.10 Mô sẹo từ lá Xạ đen *in vitro*. (A) Sau 5 tuần nuôi cấy; (B) Sau 1 lần cấy chuyển

3.2 Sự hiện diện của hợp chất phenolic và hàm lượng acid rosmarinic trong cây và mô sẹo Xạ đen

3.2.1 Sự hiện diện của hợp chất phenolic

Các dịch chiết chuyển sang màu xanh đậm khi phản ứng với FeCl_3 5%. Chứng tỏ có sự hiện diện của hợp chất phenolic trong cây và mô sẹo (Hình 3.11).



Hình 3.11 Phản ứng định tính phenolic của dịch chiết Xạ đen với thuốc thử FeCl_3 5%. (A) trước phản ứng; (B) sau phản ứng; Ống 1 – 6 lần lượt là dịch chiết: lá ngoài vườn, lá *in vitro*, mô sẹo từ lá *in vitro*, thân ngoài vườn, thân *in vitro*, mô sẹo từ lát cắt thân non ngoài vườn

3.2.2 Hàm lượng acid rosmarinic

Hàm lượng RA ở lá *in vitro* cao nhất với 41,83 mg/g DW và thấp nhất được ghi nhận ở thân ngoài vườn (15,08 mg/g DW) (Bảng 3.7).

Bảng 3.7 Hàm lượng RA trong cây và mô sẹo Xạ đen được xác định theo phương pháp quang phổ

Mẫu	Hàm lượng RA (mg/g DW)
Lá ngoài vườn	40,32 ± 1,15 ^{ab}
Thân ngoài vườn	15,08 ± 0,39 ^d
Mô sẹo từ lát cắt thân non ngoài vườn	34,55 ± 1,62 ^c
Lá <i>in vitro</i>	41,83 ± 0,25 ^a
Thân <i>in vitro</i>	33,94 ± 0,06 ^c
Mô sẹo từ lá <i>in vitro</i>	38,83 ± 0,89 ^b

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

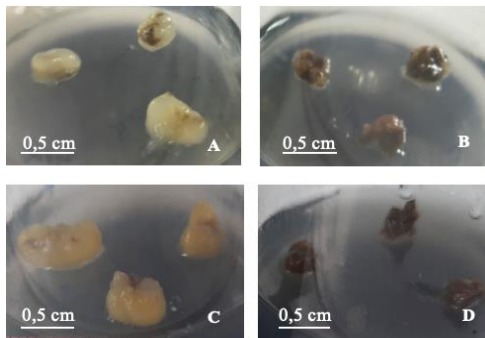
3.3 Ảnh hưởng của loại mô sẹo dùng làm nguyên liệu tạo huyền phù tế bào

Sau 4 tuần, khối lượng mô sẹo và hàm lượng RA của tế bào T cao hơn so với khối lượng mô sẹo V (Bảng 3.8; Hình 3.12).

Bảng 3.8 Ảnh hưởng của loại mô sẹo từ lá Xạ đen *in vitro* lên sự tăng sinh mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy

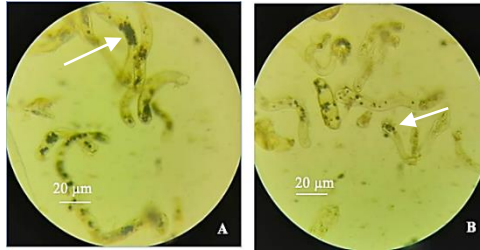
Loại mô sẹo	Khối lượng mô sẹo (mg/mẫu)		Chỉ số tăng trưởng (GI)	Hàm lượng RA (mg/g FW)
	Ban đầu	Sau 4 tuần		
T	0,05	89,0 ± 21,07 ^a	0,79	T
V	0,05	52,33 ± 2,08 ^b	0,04	V

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



Hình 3.12 Các loại mô sẹo từ lá Xạ đen *in vitro*. (A, B) Mô sẹo T và V ở ngày đầu tiên cấy chuyên; (C, D) Mô sẹo T và V sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường B5 có glucose 30 g/L, 2,4-D 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L

Tế bào T chứa lượng hạt tinh bột nhiều hơn so với tế bào V (thể hiện qua sự bắt màu tím với lugol) (Hình 3.13). Sự hiện diện của các hạt tinh bột hỗ trợ sự tăng sinh trong quá trình phân chia tế bào.



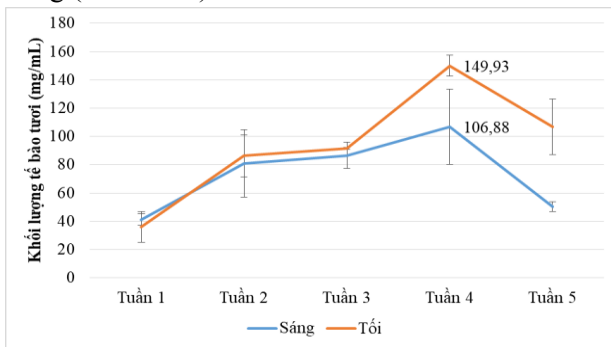
Hình 3.13 Tế bào mô sẹo từ lá Xạ đen *in vitro* dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần. (A) Tế bào mô sẹo T; (B) Tế bào mô sẹo V; Mũi tên chỉ các hạt tinh bột trong tế bào

3.4 Sự gia tăng sinh khối và tích lũy acid rosmarinic của huyền phù tế bào Xạ đen

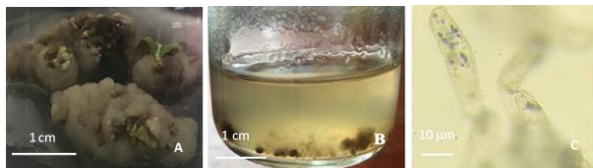
3.4.1 Ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

3.4.1.1 Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

Sinh khối tế bào tăng từ tuần 1 đến tuần 4 và giảm ở tuần 5. Trong đó, huyền phù tế bào được nuôi trong điều kiện tối tăng sinh mạnh hơn so với mẫu được nuôi ở ngoài sáng (Hình 3.14).



Hình 3.14 Sự tăng trưởng của huyền phù tế bào Xạ đen trong môi trường lỏng B5 bổ sung glucose 30 g/L, 2,4-D 0,4 m,g/L và BA 0,1 mg/L ở điều kiện sáng và tối



Hình 3.15 Sự tạo huyền phù tế bào Xạ đen. (A) Mô sẹo xỏp; (B) Huyền phù tế bào sau 4 tuần nuôi cấy; (C) Tế bào huyền phù dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần

Mô sẹo (Hình 3.15A) được nuôi trong môi trường lỏng để tạo huyền phù tế bào ở 25⁰C, trong tối. Sau 4 tuần, huyền phù tế bào có màu vàng đậm (Hình 3.15B) với tế bào có dạng bầu dục chứa đậm tế bào chất (Hình 3.15C).

3.4.1.2 Ảnh hưởng của thể tích môi trường lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

Huyền phù tế bào tăng sinh tốt nhất khi 1 g mô sẹo được nuôi trong 20 mL môi trường dinh dưỡng với khối lượng tế bào tăng 84,40 mg/mL (Bảng 3.9).

Bảng 3.9 Ảnh hưởng của thể tích môi trường lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Thể tích môi trường (mL)	Khối lượng tế bào tăng (mg/mL)
10	66,87 ± 5,05 ^b
20	84,40 ± 10,94^a
30 (ĐC)	80,83 ± 4,98 ^a
40	60,52 ± 2,46 ^b
50	47,49 ± 7,77 ^c

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

3.4.1.3 Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

Ở tốc độ lắc 90 vòng/phút, huyền phù tế bào tăng trưởng tốt nhất, khối lượng tế bào tươi sau 4 tuần đạt 146,85 mg/mL (Bảng 3.10).

Bảng 3.10 Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Tốc độ lắc (vòng/phút)	Khối lượng tế bào tươi (mg/mL)
60	73,36 ± 4,32 ^c
90	146,85 ± 12,63^a
120	128,40 ± 7,71 ^b
150 (ĐC)	121,11 ± 3,47 ^b

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

3.4.1.4 Ảnh hưởng của NAA lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào

Kết quả ở bảng 3.11 không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức có bổ sung NAA từ 0,4 đến 1,0 mg/L và 2,4-D 0,4 mg/L. Nên NAA 0,4 mg/L được lựa chọn để bổ sung vào môi trường nuôi cấy huyền phù tế bào Xạ đen.

Bảng 3.11 Ảnh hưởng của NAA lên sự hình thành và tăng sinh của huyền phù tế bào Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

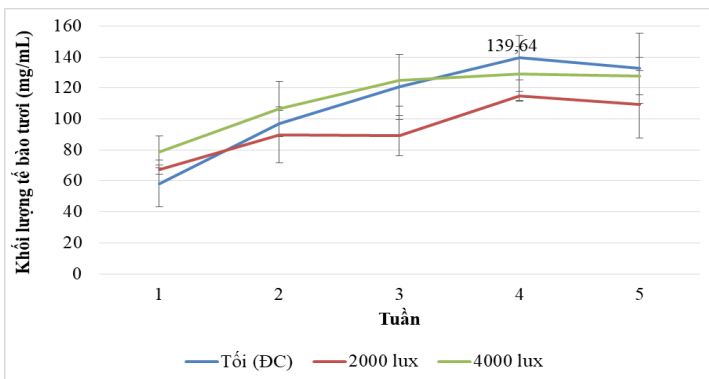
NAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	Khối lượng tế bào tươi (mg/mL)
0 (ĐC1)	0	0	103,39 ± 7,93 ^c
0	0,4 (ĐC2)		122,46 ± 8,55 ^{ab}
0,2	0		109,10 ± 3,51 ^{bc}
0,4	0	0,1	127,53 ± 8,69^a
0,6	0		134,93 ± 4,29 ^a
0,8	0		121,39 ± 9,58 ^{ab}
1,0	0		136,09 ± 13,58 ^a

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

3.4.2 Ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự tích lũy acid rosmarinic của huyền phù tế bào

3.4.2.1 Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp acid rosmarinic của huyền phù tế bào

Từ tuần 1 đến tuần 4, huyền phù tế bào được nuôi cấy ở các cường độ ánh sáng khảo sát đều gia tăng sinh khối, cao nhất ở tuần 4 và giảm ở tuần 5. Trong đó, huyền phù tế bào tăng sinh tốt nhất khi nuôi trong tối (Hình 3.16).



Hình 3.16 Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng lên sự gia tăng sinh khối tế bào Xạ đen sau 5 tuần nuôi cấy

Bảng 3.12 Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng lên hàm lượng RA trong nuôi cấy huyền phù tế bào Xạ đen sau 5 tuần nuôi cấy

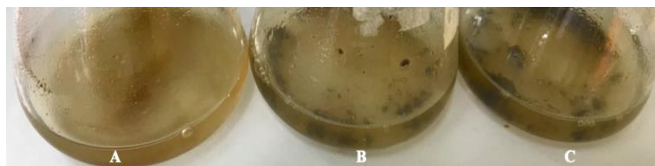
Tuần	Cường độ ánh sáng (lux)	Trong sinh khối tế bào ($\mu\text{g/mL}$)	Trong môi trường lỏng ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng RA tổng ($\mu\text{g/mL}$)
1	0 (ĐC)	28,35 \pm 0,86 ^k	49,77 \pm 1,68 ^k	78,12 \pm 1,37 ^k
	2000	33,08 \pm 0,50 ⁱ	57,01 \pm 0,47 ^{gh}	90,09 \pm 0,95 ⁱ
	4000	49,21 \pm 2,32 ^f	58,62 \pm 1,23 ^{fg}	107,83 \pm 3,12 ^f
2	0 (ĐC)	44,07 \pm 1,41 ^{gh}	48,96 \pm 0,46 ^k	93,03 \pm 1,82 ^{hi}
	2000	48,90 \pm 0,50 ^f	47,08 \pm 1,23 ^k	95,98 \pm 1,24 ^h
	4000	54,77 \pm 0,30 ^e	53,79 \pm 1,67 ⁱ	108,56 \pm 1,48 ^f
3	0 (ĐC)	77,46 \pm 0,33 ^c	74,98 \pm 1,61 ^c	152,44 \pm 1,33 ^c
	2000	39,90 \pm 1,08 ^h	54,59 \pm 0,46 ^{hi}	94,49 \pm 0,68 ^{hi}
	4000	48,60 \pm 1,94 ⁱ	62,64 \pm 0,46 ^e	111,24 \pm 2,26 ^{ef}
4	0 (ĐC)	94,73 \pm 9,18^a	93,49 \pm 2,42^a	188,22 \pm 6,91^a
	2000	46,62 \pm 2,22 ^{fg}	61,03 \pm 4,58 ^{ef}	107,65 \pm 6,33 ^{fg}
	4000	47,34 \pm 1,90 ^{fg}	68,27 \pm 2,02 ^d	115,61 \pm 2,46 ^e
5	0 (ĐC)	84,73 \pm 0,64 ^b	89,73 \pm 1,23 ^b	174,46 \pm 0,61 ^b
	2000	59,30 \pm 0,53 ^d	69,08 \pm 1,23 ^d	128,38 \pm 1,49 ^d
	4000	48,42 \pm 0,94 ^{fg}	54,59 \pm 0,46 ^{hi}	103,01 \pm 0,53 ^g

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

Theo bảng 3.12, hàm lượng RA tổng ở tuần 4 đạt cao nhất (188,22 $\mu\text{g/mL}$) với sinh khối thu được nhiều nhất khi huyền phù tế bào được nuôi trong tối.

3.4.2.2 Ảnh hưởng của kích thước cụm tế bào lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp acid rosmarinic của huyền phù tế bào

Các cụm tế bào sau khi phân tách bằng rây có kích thước lỗ 0,125 mm được nuôi trong môi trường lỏng B5 bổ sung glucose 30 mg/L, NAA 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L (Hình 3.17).



Hình 3.17 Huyền phù tế bào với các kích thước cụm tế bào khác nhau. (A) $< 0,125$ mm; (B) $> 0,125$ mm; (C) Không qua rây

Sau 4 tuần nuôi cấy, sinh khối của huyền phù tế bào không qua rây đạt cao nhất (120,53 $\mu\text{g/mL}$) (Bảng 3.13).

Bảng 3.13 Ảnh hưởng của kích thước cụm tế bào lên sự gia tăng sinh khối tế bào Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Kích thước cụm tế bào (mm)	Khối lượng tế bào tươi (mg/mL)
Không qua rây (ĐC)	120,53 ± 7,85^a
>0,125	105,92 ± 11,27 ^a
<0,125	80,16 ± 4,56 ^b

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

Ở bảng 3.14, hàm lượng RA tổng cao nhất (179,12 µg/mL) ở nghiệm thức chứa cụm tế bào không qua rây.

Bảng 3.14 Ảnh hưởng của kích thước cụm tế bào lên hàm lượng RA trong nuôi cấy huyền phù tế bào Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Kích thước cụm tế bào (mm)	Trong sinh khối tế bào (µg/mL)	Trong môi trường lỏng (µg/mL)	Hàm lượng RA tổng (µg/mL)
Không qua rây (ĐC)	91,27 ± 2,42^a	87,85 ± 2,13^a	179,12 ± 3,89^a
>0,125	73,05 ± 1,79 ^b	85,71 ± 2,02 ^a	158,76 ± 0,24 ^b
<0,125	48,57 ± 0,44 ^c	62,11 ± 0,81 ^b	110,68 ± 1,21 ^c

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

3.4.2.3 Ảnh hưởng của nồng độ đường lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp acid rosmarinic của huyền phù tế bào

Sự tăng nồng độ đường dẫn đến sự giảm sinh khối của huyền phù tế bào (Bảng 3.15). Ngược với sinh khối, hàm lượng RA tổng ở các nghiệm thức bổ sung glucose 45 – 75 g/L đều cao hơn so với nghiệm thức bổ sung glucose 30 g/L. Trong đó, môi trường có glucose 45 g/L kích thích sự tổng hợp RA với nồng độ cao nhất (197,61 µg/mL), gấp 1,2 lần so với nghiệm thức có glucose 30 g/L (164,95 µg/mL) (Bảng 3.16).

Bảng 3.15 Ảnh hưởng của glucose lên sự gia tăng sinh khối tế bào Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Glucose (g/L)	Khối lượng tế bào tươi (mg/mL)
30 (ĐC)	126,89 ± 5,91^a
45	118,17 ± 2,07 ^{ab}
60	119,46 ± 5,56 ^{ab}
75	112,60 ± 9,70 ^c

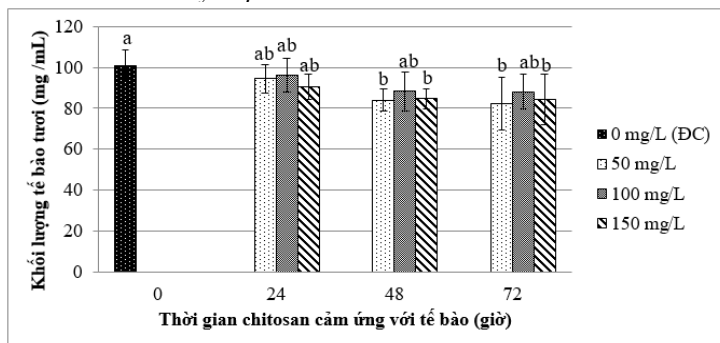
Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$.

Bảng 3.16 Ảnh hưởng của glucose lên hàm lượng RA trong nuôi cấy huyền phù tế bào Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Glucose (g/L)	Trong sinh khối tế bào ($\mu\text{g/mL}$)	Trong môi trường lỏng ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng RA tổng RA ($\mu\text{g/mL}$)
30 (ĐC)	$77,10 \pm 4,76^c$	$87,85 \pm 1,40^b$	$164,95 \pm 6,12^c$
45	$104,12 \pm 1,32^a$	$93,49 \pm 0,81^a$	$197,61 \pm 1,55^a$
60	$102,18 \pm 0,58^a$	$80,08 \pm 2,59^c$	$182,26 \pm 2,56^b$
75	$86,72 \pm 5,34^b$	$96,43 \pm 2,59^a$	$183,15 \pm 5,03^b$

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

3.4.2.4 Ảnh hưởng của chitosan lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp acid rosmarinic của huyền phù tế bào



Hình 3.18 Ảnh hưởng của chitosan lên sự gia tăng sinh khối tế bào Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy và 24; 48; 72 giờ cảm ứng

Bảng 3.17 Ảnh hưởng của chitosan lên hàm lượng RA trong nuôi cấy huyền phù tế bào Xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy và 24; 48; 72 giờ cảm ứng

Thời gian cảm ứng (giờ)	Chitosan (mg/L)	Trong sinh khối tế bào ($\mu\text{g/mL}$)	Trong môi trường lỏng ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng RA tổng ($\mu\text{g/mL}$)
0 (ĐC)	0	$81,04 \pm 1,49^{cd}$	$71,23 \pm 2,33^{abc}$	$152,27 \pm 3,76^c$
	50	$93,14 \pm 1,02^b$	$73,64 \pm 3,05^{ab}$	$166,78 \pm 3,76^b$
24	100	$84,41 \pm 1,76^c$	$68,54 \pm 2,13^{bcd}$	$152,95 \pm 3,64^c$
	150	$83,68 \pm 6,37^{cd}$	$65,59 \pm 3,72^{cde}$	$149,27 \pm 6,42^{cd}$
48	50	$100,99 \pm 1,30^a$	$77,13 \pm 5,93^a$	$178,11 \pm 7,16^a$
	100	$79,89 \pm 2,19^d$	$64,79 \pm 2,32^{de}$	$144,68 \pm 4,20^{de}$
	150	$80,84 \pm 2,04^{cd}$	$60,77 \pm 1,86^{ef}$	$141,60 \pm 2,76^e$
72	50	$66,03 \pm 1,05^f$	$71,76 \pm 5,63^{ab}$	$137,79 \pm 5,53^e$
	100	$72,47 \pm 1,61^e$	$54,60 \pm 2,58^g$	$127,07 \pm 2,22^f$
	150	$69,58 \pm 2,38^{ef}$	$56,47 \pm 2,79^{fg}$	$126,05 \pm 0,599^f$

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

Khi thời gian cảm ứng của tế bào với chitosan (ở tất cả các nồng độ khảo sát) tăng lên, sinh khối tế bào giảm nhưng sự tích lũy RA tăng, đặc biệt là sau 48 giờ cảm ứng. Hàm lượng RA trong sinh khối tế bào cao nhất khi được xử lý với chitosan 50 mg/L trong 48 giờ (Hình 3.18; Bảng 3.17).

3.5 Hoạt tính sinh học của các nguồn mẫu Xạ đen

3.5.1 Hàm lượng acid rosmarinic và hoạt tính kháng oxy hóa

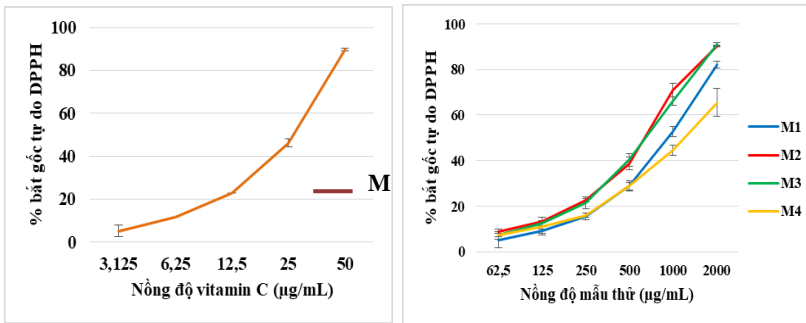
Theo bảng 3.18, hàm lượng RA cao nhất ở lá *in vitro*, tiếp đó là ở mô sẹo từ lá *in vitro* và lá ngoài vườn, thấp nhất là ở sinh khối tế bào huyền phù.

Bảng 3.18 Hàm lượng RA trong các dịch chiết Xạ đen

Dịch chiết	RA (mg/g DW)	
	Phương pháp quang phổ	Phương pháp HPLC
Lá ngoài vườn	40,19 ± 2,06 ^b	89,37 ± 17,86 ^c
Lá <i>in vitro</i>	45,75 ± 2,58 ^a	310,77 ± 11,89 ^a
Mô sẹo từ lá <i>in vitro</i>	40,57 ± 1,27 ^b	153,08 ± 9,18 ^b
Sinh khối tế bào huyền phù	22,39 ± 0,20 ^c	74,64 ± 6,83 ^c

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

Kết quả ở hình 3.19 cho thấy phần trăm bắt gốc tự do DPPH của cao chiết tỉ lệ thuận với nồng độ cao chiết.



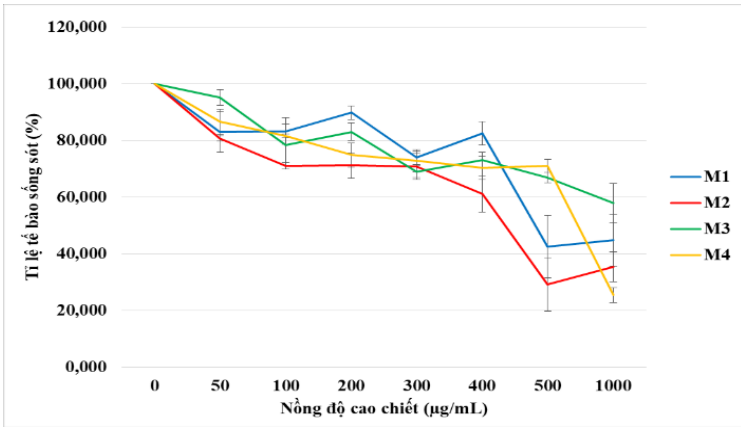
Hình 3.19 Phần trăm bắt gốc tự do DPPH của vitamin C và các cao chiết ở các nồng độ khác nhau. (M0) Vitamin C; (M1) Lá ngoài vườn; (M2) Lá *in vitro*; (M3) Mô sẹo từ lá *in vitro*; (M4) Sinh khối tế bào huyền phù

Bảng 3.19 Giá trị IC₅₀ ức chế DPPH của vitamin C và các cao chiết Xạ đen

Mẫu thử	Vitamin C	Lá ngoài vườn	Lá <i>in vitro</i>	Mô sẹo từ lá <i>in vitro</i>	Sinh khối tế bào huyền phù
IC ₅₀ (µg/mL)	27,62	1099,52	871,54	892,86	1361,64

Theo kết quả ở bảng 3.18 và 3.19, mẫu có hàm lượng RA cao thì cũng cho thấy khả năng kháng oxy hóa cao. Trong đó, mẫu lá *in vitro* có hàm lượng RA cao nhất và khả năng kháng oxy hóa cũng tốt nhất trong các mẫu khảo sát.

3.5.2 Hoạt tính gây độc tế bào



Hình 3.20 Tỷ lệ sống sót của tế bào HEK293 khi bổ sung cao chiết ở các nồng độ khác nhau. (M1) Lá ngoài vườn; (M2) Lá *in vitro*; (M3) Mô sẹo từ lá *in vitro*; (M4) Sinh khối tế bào huyền phù

Bảng 3.20 Giá trị IC_{50} ức chế dòng tế bào HEK293 của các cao chiết Xạ đen

Cao chiết	Lá ngoài vườn	Lá <i>in vitro</i>	Mô sẹo từ lá <i>in vitro</i>	Sinh khối tế bào huyền phù
IC_{50} (µg/mL)	785,05	566,29	1052,08	675,57

Theo kết quả ghi nhận ở hình 3.20 và bảng 3.20, tỷ lệ sống của tế bào HEK293 giảm khi được xử lý với cao chiết ở nồng độ cao. Giá trị IC_{50} ức chế dòng tế bào HEK293 của cao chiết từ lá *in vitro* thấp nhất, tiếp theo là cao chiết từ sinh khối tế bào huyền phù, lá ngoài vườn và giá trị IC_{50} cao nhất ở cao chiết từ mô sẹo có nguồn gốc từ lá *in vitro*.

CHƯƠNG 4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận

Trên cơ sở các kết quả thu được, những kết luận được rút ra, bao gồm:

Môi trường B5 có glucose 30 g/L, agar 7,5 g/L, than hoạt tính 0,5 g/L kết hợp với 2,4-D 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L thích hợp cho nuôi cấy mô sẹo từ lát cắt thân non của Xạ đen ngoài vườn và lá của cây Xạ đen *in vitro*. Mô sẹo từ lát cắt thân non được tạo thành có màu vàng sáng, xốp. Mô sẹo từ lá *in vitro* được tạo thành có màu trắng hoặc vàng nhạt, xốp, được dùng làm nguyên liệu để nuôi cấy huyền phù tế bào.

Thân và lá của cây Xạ đen ngoài vườn, thân và lá của cây Xạ đen *in vitro*, mô sẹo từ lát cắt thân non và lá *in vitro* đều chứa hợp chất phenolic.

Huyền phù tế bào Xạ đen sinh trưởng tốt khi 1 gam mô sẹo xốp có màu trắng đến vàng nhạt (sau 2 lần cấy chuyển) từ lá Xạ đen *in vitro* được nuôi cấy trong 20 mL môi trường B5 lỏng bổ sung glucose 30 g/L, NAA 0,4 mg/L và BA 0,1 mg/L, trên máy lắc tròn với tốc độ lắc 90 vòng/phút, nuôi trong tối. Sinh khối đạt cực đại sau 4 tuần nuôi cấy.

Hàm lượng RA thu được cao nhất ở huyền phù tế bào được nuôi trong môi trường B5 bổ sung glucose 45 g/L, NAA 0,4 mg/L, BA 0,1 mg/L sau 4 tuần và cảm ứng với chitosan 50 mg/L trong 48 giờ (cao gấp 1,17 lần so với nghiệm thức không bổ sung chitosan).

Khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết thử nghiệm được xếp theo thứ tự: cao chiết từ lá *in vitro* ($IC_{50} = 871,54 \mu\text{g/mL}$) > cao chiết từ mô sẹo có nguồn gốc từ lá *in vitro* ($IC_{50} = 892,86 \mu\text{g/mL}$) > cao chiết từ lá ngoài vườn ($IC_{50} = 1099,52 \mu\text{g/mL}$) > cao chiết từ sinh khối tế bào huyền phù ($IC_{50} = 1361,64 \mu\text{g/mL}$). Hàm lượng RA của cao chiết tăng thì khả năng kháng oxy hóa tăng.

Tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc vào nguồn mẫu Xạ đen cũng như nồng độ sử dụng. Giá trị IC_{50} ức chế dòng tế bào HEK293 của cao chiết từ lá ngoài vườn, lá *in vitro*, mô sẹo có nguồn gốc từ lá *in vitro* và sinh khối tế bào huyền phù lần lượt là 785,05; 566,29; 1052,08 và 675,57 $\mu\text{g/mL}$.

4.2 Kiến nghị

Nghiên cứu cải thiện khả năng tích lũy RA trong nuôi cấy huyền phù tế bào Xạ đen với việc sử dụng tiền chất hữu cơ trong con đường sinh tổng hợp RA (phenylalanine, tyrosine) và một số chất kích kháng khác như MeJA, acid salicylic và cao chiết nấm men.

Thử nghiệm nuôi cấy huyền phù tế bào Xạ đen trong bioreactor nhằm hướng đến sản xuất sinh khối tế bào Xạ đen trên quy mô công nghiệp để tạo nguồn nguyên liệu cho các ngành công nghiệp dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hoàng Quỳnh Hoa, Trần Công Khánh, "Đặc điểm thực vật của ba loại cây thuốc thuộc chi Cườm rụng (*Ehretia* P. BR.), họ Vòi voi (Boraginaceae)," *Tạp chí Dược liệu*, vol. 14, no. 3, pp. 137-141, 2009.
- [2] Lê Thế Trung, Nguyễn Liêm, Trần Văn Hanh, "Kết quả nghiên cứu bước đầu về chiết xuất K10 từ cây *Celastrus hindsii* Benth. họ Celastreae," *Kỷ yếu công trình nghiên cứu Y học quân sự, Tạp chí Y dược học Quân sự*, vol. 3, pp. 3-7, 1999.
- [3] Nguyễn Huy Cường, Nghiên cứu thành phần hóa học và thăm dò hoạt tính sinh học cây Xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth. and Hook.) và cây Cườm rụng răng (*Ehretia Dentata* Courch.), Hà Nội: Luận án tiến sĩ, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2008, p. 117.
- [4] Phạm Thị Lương Hằng, Đoàn Thị Duyên, Nguyễn Thị Yến, Ngô Thị Trang, "Phát triển phương pháp khuếch tán - so màu trên đĩa thạch trong sàng lọc và phát hiện các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ các dịch chiết thực vật," *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, vol. 29, no. 2, pp. 10-17, 2013.
- [5] T. N. Ly, M. Shimoyamada, R. Yamauchi, "Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth. leaves and their antioxidative activity," *Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 11, pp. 3786-3793, 2006.
- [6] T. T. Tuan, N. T. K. Loan, P. T. T. Thuy, N. T. T. Hang, N. T. H. Trang,

- N. V. T. Thao, D. D. Giap, N. T. Giang, N. H. Ho, "Quantitative rosmarinic acid content in *ex vitro* plant and initial micropropagation of *Celastrus hindsii*," *Vietnamese Journal of Biotechnology*, vol. 14, pp. 283-290, 2016.
- [7] T. N. Ly, "Separation process of rosmarinic acid and their derivatives from *Celastrus hindsii* Benth. leaves," *Journal of Science and Technology*, vol. 54, no. 2C, pp. 380-387, 2016.
- [8] T. T. Le, T. K. Kang, H. T. Do, T. D. Nghiem, W. B. Lee, S. H. Jung, "Protection against oxidative stress-induced retinal cell death by compounds isolated from *Ehretia asperula*," *Natural Product Communications*, vol. 16, no. 12, pp. 1-7, 2021.
- [9] M. Shekarchi, H. Hajimehdipoor, S. Saeidnia, A. R. Gohari, M. P. Hamedani, "Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family," *Pharmacognosy Magazine*, vol. 8, no. 29, p. 37, 2012.
- [10] R. Bhatt, N. Mishra, P. K. Bansal, "Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid," *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, vol. 2, no. 2, pp. 28-34, 2013.
- [11] M. Nadeem, M. Imran, T. A. Gondal, A. Imran, M. Shahbaz, R. M. Amir, M. W. Sajid, T. B. Qaisrani, M. Atif, G. Hussain, B. Salehi, E. A. Ostrander, M. Martorell, J. Sharifi-Rad, W. C. Cho, N. Martins, "Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review," *Applied Science*, vol. 9, no. 15, p. 3139, 2019.
- [12] S. Gonçalves, A. Romano, "Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools," in *Secondary metabolites - Sources and applications*, IntechOpen, 2018, pp. 81-99.
- [13] H. Riedl, "Boraginaceae," *Flora Malesiana*, vol. 1, no. 13, pp. 91-99, 1997.
- [14] The Asia Foundation, "Medicinal plant index of the Daos in Ba Vi," *Cong ty Truyen thong ICON, Ha Noi*, 2012.
- [15] M. Petersen, Y. Abdullah, J. Benner, D. Eberle, K. Gehlen, S. Hücherig, V. Janiak, K. H. Kim, M. Sander, C. Weitzel, S. Wolters, "Evolution of rosmarinic acid biosynthesis," *Phytochemistry*, vol. 70, pp. 1663-1679, 2009.

- [16] H. Mizukami, T. Ogawa, H. Ohashi, B. E. Ellis, "Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract," *Plant Cell Reports*, vol. 11, no. 9, pp. 480-483, 1992.
- [17] A. Sahraroo, M. H. Mirjalili, P. Corchete, M. Babalar, M. R. Fattahi-Moghadam, A. Zarei, "Enhancement of rosmarinic acid production by *Satureja khuzistanica* cell suspensions: Effects of phenylalanine and sucrose," *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, vol. 50, no. 1, pp. 25-35, 2018.
- [18] T. Biswas, "Elicitor induced increased rosmarinic acid content of *in vitro* root cultures of *Ocimum basilicum* L.(Sweet Basil)," *Plant Science Today*, vol. 7, no. 2, pp. 157-163, 2020.
- [19] L. T. T. Hong, T. V. Minh, "Saponin accumulation in cell suspension culture of *Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi," in *8th International Conference on Advances in Civil, Structural and Environmental Engineering*, Kuala Lumpur, Malaysia, 2019.
- [20] Nguyễn Võ Thu Thảo, Đỗ Đức Thăng, Nguyễn Thị Huyền Trang, Đỗ Đăng Giáp, Nguyễn Hoàng Dũng, Trinh Thị Hương, Trần Trọng Tuấn, "Ảnh hưởng của NAA, môi trường khoáng và nguồn carbohydrate lên nuôi cấy tế bào huyền phù cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.)," *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, vol. 11, pp. 47-55, 2021.
- [21] L. T. T. Tien, T. V. Minh, "Tissue cultures of Xa den (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi)," *Science, An Giang University, Viet Nam*, vol. 3, no. 3, pp. 113-123, 2015.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Tạp chí quốc tế

1. Phạm Thị My Tram, Ngô Ke Suong, Le Thi Thuy Tien, “Rosmarinic acid production of *Ehretia asperula* Zollinger & Moritzi cell suspension cultures: effects of cell aggregate size, glucose, and chitosan”, *Australian Journal of Crop Science*, vol.16, no. 03, pp. 402-407, 2022 (Scopus Q3).
2. Phạm Thị My Tram, Ngô Ke Suong, Le Thi Thuy Tien, “Rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Ehretia asperula* Zollinger & Moritzi”, *Plant Science Today*, vol. 9, no. 1, pp. 70-75, 2022 (Scopus Q3).
3. Phạm Thị My Tram, Ngô Ke Suong, Le Thi Thuy Tien, “Effects of plant growth regulators and sugars on *Ehretia asperula* Zoll. et Mor. cell cultures”, *Indian Journal of Agricultural Research*, vol. 55, no. 4, pp. 410-415, 2021 (Scopus Q3).

Tạp chí trong nước

1. Phạm Thị Mỹ Trâm, Ngô Kế Suong, Lê Thị Thủy Tiên, “Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên quá trình nuôi cấy tế bào Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.)”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Huế*, vol. 129, no. 1A, pp. 31-40, 2020.
2. Phạm Thị Mỹ Trâm, Ngô Kế Suong, Lê Thị Thủy Tiên, “Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng thực vật, môi trường khoáng và pH lên sự hình thành mô sẹo từ lát cắt thân non cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor.)”, *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, vol. 4, no. 2, pp. 458-467, 2020.