

ẢNH HƯỞNG CỦA ÁNH SÁNG LED, CHẤT KÍCH ỨNG ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA CALLUS CÀ GAI LEO (*Solanum hainanense*)

Đoàn Ngọc Hân^{1,2}, Nguyễn Thị Lý Anh^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Phương¹, Nguyễn Văn Trinh³

¹Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ hóa sinh

³Công ty Cổ phần Bóng đèn Phích nước Rạng Đông

*Tác giả liên hệ: ntlanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 14.08.2018

Ngày chấp nhận đăng: 18.03.2019

TÓM TẮT

Cà gai leo (*Solanum hainanense*) là cây dược liệu được đánh giá cao về tác dụng giải độc gan. Trong cây cà gai leo có chứa các chất alkaloid, glycoalkaloid có tác dụng ức chế sự sao chép và làm bất hoạt virus viêm gan B, chống oxy hóa, ngăn ngừa xơ gan hiệu quả. Nuôi cấy callus (mô sẹo) cà gai leo là một phương thức tiềm năng để chủ động tạo nguồn nguyên liệu dược an toàn và chất lượng cao và là mục tiêu của nghiên cứu. Khi nuôi cấy *in vitro* trên môi trường đặc, phổ ánh sáng và các chất kích ứng (chất chiết nấm men và axit salicylic) có tác động rất tích cực đến sự tăng sinh khối và hoạt tính chống oxy hóa của callus cà gai leo. Chiếu sáng bằng đèn LED có phổ ánh sáng Blue/Red: 30/70% đã làm tăng sinh khối khô của callus gấp 2,46 lần so với chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang T8. Khi bổ sung 100 μ M axit salicylic hoặc 3 g/L chất chiết nấm men vào môi trường nuôi cấy làm tăng sinh khối khô của callus lần lượt là 2,43 và 3,04 lần so với đối chứng. Hơn nữa, bổ sung các chất kích ứng làm tăng hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết callus khoảng 1,26-1,49 lần so với dịch chiết từ callus đối chứng và tăng khoảng 2,31-2,73 lần so với dịch chiết từ cây tự nhiên hai năm tuổi. Các kết quả này đóng góp dữ liệu khoa học để phát triển phương pháp nuôi cấy *in vitro* nhằm nâng cao sinh khối và hoạt tính chống oxy hóa của callus cà gai leo và là tiền đề để mở rộng nghiên cứu sang các cây dược liệu khác.

Từ khóa: Cà gai leo, nuôi cấy callus, đèn LED, chất kích ứng, axit salicylic, chất chiết nấm men.

Effect of Light Emitting Diode Lighting and Elicitors on Biomass and Antioxidant Activity of *Solanum hainanense* Calluses

ABSTRACT

Solanum hainanense, a valuable medicinal herb is used for detoxifying and protecting the liver. This plant accumulates different alkaloids and glycol-alkaloids that could inactivate Hepatitis B virus, acting as antioxidant and preventing cirrhosis effectively. Callus culture is a potential method to produce safe and high quality medical materials. Light spectrum and elicitors (yeast extract and salicylic acid) had significantly positive effect on the increase of biomass and antioxidant activity of *Solanum hainanense* callus culture on gel medium. LED lighting with a 30/70% of Blue/Red spectrum increased the dry biomass of calluses by 2.46 times compared with lighting by T8 fluorescence lamps. When adding 100 μ M salicylic acid or 3 g/L yeast extract to the culture medium, the dry biomass of the calluses was 2.43 or 3.04 times higher than the control, respectively. In addition, elicitors increased the antioxidant activity of the callus extract from 1.26 to 1.49 times of that of the control callus extract and increased from 2.31 to 2.73 times compared to the two-year-old natural herbal extracts. These results could serve as the basis for the development of *in vitro* culture system for improving the biomass and antioxidant activity of *Solanum hainanense* calluses and for expanding the research to other medicinal plants.

Keywords: *Solanum hainanense*, callus culture, LED lighting, salicylic acid, yeast extract.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà gai leo (*Solanum hainanense*) là cây được liệu tự nhiên phổ biến ở Việt Nam và được đánh giá cao về tác dụng giải độc gan. Trong cây cà gai leo có chứa các chất alkaloid, glycoalkaloid có tác dụng ức chế sự sao chép và làm bất hoạt virus viêm gan B, chống oxy hóa, ngăn ngừa xơ gan hiệu quả. Cà gai leo là thành phần chính của nhiều loại thuốc điều trị viêm gan (Nguyễn Minh Khai và cs., 2001). Hiện nay cà gai leo chủ yếu được khai thác từ nguồn tự nhiên, chất lượng không đồng đều, trữ lượng có giới hạn và đang cạn kiệt do bị thu hái bừa bãi. Trong khi đó, nuôi cấy *in vitro* để sản xuất sinh khối callus là một phương thức hiệu quả tạo nguyên liệu được an toàn và chất lượng cao (Hussain *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017) sẽ giúp chủ động được nguồn dược liệu cà gai leo, bên cạnh việc xây dựng các vùng trồng cà gai leo theo quy trình sản xuất dược liệu sạch đang được triển khai ở nước ta.

Trong nuôi cấy thực vật *in vitro* ở nước ta hiện nay, đèn huỳnh quang là nguồn chiếu sáng được sử dụng phổ biến. Ánh sáng huỳnh quang là sự phối trộn của nhiều vùng quang phổ có bước sóng từ 320 nm đến 800 nm, trong đó có những vùng bước sóng ngắn không có lợi cho sự sinh trưởng của thực vật. Trong khi đó, nguồn chiếu sáng đơn sắc (LED-Light emitting diodes) đã được sử dụng rộng rãi, hiệu quả trong nhiều lĩnh vực kỹ thuật cao và dân dụng. Do vậy, đèn LED với nhiều ưu điểm vượt trội như: tiêu thụ điện năng thấp, tuổi thọ cao và vùng quang phổ được kiểm soát đã được quan tâm nghiên cứu làm nguồn chiếu sáng trong nuôi cấy mô thực vật (Gupta & Jatothu, 2013). Mặt khác, trong sản xuất *in vitro* sinh khối và hoạt chất trao đổi thứ cấp của tế bào thực vật, việc sử dụng các chất kích ứng (elicitor) để tăng hiệu quả của quá trình nuôi cấy thông qua sự nâng cao hàm lượng các hoạt chất đã được khẳng định (Sharma *et al.*, 2011). Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được tiến hành nhằm làm rõ tác động tích cực của ánh sáng đèn LED, chất chiết nấm men và axit salicylic đến sự tăng trưởng và hoạt tính chống oxy hóa của callus cà gai leo phục vụ hướng sản xuất nguyên liệu được *in vitro*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nuôi cấy callus, điều kiện chiếu sáng và chất kích ứng

Thí nghiệm được tiến hành với callus cà gai leo ổn định sau 2 chu kỳ cấy chuyển với khối lượng tươi trung bình của callus là 250 ± 10 mg/mẫu. Callus được tạo ra bằng nuôi cấy các đoạn thân (0,5-0,7 cm) không mang mầm ngủ của cây *in vitro* 4 tuần tuổi trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng: 1,5 mg/L 2,4D + 0,5 mg/L BA và nhân sinh khối trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4D + 0,1 mg/L BA (Nguyen Hoang Loc *et al.*, 2014; Nguyễn Hữu Thuần Anh, 2016) với chu kỳ cấy chuyển là 3 tuần/lần.

Đèn huỳnh quang T8 và đèn LED dạng ống với phổ chiếu sáng Blue (420 nm) và Red (670 nm) do Công ty Cổ phần bóng đèn và phích nước Rạng Đông cung cấp được sử dụng trong quá trình nuôi cấy callus. Hai loại đèn LED được phối hợp với phổ chiếu sáng Blue/Red theo tỷ lệ 40/60% (B/R:40/60) và Blue/Red theo tỷ lệ 30/70% (B/R:30/70). Đèn huỳnh quang T8 được sử dụng làm đối chứng. Hai chất kích ứng gồm axit salicylic (0-150 μ M) và chất chiết nấm men (Sigma-Aldrich, 0-5 g/L).

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 30 mẫu/công thức. Điều kiện nuôi cấy *in vitro* được duy trì ổn định ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, ẩm độ không khí từ 70-80%, quang chu kỳ 16 giờ sáng/8 giờ tối và cường độ ánh sáng là 56 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$. Môi trường nuôi cấy MS có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng và chất kích ứng tùy từng thí nghiệm được khử trùng ở áp suất 1 atm, 121°C trong 20 phút (Gamborg & Philip, 1995).

2.2. Xác định sự sinh trưởng và hoạt tính chống oxy hóa của callus

Sự sinh trưởng của callus được xác định bằng khối lượng tươi và khối lượng khô của callus sau một chu kỳ nuôi cấy (3 tuần) và so sánh giữa công thức thí nghiệm với công thức đối chứng trong mỗi thí nghiệm riêng biệt để đánh giá mức độ tăng trưởng.

Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của dịch chiết callus và mô thân lá cây tự nhiên được xác định thông qua quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào gan chuột theo phương pháp của Stroev & Makarova (1989). Callus thu được của các công thức thí nghiệm và mô thân lá của cây trồng tự nhiên 2 năm tuổi được sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 50°C và nghiền mịn. Một gam nguyên liệu được chiết trong 10 mL cồn 96% ở 50°C trong 270 phút bằng máy chiết siêu âm Powersonic 410. Lọc lấy dịch thu được sau đó chiết lần 2 trong cồn 70%. Dịch chiết được cô đặc ở 70°C trong 10 phút và cân khối lượng cao thu được, sau đó hòa tan và lên thể tích 2 mL bằng cồn 50%. Dịch chiết này được sử dụng để pha thành các dung dịch có nồng độ khác nhau dùng trong thí nghiệm.

Khối lượng 100 mg gan tươi của chuột nhắt trắng (chủng Swiss albino) khoẻ mạnh (5-6 tuần tuổi) được nghiền đồng thể trong cối sứ ở điều kiện 4°C với 5 mL đệm Tris 0,04 M, pH = 7,4 và 10 mL H₂O. Ly tâm ở 600 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó lấy 3 mL dịch ly tâm cho vào hỗn hợp gồm: 0,4 mL FeSO₄ 10⁻³ M; 0,4 mL dung dịch axit ascorbic 10⁻² M và dịch chiết callus hoặc dịch chiết thân lá cà gai leo tự nhiên với nồng độ tùy từng công thức thí nghiệm. Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 1 giờ, sau đó lấy hỗn hợp ủ ra và thêm 2 mL dung dịch axit thiobacbituric 0,25%. Đun sôi cách thủy 15 phút, để nguội và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 532 nm bằng máy Spectro UV- 2505 (Labomed, Inc.). Các số liệu kết quả thí nghiệm được biểu thị bằng trị số trung bình của 3 lần đo khác nhau. Phần trăm (%) hoạt tính chống oxy hóa được đo bằng công thức sau: $HTCO\% = [(ODC - ODT) / ODC] \times 100$, trong đó ODC là mật độ quang của mẫu đối chứng (không bổ sung dịch chiết cà gai leo); ODT là mật độ quang của mẫu thí nghiệm.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phân tích ANOVA một nhân tố theo chương trình Microsoft Excel 2010. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được so sánh bằng đa biến độ Duncan với độ tin cậy 95%. Độ biến động của chỉ tiêu theo dõi được biểu hiện qua chỉ số CV(%).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của chiếu sáng LED đến khả năng nhân sinh khối callus

Khi nhân sinh khối callus cà gai leo, chiếu sáng bằng đèn LED (tỉ lệ B/R: 40/60 và 30/70) có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng của callus (Bảng 1 và Hình 1). Trên cả 2 công thức chiếu sáng LED sinh khối khô callus thu được đều tăng so với đối chứng nuôi cấy ở điều kiện chiếu sáng đèn huỳnh quang mặc dù khối lượng tươi của chúng thấp hơn so với đối chứng. Chiếu sáng đèn LED có tỉ lệ B/R: 30/70 cho sinh khối khô callus thu được cao nhất (61,6 mg/mẫu); trong khi chiếu sáng đèn huỳnh quang chỉ số này là 25,04 mg/mẫu. Đặc điểm của callus ở hai công thức chiếu sáng bằng đèn LED là không mọc nước, chắc và hóa xanh nhiều.

Nguyên nhân của sự sai khác này là bởi ánh sáng xanh (B) và ánh sáng đỏ (R) là phổ ánh sáng phù hợp cho hoạt động quang hợp và cảm ứng phát sinh hình thái của thực vật nên làm tăng đáng kể hiệu quả của hoạt động quang hợp và sự tích lũy chất khô của callus (Gupta & Jatothu, 2013). Tuy nhiên, tỷ lệ giữa B/R phù hợp với mỗi loại mẫu cấy cũng như mỗi loại thực vật là khác nhau. Kết quả nghiên cứu thu được trên cây sâm Việt Nam *Panax vietnamensis* (Nhut *et al.*, 2015) cho thấy chiếu sáng bằng đèn LED B/R:40/60 đã làm tăng khối lượng tươi và khô của callus so với chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang. Nhưng với cây thông đỏ *Taxus wallichiana*, chỉ khi chiếu sáng bằng đèn LED 100% B khối lượng tươi của callus đạt được mới cao hơn so với chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang (Nhut *et al.*, 2014).

Hơn thế, sử dụng phổ ánh sáng LED với vai trò elicitor phi sinh học để cảm ứng tổng hợp và tích lũy các hoạt chất sinh học trong tế bào, mô thực vật nuôi cấy *in vitro* và *in vivo* đã được nghiên cứu làm rõ cơ chế và hiệu quả tác động (Hansan *et al.*, 2017). Khi chiếu sáng bằng đèn LED B/R:20/80 đã làm tăng sự tích lũy hoạt chất thứ cấp ginsenoside MR2 trong callus sâm Việt Nam (Nhut *et al.*, 2015). Nuôi cấy *in vitro* cây thuốc *Myrtus communis* dưới các phổ sáng LED khác nhau (B 100%, R 100% và B/R 30/70%) so với đối chứng là đèn huỳnh quang,

Cioć *et al.* (2017) đã khẳng định hàm lượng hoạt chất thứ cấp myricetin trong mô lá đạt cao nhất khi chiếu sáng 100% ánh sáng đỏ. Nghiên cứu sự biểu hiện của một số gen sinh tổng hợp flavonoid ở cây xà lách (*Lactuca sativa* L.) dưới tác động của ánh sáng LED đơn sắc, các tác giả Nhật Bản nhận thấy: LED đỏ (R) và xanh lá cây (G) làm giảm hoạt động của các gen *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL), *CHS*, *flavonoid 3-hydroxylase* (F3H), *dihydroflavonol 4-reductase* (DFR), *anthocyanidin synthase* (ANS) và *UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase* (UGT). Trong khi đó, hoạt động của các gen này lại được tăng cường khi chiếu sáng LED xanh (B) so với đối chứng chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang (Kitazaki *et al.*, 2018). Trên cơ sở các công bố này, chúng tôi đang tiếp tục tiến hành đánh giá tác động của

chiếu sáng LED đến hoạt tính oxy hóa của callus cà gai leo nhằm làm rõ hơn nữa hiệu quả của chiếu sáng LED.

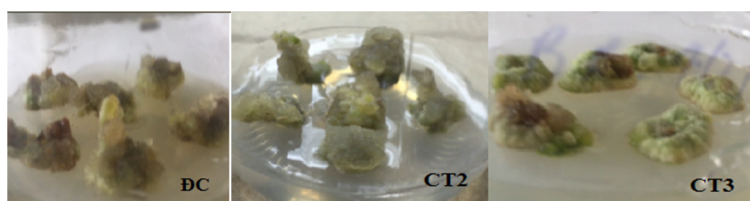
3.2. Ảnh hưởng của acid salicylic đến khả năng nhân sinh khối callus

Kết quả thí nghiệm cho thấy axit salicylic khi bổ sung với nồng độ từ 50-150 μM kích thích sinh trưởng callus cà gai leo (Bảng 2 và Hình 2). Sinh khối tươi và khô tăng mạnh so với đối chứng. Ở công thức bổ sung 100 μM axit salicylic, sinh khối callus thu được cao nhất, đạt 59,53 mg/mẫu. Sinh khối callus bắt đầu giảm khi tăng nồng độ axit salicylic lên 150 μM . Ở công thức này khối lượng khô của callus đạt 55,86 mg/mẫu, bằng 2,28 lần so với công thức đối chứng.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chiếu sáng LED đến sự tăng trưởng của callus
(sau 3 tuần nuôi cấy)

Công thức thí nghiệm	Loại đèn chiếu sáng	Khối lượng tươi TB (mg/mẫu)	% so với đối chứng	Khối lượng khô TB (mg/mẫu)	% so với đối chứng
CT1 (ĐC)	Huỳnh quang T8	646,75 ^a	100	25,04 ^c	100
CT2	LED B/R: 40/60	492,85 ^c	76,20	53,38 ^b	213,18
CT3	LED B/R: 30/70	597,23 ^b	92,34	61,63 ^a	246,13
CV%		3,18		1,87	

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu ở $P < 0,05$ (Duncan's test)



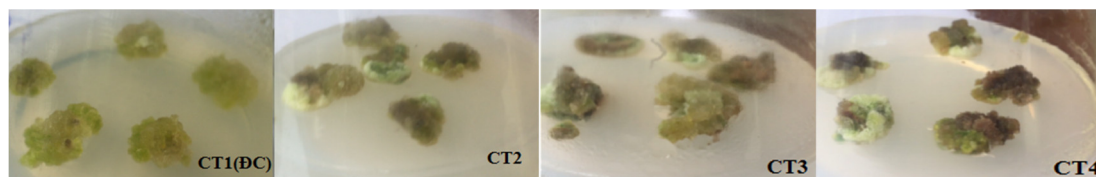
Hình 1. Ảnh hưởng của chiếu sáng LED đến sự tăng trưởng của callus

Bảng 2. Ảnh hưởng của axit salicylic đến sự tăng trưởng của callus (sau 3 tuần nuôi cấy)

Công thức thí nghiệm	Nồng độ axit salicylic (μM)	Khối lượng tươi TB (mg/mẫu)	% so với đối chứng	Khối lượng khô TB (mg/mẫu)	% so với đối chứng
CT1 (ĐC)	0	646,74 ^d	100	24,44 ^d	100
CT2	50	780,03 ^b	120,61	48,87 ^c	199,96
CT3	100	841,36 ^a	130,09	59,53 ^a	243,57
CT4	150	736,62 ^c	113,90	55,86 ^b	228,60
CV%		1,15		2,44	

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu ở $P < 0,05$ (Duncan's test)

Ảnh hưởng của ánh sáng led, chất kích ứng đến sinh trưởng và hoạt tính chống oxy hóa của callus cà gai leo (*Solanum hainanese*)

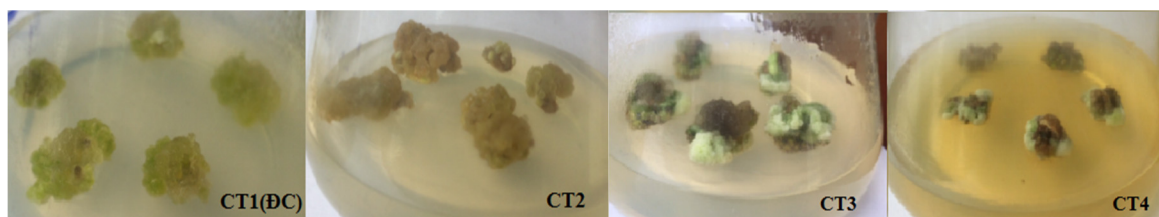


Hình 2. Ảnh hưởng của axit salicylic đến tăng trưởng callus

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất chiết nấm men đến sự tăng trưởng của callus (sau 3 tuần nuôi cấy)

Công thức thí nghiệm	Nồng độ chất chiết nấm men (g/L)	Khối lượng tươi TB (mg/mẫu)	% so với đối chứng	Khối lượng khô TB (mg/mẫu)	% so với đối chứng
CT1 (ĐC)	0	646,74 ^c	100	24,44 ^d	100
CT2	1	1071,44 ^b	165,67	50,59 ^b	206,99
CT3	3	1094,66 ^a	169,26	74,40 ^a	304,42
CT4	5	495,38 ^d	76,60	38,61 ^c	157,98
CV%		1,42		3,32	

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu ở $P < 0,05$ (Duncan's test)



Hình 3. Ảnh hưởng của chất chiết nấm men đến tăng trưởng callus

Axit salicylic là một loại hợp chất phenol có chức năng như một phytohormone. Trong một số công trình nghiên cứu được công bố, việc xử lý elicitor bằng axit salicylic sẽ ức chế sự sinh trưởng của tế bào *Taxus chinensis* (Yu *et al.*, 2001); *Centella asiatica* (Loc *et al.*, 2012). Nhưng tác động của axit salicylic trong khoảng nồng độ thử nghiệm của chúng tôi (50-150 μ M) lại tăng cường sinh trưởng callus cà gai leo so với đối chứng. Đây là phản ứng khác biệt của mô và tế bào cà gai leo nuôi cấy *in vitro* đối với axit salicylic. Điều này cũng đã được xác nhận bởi Nguyễn Hữu Thuận Anh (2016) khi sử dụng axit salicylic làm chất kích ứng trong nuôi cấy huyền phù tế bào cà gai leo. Theo tác giả này đã công bố: trong khoảng nồng độ 50-200 μ M axit salicylic làm tăng sinh khối tế bào và chỉ khi nồng độ axit salicylic là 250 μ M sinh khối tế bào mới tương đương với đối chứng không xử lý. Đồng thời, axit salicylic ở nồng độ 50-250 μ M

đều tăng cường sự tích lũy solasodine, một steroid alkaloid của cà gai leo và là hợp chất chính có tác dụng dược lý. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy axit salicylic không chỉ tăng trưởng sinh khối tế bào callus mà còn có thể tăng cường sự tích lũy hợp chất thứ cấp dẫn đến tăng hoạt tính chống oxy hóa của callus cà gai leo (Bảng 4).

3.3. Ảnh hưởng của chất chiết nấm men đến khả năng nhân sinh khối callus

Chất chiết nấm men là hợp chất hữu cơ giàu axit amin, vitamin, khoáng chất... đã được rất nhiều tác giả sử dụng trong nuôi cấy thực vật *in vitro* (Sharma *et al.*, 2011). Việc bổ sung chất chiết nấm men với hàm lượng phù hợp vào môi trường nuôi cấy thường làm phong phú thêm thành phần dinh dưỡng của môi trường và tăng cường sự sinh trưởng của mô nuôi cấy.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất kích ứng đến hoạt tính oxy hóa của callus

Loại mẫu	Nồng độ cà gai leo (mg/100 mL)	HTCO (%)
ĐC (+)	0	0,00 ^e
Thân, lá cây tự nhiên (2 năm tuổi)	20	14,82 ^d
Callus trên môi trường không bổ sung chất kích ứng	20	27,16 ^c
Callus trên môi trường bổ sung 100 μ M axit salicylic	20	34,25 ^b
Callus trên môi trường bổ sung 3 g/L chất chiết nấm men	20	40,42 ^a
CV%		2,55

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu ở $P < 0,05$ (Duncan's test)

Callus cà gai leo tăng trưởng mạnh trên môi trường có bổ sung chất chiết nấm men với nồng độ từ 1-5 g/L (Bảng 3). Sinh khối khô của callus ở các công thức thí nghiệm đều tăng so với đối chứng và ở công thức bổ sung 3 g/L chất chiết nấm men, sinh khối tươi và khô callus thu được cao nhất. Điều đáng quan tâm là khi bổ sung nồng độ 5 g/L chất chiết nấm men, mặc dù sinh khối khô cao hơn đối chứng nhưng sinh khối tươi của callus chỉ bằng 76,6% so với đối chứng. Callus ở công thức này rắn chắc, kích thước nhỏ và bắt đầu có sự già hóa (Hình 3, CT4). Như vậy, nồng độ chất chiết nấm men 5 g/L đã làm giảm sự sinh trưởng callus cà gai leo sau 3 tuần nuôi cấy. Những kết quả trên phù hợp với kết luận của Nguyễn Hữu Thuần Anh (2016) khi sử dụng chất chiết nấm men trong nuôi cấy huyền phù tế bào cà gai leo. Theo tác giả này, nồng độ chất chiết nấm men từ 1-5 g/L kích thích sinh khối tươi tăng mạnh so với đối chứng nhưng sinh khối khô chỉ tăng nhẹ và ở nồng độ 4-5 g/L sinh khối khô của tế bào giảm so với đối chứng.

3.4. Ảnh hưởng của chất kích ứng đến khả năng chống oxy hóa của callus

Cà gai leo được khẳng định là dược liệu giải độc, bảo vệ gan rất hiệu quả (Nguyễn Thị Minh Khai và cs., 2001). Phần lớn các chất gây độc cho gan đều tham gia vào quá trình peroxide hóa lipid màng tế bào gan. Để đánh giá tác dụng được lý này của callus cà gai leo, hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của dịch chiết callus nuôi cấy trên các môi trường khác nhau đã được xác

định thông qua sự hình thành malonyl dialdehyde (MDA) là sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào gan chuột. Kết quả trình bày ở bảng 4 chỉ rõ: dịch chiết callus nuôi trên môi trường có bổ sung chất kích ứng (elicitor) có hoạt tính chống oxy hóa đạt 1,26-1,49 lần so với dịch chiết callus nuôi trên môi trường không bổ sung elicitor. Hơn nữa, dịch chiết loại callus này cũng có hoạt tính chống oxy hóa gần bằng 2 lần so với dịch chiết thân lá cây cà gai leo hai năm tuổi (Bảng 4).

Hoạt tính chống oxy hóa của callus cà gai leo được quyết định bởi sự hình thành và tích lũy các hợp chất thứ cấp thuộc nhóm glycoalkaloid, đặc biệt là solasodine trong callus. Khi bổ sung elicitor vào môi trường nuôi cấy không chỉ làm tăng sinh khối mà còn tăng vượt trội hàm lượng solasodine của tế bào (Nguyễn Hoàng Loc *et al.*, 2014; Nguyễn Hữu Thuần Anh, 2016). Do đó, đây chính là cơ sở khoa học của sự nâng cao hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết callus nuôi trên môi trường có bổ sung elicitor. Kết quả này một lần nữa khẳng định vai trò quan trọng của các chất kích ứng trong tạo sinh khối và hoạt chất thứ cấp thực vật bằng công nghệ nuôi cấy mô, tế bào *in vitro*.

4. KẾT LUẬN

Khi nuôi cấy *in vitro* trên môi trường đặc, phổ ánh sáng LED và các chất kích ứng (chất chiết nấm men và axit salicylic) có tác động rất tích cực đến sự tăng sinh khối và hoạt tính

chống oxy hóa của callus cà gai leo. Chiếu sáng bằng đèn LED có phổ ánh sáng Blue/Red: 30/70% đã làm tăng sinh khối khô của callus gấp 2,46 lần so với chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang T8. Khi bổ sung 100 μ M axit salicylic hoặc 3 g/L chất chiết nấm men vào môi trường nuôi cấy làm tăng sinh khối khô của callus lần lượt là 2,43 và 3,04 lần so với đối chứng. Hơn nữa, bổ sung các chất kích ứng làm tăng hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết callus từ 1,26-1,49 lần so với dịch chiết từ callus đối chứng và tăng từ 2,31-2,73 lần so với dịch chiết từ thân lá cây tự nhiên hai năm tuổi. Các kết quả này là cơ sở khoa học để phát triển phương pháp nuôi cấy *in vitro* nhằm nâng cao sinh khối và hoạt tính chống oxy hóa của callus cà gai leo và là tiền đề để mở rộng nghiên cứu sang các cây dược liệu có giá trị khác.

LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn TS. Đỗ Thị Gấm - Viện nghiên cứu Đào tạo và Tư vấn KHCN - đã hướng dẫn chúng tôi thực hiện nội dung xác định hoạt tính chống oxy hóa của callus cà gai leo trong bài báo này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Hữu Thuần Anh (2016). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số elicitor lên khả năng tích lũy solasodine ở tế bào *in vitro* của cây cà gai leo (*Solanum hainanense* Hance). Luận án tiến sĩ Sinh lý học thực vật. Trường đại học Khoa học, Đại học Huế.

Cioć Monika, Agnieszka Szewczyk, Marek Żupnik, Andrzej Kalisz & Bożena Pawłowska (2018). LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult. 132: 433-447.

Gamborg O.L. & Philip G.C. (1995). Plant cell, tissue and organ culture. Pub. Springer. pp. 37-39.

Gupta S.D. & Jatothu B. (2013). Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. Plant Biotechnol Rep. 7: 211-220.

Hasan Md. Mohidul, Tufail Bashir, Ritesh Ghosh, Sun Keun Lee & Hanhong Bae (2017). An Overview of LEDs' Effects on the Production of Bioactive Compounds and Crop Quality. Molecules. 22(9): 1420; <https://doi.org/10.3390/molecules22091420>.

Hussain Sarfaraj Md., Sheeba Fareed, Saba Ansari, Md. Akhlaquer Rahman, Iffat Zareen Ahmad & Mohd. Saeed (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. J Pharm Bioallied Sci. 4(1): 10-20.

Nguyễn Minh Khai, Phạm Kim Mẫn, Nguyễn Bích Thu, Vũ Kim Thu, Phạm Thanh Trúc, Lê Kim Oanh, Nguyễn Văn Mùi, Trịnh Thị Xuân Hòa, Nguyễn Đình Mão (2001). Nghiên cứu điều chế thuốc Haina điều trị viêm gan B mạn hoạt động từ cà gai leo. Tạp chí Dược liệu. 6(2): 68-71.

Loc N. & Giang N. (2012). Effects of elicitors on the enhancement of asiaticoside biosynthesis in cell cultures of centella (*Centella asiatica* L. Urban). Chemical Papers, 66(7): 642-648.

Nguyen Hoang Loc, Nguyen Huu Thuan Anh, Le Thi Minh Khuyen & Ton Nu Thuy An (2014). Effects of yeast extract and methyl jasmonate on the enhancement of solasodine biosynthesis in cell cultures of *Solanum hainanense* Hance. J. BioSci. Biotech. 3(1): 1-6.

Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth bio assays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473-479.

Nhut D.T., Nguyen P.L.H., Don N.T., Hien N.T.T., Huy N.P., Nam N.B., Vinh B.T. & Luan T.C. (2014). Induction, growth and paclitaxel content of needle and petiole-derived calli in Himalayan Yew (*Taxus wallichiana* Zucc.) under light-emitting diodes. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 56/2:107-114.

Nhut D.T., N.P. Huy, N.T. Tai, N.B. Nam, V.Q. Luan, V.T. Hien, H.T. Tung, B.T. Vinh & T.C. Luan (2015). Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 29(2): 299-308.

Sharma M., Sharma A., Kumar A. & Kumar S.B. (2011). Enhancement of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells Through Stress Stimulus. American Journal of Plant Physiology. 6(2): 50-71.

Stroev E. A. & Makarova V. G., (1989). Determination of lipid peroxidation rate in tissue homogenate laboratory. In: Laboratory Manual in Biochemistry, Mir Publishers, Moscow. pp. 243 -256.

WangJuan, Jian-liLi, JingLi, Jin-xinLi, Shu-jieLiu, Lu-qiHuang & Wen-yuan Gao (2017). Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. Chinese Herbal Medicines. 9(2): 115-125

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): 477-482.