KHẢO SÁT SỰ SINH TRƯỞNG, KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA VÀ HÀM LƯỢNG PHENOLIC CỦA CÂY XẠ ĐEN (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.) *IN VITRO* DƯỚI TÁC ĐỘNG CỦA ĐÈN LED

Trần Thị Mỹ Trâm[1], Trịnh Thị Hương[2], Lê Quỳnh Loan[1], Nguyễn Hoàng Dũng[1], Trần Trọng Tuấn[1*]

[1]*Viện Sinh học Nhiệt đới*

[2]*Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM*

*Email: *trantrongtuan.com@gmail.com*

Ngày nhận bài: 26/4/2018; Ngày chấp nhận đăng: 24/8/2018

TÓM TẮT

Cây xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.) có chứa các hợp chất như flavonoid, saponin triterpenoid, quinon. Nghiên cứu này tìm hiểu vai trò của kinetin đối với khả năng tạo chồi từ mẫu cấy đốt thân *ex vitro* và ảnh hưởng của đèn LED (light emtting diodes) lên sự sinh trưởng và khả năng kháng oxy hóa, hàm lượng phenolic của mẫu cao chiết cây xạ đen nuôi cấy *in vitro*. Các mẫu chồi xạ đen *ex vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung KIN ở nồng độ 3,0 mg/L đạt tỷ lệ mẫu cấy hình thành chồi là 100%, số chồi hình thành đạt 1,57 chồi/mẫu. Các mẫu chồi cây xạ đen *in vitro* đạt chiều cao khoảng 2,0 cm được nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, được đặt dưới các điều kiện ánh sáng khác nhau, bao gồm: 100% LED đỏ, 100% LED xanh, ánh sáng LED đỏ và LED xanh kết hợp với tỷ lệ 50:50, 70:30, đèn growth light và đèn huỳnh quang được sử dụng làm mẫu đối chứng. Sau 4 tuần nuôi cấy, cây xạ đen *in vitro* nuôi cấy dưới ánh sáng của đèn growth light có khối lượng tươi, chiều cao cây và số lá thu được cao nhất (tương ứng 1,57 g, 4,46 cm và 9,11 lá). Đồng thời, các mẫu chồi nuôi cấy dưới ánh sáng đèn growth light có hàm lượng phenolic (81,06 mg GAE/g cao chiết) và khả năng kháng oxy hóa (IC_{50} là 0,1166 mg/L) cao hơn so với các thí nghiệm còn lại. Ngoài ra, mẫu cao chiết xạ đen có sự hiện diện của các nhóm hợp chất thứ cấp khác như carbohydrate, protein-amino acid, chất béo.

Từ khóa: Hoạt tính kháng oxy hóa, hàm lượng phenolic, *in vitro*, sinh trưởng, xạ đen.

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu cho thấy các loại cây dược liệu có khả năng kháng oxy hoá như sâm Ngọc Linh, lan thạch hộc, cây ngũ sắc (*Lantana camara*) [1-3]. Cây xạ đen phân bố nhiều ở khu vực Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam, được xem là dược liệu quý có chứa các chất như: flavonoid, saponin triterpenoid, quinon. Theo Đông y, cây xạ đen có vị đắng chát, tính hàn, có tác dụng hữu hiệu trong điều trị mụn nhọt, ung thũng, tiêu viêm, giải độc, giảm tiết dịch trong xơ gan cổ chướng. Năm 2006, Ly *et al.* đã công bố phát hiện mới về khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá xạ đen [4]. Cao chiết methanol 50% của lá xạ đen khô chứa các hợp chất phenolic gồm rutin, kaempferol 3-rutinoside, rosmarinic acid, lithospermic acid, lithospermic acid B và ba oligomer mới của rosmarinic acid, một dimer và hai trimer. Các chất này có khả năng kháng quá trình oxy hóa các gốc tự do rất mạnh. Lê Thị Huyền và ctv đã nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào của xạ đen trong việc kháng tế bào

ung thư phổi và ung thư gan ở người [5]. Kết quả cho thấy 3 chất được phân lập từ xạ đen gồm: 5α-olean-12-en-3β-ol (β-Amyrin); β-Amyrin-3-O-succinate; 6-methoxy-2,2-dimethyl-5-nitrogen-2H-chromen-7-ol đều có tác dụng với dòng tế bào ung thư phổi ở mức vừa phải.

Ánh sáng là một trong những yếu tố môi trường thiết yếu cho sự phát triển và đóng vai trò điều tiết quá trình phát triển và trao đổi chất của thực vật. Các nguồn sáng thông dụng như đèn huỳnh quang, đèn natri áp suất cao và bóng đèn được sử dụng cho trồng trọt trong điều kiện môi trường có kiểm soát. Trong những năm gần đây, các nguồn sáng truyền thống được thay thế bằng các đèn LED (Light emitting diode). Đèn LED là một nguồn năng lượng đầy hứa hẹn cho công nghệ nuôi cấy mô với khả năng nâng cao quá trình tăng trưởng sinh học nhờ vào kích thước nhỏ, cấu trúc rắn, an toàn, ít tỏa nhiệt, tuổi thọ cao. Ánh sáng đơn sắc bao gồm các bước sóng có lợi cho quá trình quang hợp, từ đó ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái và tích lũy các hợp chất có hoạt tính sinh học. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng cũng như tích luỹ hợp chất thứ cấp của một số loài cây đã được nghiên cứu. Nghiên cứu của Manivanna *et al.* đã cho thấy ánh sáng xanh thúc đẩy sự sinh trưởng, hàm lượng hợp chất thứ cấp và đặc biệt là khả năng kháng oxy hoá của cây địa hoàng (*Rehmannia glutinosa*) nuôi cấy *in vitro* [6]. Nghiên cứu của Dong *et al.* cũng đã cho thấy sự tác động của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng, sinh khối, khả năng kháng oxy hoá của cây lúa mì (*Triticum aestivum* L.) [7].

Hiện nay, các nghiên cứu về khả năng kháng oxy hóa, kháng tế bào ung thư… cũng đã được thực hiện, tuy nhiên vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về nguồn dược liệu *in vitro*. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp xác định hoạt tính bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) để khảo sát khả năng kháng oxy hóa của các mẫu cây xạ đen *in vitro* khi nuôi cấy dưới các nguồn ánh sáng đơn sắc khác nhau, nhằm thu được sản phẩm có sản lượng cao và hoạt tính tốt, phục vụ cho mục đích dược và mỹ phẩm. Kết quả này mở ra xu hướng nghiên cứu mới và là tiền đề cho các nghiên cứu về việc sử dụng nguồn dược liệu trong phòng thí nghiệm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu này là các chồi cây xạ đen nuôi cấy *in vitro* đạt chiều cao 2,0 cm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của kinetin đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen

Các mẫu đốt thân xạ đen *ex vitro* được khử trùng bằng thủy ngân clorua ($HgCl_2$) 1‰ trong 10 phút theo phương pháp của Tran Trong Tuan *et al.* [8]. Các mẫu sống và không nhiễm sau 1 tuần nuôi cấy, được cấy chuyển sang môi trường Murashige và Skoog (MS) [9] có bổ sung 8 g/L agar (Công ty Việt Xô, Việt Nam), 30 g/L đường sucrose và kinetin (KIN) ở các nồng độ lần lượt là 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 và 5,0 mg/L.

Sau 4 tuần nuôi cấy, tiến hành lấy số liệu các chỉ tiêu sau tỷ lệ mẫu hình thành chồi, số chồi phát sinh/mẫu, chiều cao chồi.

2.2.2. Ảnh hưởng của đèn LED đến sự sinh trưởng cây xạ đen nuôi cấy in vitro

Các mẫu chồi *in vitro* có chiều cao 2,0 cm thu nhận ở thí nghiệm trên được cấy vào bình thủy tinh 500 mL chứa 50 mL môi trường nuôi cấy. Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm là môi trường khoáng cơ bản MS đã được điều chỉnh không bổ sung chất điều hòa

sinh trưởng thực vật của Tran Trong Tuan *et al.*, pH môi trường được điều chỉnh ở khoảng 5,7-5,8 và được hấp khử trùng ở 121 ^{o}C, 1 atm trong 20 phút. Mỗi nghiệm thức cấy 3 bình, mỗi bình cấy 5 mẫu, kết quả là trị số của 3 lần lặp lại.

Bình nuôi cấy được đặt dưới 6 điều kiện chiếu sáng khác nhau:

+ FL: Ánh sáng đèn huỳnh quang (Philip, 36W, 1,2 m) với cường độ ánh sáng là 18 ± 2 µmol m^{-2} s^{-1}

+ GL: Ánh sáng đèn growth light: LED dạng tuýp 1,2 m (Trung Quốc); tỷ lệ đèn 70% LED đỏ kết hợp với 30% LED xanh với cường độ ánh sáng là 18 ± 2 µmol m^{-2} s^{-1}.

Hệ thống đèn LED panel được thiết kế dựa vào sự kết hợp giữa bóng đèn LED xanh có bước sóng 450-470 nm và bóng LED đỏ có bước sóng 650-665 nm trên một bảng mạch có kích thước 10 x 50 cm. Mỗi bảng mạch gồm 480 bóng LED, số bóng các loại thay đổi theo tỷ lệ kết hợp giữa LED đỏ và LED. Cường độ ánh sáng được đo bằng máy LI-250A (LI-COR®, Mỹ).

+ R: 100% ánh sáng LED đỏ (480 bóng LED đỏ) với cường độ ánh sáng là 16 ± 2 µmol m^{-2} s^{-1}.

+ B: 100% ánh sáng LED xanh (480 bóng LED đỏ) với cường độ ánh sáng là 16 ± 2 µmol m^{-2} s^{-1}.

+ 50R:50B: 50% ánh sáng LED đỏ (240 bóng LED đỏ) + 50% ánh sáng LED xanh (240 bóng LED xanh) với cường độ ánh sáng là 14 ± 2 µmol m^{-2} s^{-1}.

+ 70R:30B: 70% ánh sáng LED đỏ (336 bóng LED đỏ) + 30% ánh sáng LED xanh (144 bóng LED xanh) với cường độ ánh sáng là 14 ± 2 µmol m^{-2} s^{-1}.

Mẫu cấy được nuôi trong điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày nhiệt độ nuôi cấy 24 ± 2 ^{o}C.

Theo dõi kết quả sau 4 tuần nuôi cấy dựa trên chỉ tiêu sau: Chiều cao cây (đo từ gốc đến đỉnh sinh trưởng của cây), số lá/cây, khối lượng tươi, khối lượng khô.

2.2.3. Định lượng hàm lượng phenolic có trong mẫu cấy

Tiến hành theo phương pháp Folin-Ciocalteu và có sửa đổi theo Singleton *et al.* [10].

Chuẩn bị thuốc thử Folin-Ciocalteu loãng, dùng pipet chuyển 100 µL thuốc thử Folin-Ciocalteu (10X) vào ống falcon 15 mL và pha loãng mẫu theo tỷ lệ (1:10).

Chuẩn bị dung dịch natri carbonate 7,5% (w/v): Cân 37,50 g natri carbonate khan (Na_2CO_3) cho vào bình định mức 500 mL, thêm nước ấm đến nửa bình, lắc đều để hòa tan natri carbonate, để nguội đến nhiệt độ phòng, pha loãng bằng nước đến vạch định mức và tiếp tục lắc đều.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc gallic acid, tương đương với gallic acid khan nồng độ 1000 µg/mL: Cân 0,110 g gallic acid ngậm nước (M = 188,14) cho vào bình định mức 100 mL, lắc đều để hòa tan gallic acid trong nước, pha loãng đến vạch định mức và tiếp tục lắc đều cho đến khi hòa tan hoàn toàn.

Pha loãng dung dịch gallic acid theo các nồng độ 0, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL để xây dựng đường chuẩn.

Dùng pipet hút 100 µL dung dịch gallic acid lần lượt theo các nồng độ 0, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL và các mẫu dịch chiết được pha loãng ở các nồng độ 1,0; 0,5; 0,25 mg/mL vào các ống eppendorf, sau đó tiếp tục hút 500 µL dung dịch thuốc thử Folin vào và ủ trong buồng tối 4-5 phút. Sau đó, hút 400 µL dung dịch Na_2CO_3 vào mỗi ống, đậy nắp và lắc đều.

Ủ ở nhiệt độ phòng 60 phút trong điều kiện tối, sau đó hút 200 µL bơm vào các giếng. Đo mẫu ở bước sóng 765 nm. ΔOD được tính theo công thức ΔOD = OD(Mẫu) - OD(Đối chứng).

Hàm lượng phenolic tổng số được tính dựa trên đồ thị đường chuẩn, được biểu thị bằng mg đương lượng gallic acid (GAE) trong 1,0 g cao chiết.

2.2.4. Định tính một số nhóm hợp chất thứ cấp có trong mẫu xạ đen in vitro

Chuẩn bị dịch chiết: Bột mẫu xạ đen khô có khối lượng 5g được chiết bằng dung môi methanol (3 lần, mỗi lần 30 mL) [11]. Lọc, thu dịch và cô quay dịch chiết đến khi còn thể tích khoảng 50 mL. Dịch chiết cô đặc được dùng để định tính các nhóm hợp chất: Alkaloid, carbohydrates, glycosides, protein và amino acids, dầu và chất béo, phenolic và tannins.

Định tính alkaloid: Hút 10 mL dịch chiết cô đặc vào ống nghiệm. Định tính alkaloid bằng thuốc thử Wagner, kết tủa màu đỏ nâu xuất hiện chứng tỏ có sự hiện diện của alkaloid.

Định tính carbohydrate: Hút 5 mL dịch chiết cô đặc vào ống nghiệm, cho thêm 1,0 mL dung dịch Fehling A ($CuSO_4$) và 1,0 mL dung dịch Fehling B (hỗn dịch của NaOH với muối tartrate của Na và K có công thức NaOOC-CHOH-CHOH-COOK), đun cách thủy hỗn hợp. Nếu có kết tủa đỏ gạch dưới đáy ống nghiệm chứng tỏ có sự hiện diện của carbohydrate.

Định tính glycosides: Hút 2,0 mL dịch chiết cô đặc vào ống nghiệm, cho thêm 3,0 mL chloroform và lắc đều. Hỗn hợp dung dịch tách thành 2 lớp: lớp có màu trắng trong suốt và lớp có màu xanh đục. Tiếp tục cho thêm 10% dung dịch ammoniac vào, lớp dung dịch trắng trong suốt chuyển sang màu hồng chứng tỏ có sự hiện diện của glycosides.

Định tính protein và amino acid: Hút 2,0 mL dịch chiết cô đặc vào ống nghiệm, thêm 1,0 giọt dung dịch đồng sunfate, tiếp tục cho 1,0 mL ethanol (95%) vào. Hỗn hợp dung dịch xuất hiện màu hồng cho thấy có sự hiện diện của protein.

Định tính chất béo (spot test): Hút vài giọt dịch cô đặc lên giấy thấm, tại nơi nhỏ dịch chiết có vệt dầu trên giấy cho thấy sự hiện diện của chất béo.

Định tính phenolic và tannin: Hút vài giọt dung dịch $FeCl_3$ 5% vào dịch cô đặc, lắc đều. Hỗn hợp dung dịch có màu xanh đậm cho thấy có sự xuất hiện của phenolic.

2.2.5. Khảo sát khả năng kháng oxy hoá của mẫu cao chiết cây xạ đen in vitro

Mẫu cây xạ đen được đem sấy khô, sau đó cân 5 g bột mẫu cây xạ đen, đem mẫu khô chiết với methanol [12]. Cô quay ở 40 °C để đuổi hết dung môi, và thu được cao chiết methanol. Cao chiết này được dùng để khảo sát hoạt tính ức chế gốc tự do. Sau đó, cao chiết được pha loãng trong methanol thành dãy 5 nồng độ tùy theo mẫu khảo sát. Dung dịch ascorbic acid 200 µg/mL được sử dụng làm chất đối chứng dương; methanol là chất đối chứng âm [13].

Chuẩn bị đĩa 96 giếng, mỗi giếng nạp 100 µL mẫu thử hoặc chất đối chứng và 100 µL dung dịch DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 300 µM. Trộn đều và ủ ở 37 °C trong 30 phút. Sau đó, đo mật độ quang học bằng máy Bio-rad Benchmark plus (Bio-rad, Mỹ) ở bước sóng λ = 517 nm.

Hoạt tính ức chế gốc tự do của mẫu được tính theo công thức:

$$\text{Hoạt tính ức chế gốc tự do (\%)} = [1- \frac{\text{OD (mẫu)}}{\text{OD (đối chứng)}}] \times 100$$

Dựa trên đường tuyến tính hoạt tính ức chế gốc tự do và nồng độ mẫu khảo sát, xác định được nồng độ mẫu có hoạt tính ức chế gốc tự do đạt 50% (IC_{50} (mg/mL)).

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử bằng phần mềm Microsoft Excel 2007 và phần mềm SPSS 16.0 với phép thử Duncan $p \leq 0,05$ [14].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của kinetin đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen

Sau 4 tuần nuôi cấy, ảnh hưởng của kinetin lên khả năng khởi tạo chồi từ mẫu cấy đốt thân cây xạ đen được ghi nhận ở Bảng 1.

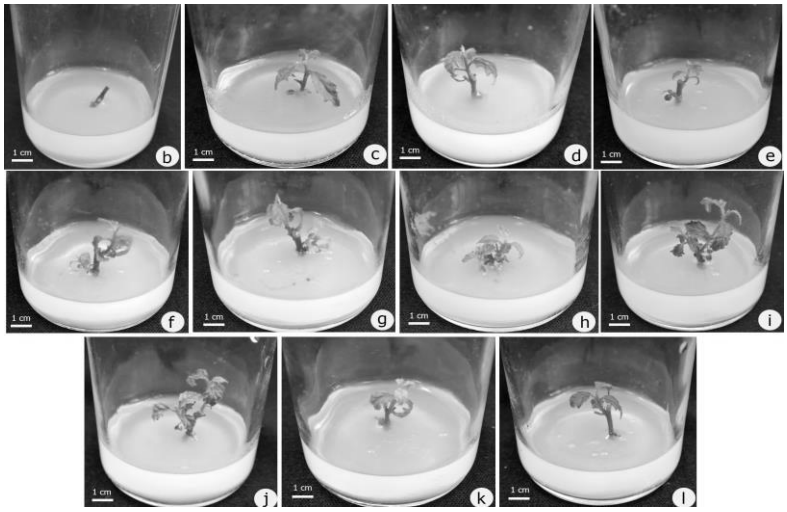
Bảng 1. Ảnh hưởng của kinetin đến quá trình khởi tạo chồi cây xạ đen *in vitro*

Nghiệm thức	Nồng độ KIN (mg/L)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
1	0,0	13,33^{b}	0,13^{d}	0,03^{h}
2	0,5	100,00^{a}	1,00^{c}	0,80^{e}
3	1,0	100,00^{a}	1,10^{c}	0,90^{d}
4	1,5	100,00^{a}	1,17^{bc}	0,98^{c}
5	2,0	100,00^{a}	1,23^{bc}	1,02^{c}
6	2,5	100,00^{a}	1,33^{b}	1,28^{b}
7	3,0	100,00^{a}	1,57^{a}	1,37^{a}
8	3,5	100,00^{a}	1,27^{b}	0,97^{d}
9	4,0	100,00^{a}	1,20^{b}	0,75^{e}
10	4,5	100,00^{a}	1,10^{bc}	0,62^{f}
11	5,0	100,00^{a}	1,00^{c}	0,37^{g}

$^{a,b,c,...}$: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Kết quả thể hiện ở Bảng 1 cho thấy, KIN có hiệu quả cao trong việc tạo chồi cây xạ đen với tỷ lệ mẫu cấy hình thành chồi đạt 100%. Ngược lại, nghiệm thức không bổ sung kinetin cho kết quả tạo chồi thấp và tỷ lệ mẫu cấy tạo chồi chỉ đạt 13,33%. Miller *et al.* cho rằng cytokinin tác động đến quá trình hình thành chồi thông qua sự kiểm soát các quá trình tổng hợp một số loại protein [15]. Khi thêm cytokinin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy sẽ làm thay nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh có trong cây, đồng thời thiết lập một khuynh độ nồng độ chất điều hòa sinh trưởng nội sinh mới. Điều này giúp phá vỡ trạng thái ngủ và kích thích sự phát triển chồi. Số chồi trung bình hình thành/mẫu và chiều cao chồi tăng dần khi nồng độ KIN tăng và đạt cao nhất ở nồng độ KIN là 3,0 mg/L (1,57 chồi/mẫu và chiều cao chồi trung bình đạt 1,37 cm). Ở các nghiệm thức sử dụng 0,5-2,5 mg/L KIN, các chỉ tiêu theo dõi có sự khác biệt về mặt thống kê, khi tăng nồng độ KIN thì số lượng chồi và chiều cao chồi tăng. Ở nghiệm thức sử dụng nồng độ KIN cao, vượt quá 3,5 mg/L (từ 3,5 mg/L đến 5 mg/L) thì chỉ tiêu tỷ lệ hình thành chồi vẫn đạt 100%, tuy nhiên, chỉ tiêu số chồi/mẫu và chiều cao chồi trung bình giảm dần. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Huyền Trang và Lê Thị Thủy Tiên trên cây salem tím (*Limonium sinuatum* L. Mill) cho thấy, KIN thích hợp cho sự tạo chồi ở loài cây này [16]. Các mẫu cây đạt tỷ lệ tạo chồi cao nhất (86,67%) trên môi trường MS có bổ sung 4,0 mg/L KIN.

Các nghiệm thức MS có bổ sung KIN đều có khả năng kích thích tạo cụm chồi, đặc biệt là ở nghiệm thức 3,0 mg/L KIN có số chồi đạt cao nhất là 1,57 chồi/mẫu. Nhưng hình thái mẫu cho thấy các môi trường bổ sung KIN ở nồng độ cao (> 2 mg/L) có hiện tượng các đầu lá bị cong.



Hình 1. Ảnh hưởng của KIN đến quá trình khởi tạo chồi; b: Đối chứng MS; c: 0,5 mg/L KIN; d: 1,0 mg/L KIN; e: 1,5 mg/L KIN; f: 2,0 mg/L KIN; g: 2,5 mg/L KIN; h: 3,0 mg/L KIN; i: 3,5 mg/L KIN; j: 4,0 mg/L KIN; k: 4,5 mg/L KIN; l: 5,0 mg/L KIN.

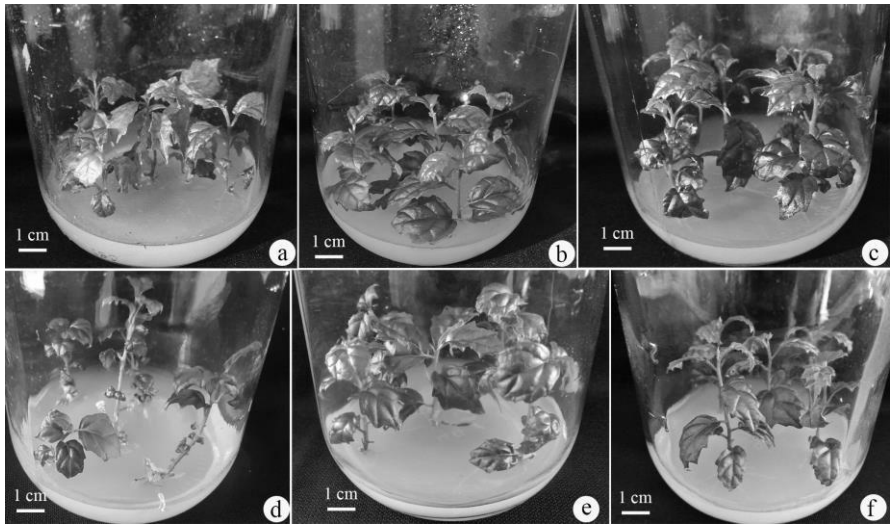
3.2. Ảnh hưởng của đèn LED lên sự sinh trưởng cây xạ đen nuôi cấy *in vitro*

Trong nghiên cứu này, các chồi cây xạ đen *in vitro* có kích thước khoảng 2,0 cm được nuôi cấy trên môi trường tạo cây hoàn chỉnh dưới 6 loại ánh sáng khác nhau. Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về khối lượng khô của cây xạ đen được nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau. Tuy nhiên, các chỉ tiêu sinh trưởng khác như: chiều cao cây, số lá, khối lượng tươi lại có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê giữa các mẫu cây xạ đen được đặt dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau. Các mẫu chồi xạ đen được đặt dưới ánh sáng đèn growth light (có sự kết hợp của tỷ lệ 70% đèn LED đỏ kết hợp với 30% LED xanh dạng tuýp dài 1,2 m) đạt được các chỉ tiêu như chiều cao cây (4,46 cm), số lượng lá (9,11) và khối lượng tươi (1,57 g) cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Tương tự, ở nghiệm thức 70R:30B cũng thu được các chỉ tiêu chiều cao cây và số lá cao nhất, riêng chỉ tiêu khối lượng tươi ở nghiệm thức này thấp hơn so với nghiệm thức đèn growth light (Bảng 2). Khi nghiên cứu trên đối tượng dâu tây nuôi cấy *in vitro*, Nhut *et al.* cũng cho thấy cây dâu tây phát triển tốt nhất khi được đặt dưới nguồn chiếu sáng đèn LED với tỷ lệ 70% ánh sáng đỏ kết hợp với 30% ánh sáng xanh [17]. Ở nghiệm thức sử dụng đèn LED có tỷ lệ kết hợp giữa 50% ánh sáng đỏ và 50% ánh sáng xanh, cây xạ đen sinh trưởng kém nhất. Các kết quả này cho thấy, sự phối trộn tỷ lệ ánh sáng LED thích hợp có thể thúc đẩy sự sinh trưởng của cây trồng. Ngoài ra, đèn LED còn có ưu điểm là kích thước nhỏ, an toàn, tuổi thọ cao và tiết kiệm điện năng, do đó ánh sáng đèn LED là một nguồn năng lượng đầy triển vọng cho các phòng nuôi cấy mô thực vật.

Bảng 2. Ảnh hưởng của đèn LED lên sự sinh trưởng của chồi xạ đen *in vitro*

Nghiệm thức	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Khối lượng tươi (g)
FL	$3,92^{b}$	$7,38^{b}$	$0,74^{c}$
GL	$4,46^{a}$	$9,11^{a}$	$1,57^{a}$
R	$3,94^{b}$	$7,24^{b}$	$0,86^{c}$
B	$3,79^{b}$	$9,33^{a}$	$0,81^{c}$
50R:50B	$3,25^{c}$	$7,62^{b}$	$0,82^{c}$
70R:30B	$4,26^{a}$	$8,76^{a}$	$1,09^{b}$

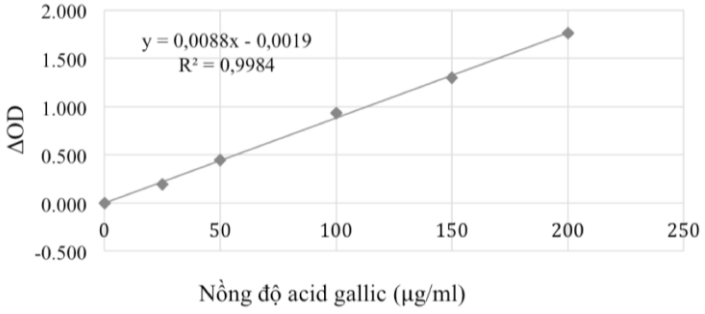
$^{a,b,c\cdots}$: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 2. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng khác nhau đến sinh trưởng của cây xạ đen.
a) Sử dụng đèn huỳnh quang; b) Sử dụng đèn LED xanh; c) Sử dụng đèn LED đỏ; d) Sử dụng 50% LED đỏ + 50% LED xanh; e) Sử dụng 70% LED đỏ + 30% LED xanh; f) Sử dụng growth light.

3.3. Định lượng hàm lượng phenolic có trong mẫu cao chiết cây xạ đen *in vitro*

Sau khi xác định được vai trò của các điều kiện chiếu sáng khác nhau, kết quả cho thấy đèn growth light và đèn LED có tỷ lệ kết hợp là 70% ánh sáng đỏ kết hợp với 30% ánh sáng xanh cho sự sinh trưởng tốt hơn các nghiệm thức còn lại. Các mẫu cấy của 2 nghiệm thức này và nghiệm thức sử dụng ánh sáng đèn huỳnh quang được sử dụng để định lượng hàm lượng hợp chất thứ cấp có trong mẫu, ở đây là hàm lượng phenolic tổng số. Hàm lượng phenolic tổng số được tính dựa theo biểu đồ đường chuẩn acid gallic theo phương pháp Folin-Ciocalteu (Hình 3).



Hình 3. Đường chuẩn acid gallic theo phương pháp Folin-Ciocalteu.

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, sự tổng hợp phenolic trong cây ở nghiệm thức chiếu sáng bằng đèn growth light (21,82 mg GAE/g cao chiết) và đèn LED 70R:30B (21,82 mg GAE/g cao chiết) đều cao hơn so với nghiệm thức đèn huỳnh quang (17,74 mg GAE/g cao chiết), sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa $p < 0,05$. Trong những nghiên cứu gần đây về việc cảm ứng tăng hoạt tính sinh học ở các loài thực vật bằng cách sử dụng hệ thống đèn LED cũng đã được báo cáo. UV-A được chứng minh là có thể cảm ứng tích lũy anthocyanin ở cây nho và xà lách [18, 19]. Ánh sáng xanh kích thích tăng hàm lượng anthocyanin ở cà chua [20]. Ngoài ra, Qian và Kubata đã chứng minh rằng hợp chất phenolic của lá rau diếp cũng tăng 6% dưới ánh sáng đỏ [21].

Bảng 3. Hàm lượng phenolic tổng số ở các điều kiện chiếu sáng khác nhau

Nghiệm thức	Hàm lượng phenolic trong mẫu (mg GAE/g cao chiết)
FL	$17,74^{c}$
GL	$81,06^{a}$
70R:30B	$21,82^{bc}$

$^{a,b,c...}$: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Bên cạnh việc xác định hàm lượng phenolic, một số nhóm hợp chất thứ cấp cũng được định tính nhằm so sánh sự khác nhau giữa nghiệm thức sử dụng đèn huỳnh quang và nghiệm thức sử dụng đèn growth light (GL). Kết quả phân tích được trình bày trong Bảng 4, mẫu cao chiết methanol được xác định có chứa các hợp chất thứ cấp sau: Alkaloid, carbohydrate, glycoside, protein - amino acid, chất béo và hợp chất phenolic - tannin.

Bảng 4. Thành phần một số nhóm hợp chất thứ cấp có trong cây xạ đen *in vitro*

Chỉ tiêu	Thuốc thử	Kết quả*	
		ĐC	GL
Alkaloid	Wagner's	++	+
Carbohydrate	Fehling's	+++	+++
Glycosides	Borntrager's	-	-
Protein và amino acid	Biuret's	++	++
Chất béo	Spot	+++	+++
Phenolic và tannin	Ferric chloride	++	+++

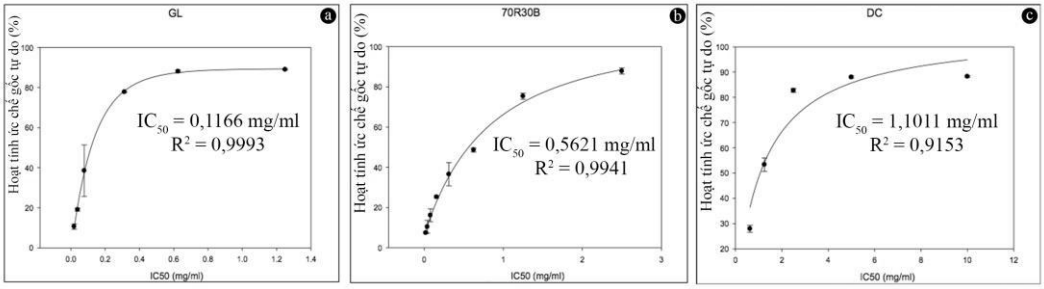
* (-): không có; (+): có mặt; (++): rõ; (+++): rất rõ

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, thành phần hóa học của cao chiết methanol khá đa dạng, 5 trong tổng số 6 nhóm hoạt chất được kiểm tra có phản ứng dương tính với các loại thuốc thử. Trong đó, ở cả 2 nghiệm thức ĐC và GL, các nhóm hợp chất alkaloid, carbohydrate, phenolic và tanin có phản ứng dương tính rõ nhất; tiếp đến là nhóm chất béo, nhóm hợp chất protein và amino acid. Các mẫu cao chiết methanol của cả 2 nghiệm thức đều không có sự xuất hiện phản ứng dương tính với nhóm chất glycosides.

3.4. Khả năng kháng oxy hóa của mẫu cao chiết cây xạ đen *in vitro*

Cao chiết methanol thu nhận được từ mẫu cây xạ đen nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau (đèn growth light, đèn LED có tỷ lệ kết hợp 70R:30B và đèn huỳnh quang làm đối chứng) được dùng để khảo sát hoạt tính ức chế gốc tự do theo phương pháp DPPH. Từ đường tuyến tính hoạt tính ức chế gốc tự do tính được giá trị IC_{50} của các mẫu cần khảo sát (Hình 2). Kết quả nghiên cứu ở Hình 4 cho thấy, khi sử dụng các nguồn ánh sáng đơn sắc thì mẫu thu được cho hoạt tính kháng oxy hóa tốt hơn so với khi chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang. Các số liệu này góp phần chứng minh hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu xạ đen *in vitro* thay đổi dưới các điều kiện ánh sáng đèn khác nhau. Kết quả về khả năng kháng oxy hóa đạt được cao nhất là ở điều kiện chiếu sáng 70% ánh sáng đỏ kết hợp với 30% ánh sáng xanh đạt giá trị IC_{50} là 0,1166 mg/L cao hơn 9,44 lần so với cây được nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng huỳnh quang (IC_{50} = 1,1011 mg/mL) và nghiệm thức sử dụng ánh sáng đỏ và xanh kết hợp với tỷ lệ 70:30 (IC_{50} = 0,5621 mg/mL) cao hơn 1,96 lần so với nghiệm thức đối chứng. Nghiên cứu của Lee *et al.* trên đối tượng lúa mạch cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa của lúa mạch

cũng khá nhạy với ánh sáng, những mẫu được nuôi dưới điều kiện có sử dụng nguồn sáng xanh cho hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn những loại ánh sáng LED khác [22].



Hình 4. Sự tương quan giữa khả năng kháng oxy hóa và nồng độ mẫu ở các nghiệm thức khác nhau; a. Growth light (GL); b. 70% LED đỏ: 30% LED xanh (70R30B); c. Đối chứng (DC)

4. KẾT LUẬN

Các mẫu chồi xạ đen nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung KIN ở nồng độ 3,0 mg/L đạt tỷ lệ mẫu cấy hình thành chồi là 100%, số chồi hình thành đạt 1,57 chồi/mẫu. Đèn growth light thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển cây xạ đen nuôi cấy *in vitro* với chiều cao cây đạt 4,46 cm/cây, số lá đạt 9,11 lá, khối lượng tươi đạt 1,57 g, khối lượng khô đạt 0,31 g. Đồng thời, các mẫu chồi nuôi cấy dưới ánh sáng đèn growth light có hàm lượng phenolic (81,06 mg GAE/g cao chiết) và khả năng kháng oxy hóa (IC_{50} là 0,1166 mg/L) cao hơn so với các thí nghiệm còn lại.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng Thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật và Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Quốc gia khu vực phía Nam về tế bào thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới đã tạo điều kiện về cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Huong N.T.T., Matsumoto K., Kasai R., Yamasaki K., and Watanabe H. - *In vitro* antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components, Biological and Pharmaceutical Bulletin **21** (9) (1998) 978-981.
2. Tuan T.T., Thien N.S., Nguyen H.C., Nguyen D.H., Loan L.Q., Thai T.D., Trang N.T.H., Dung N.H., Giap D.D., Du T.X., Huong T.T. and Truong D.H. - Evaluation of changes in shoot proliferation and chemical components of *in vitro* cultured *Dendrobium officinale* due to organic additives, Journal of Applied Horticulture **20** (1) (2018) 41-45.
3. Badakhshan M.P., Subramanion L.J., Lachimanan Y.L., Yeng C., and Sreenivasan S. - Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine **2** (12) (2012) 960–965.
4. Ly T.N., Shimoyamada M., and Yamauchi R. - Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity, Journal of Agricultural and Food Chemistry **54** (2006) 3786-3793.
5. Lê Thị Huyền, Phạm Huyền Trang, Nguyễn Đình Chung, Nguyễn Văn Đậu. - Hoạt tính độc tế bào của cây xạ đen và cây bông ổi – Cytotoxity of *Celastrus hindsii* Benth *et* Hookand and *Lantana camara* L., Hội nghị Khoa học và Công nghệ hóa hữu cơ Toàn quốc lần thứ IV (2007) 624-627.

6. Manivannan A., Soundararajan P., Halimah N., Ko C.H., and Jeong B.R. - Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*, Horticulture, Enviroment, and Biotechnology **56** (1) (2015) 105-113.
7. Dong C., Fu Y., Liu G., and Liu H. - Growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity and biomass yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) exposed to LED light sources with different spectra combinations, Journal of Agronomy and Crop Science **200** (2014) 219-230.
8. Tran Trong Tuan, Nguyen Thi Kim Loan, Pham Thi Thanh Thuy, Nguyen Thi Thu Hang, Nguyen Thi Huyen Trang, Nguyen Vo Thu Thao, Do Dang Giap, Nguyen Truong Giang, Nguyen Huu Ho. - Quantitative rosmarinic acid content in "xạ đen" plant (*Celastrus hindsii*) *ex vitro* and initial micropropagation of *Celastrus hindsii*, Journal of Biotechnology **14** (1A) (2016) 283-290.
9. Murashige T. and Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiologia Plantarum **15** (1962) 473-497.
10. Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventós R.M. - Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, Methods in Enzymology **229** (1999) 152-178.
11. Kokate C.K. - Practical pharmacognosy, 4th Edn., New Delhi: Vallabh Prakashan (2008) 107-111.
12. Fukumoto L.R. and Mazza G. - Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry **48** (2000) 3597-3604.
13. Duncan D.B. - Multiple range and multiple F test, Biometrics **11** (1995) 1-42.
14. Blois M.S. - Antioxidant determination by the use of a stable free radical, Nature **181** (1958) 1199-1200.
15. Miller C.O., Skoog F., Okumura C.S., von Saltza M.H. and Strong F.M. - Structure and synthesis of kinetin, Journal of the American Chemical Society **77** (1955) 2662-2663.
16. Nguyễn Thị Huyền Trang và Lê Thị Thủy Tiên - Tăng hệ số nhân nhanh chồi cây hoa salem tím (*Limonium sinnuatum* L. Mill) bằng cách sử dụng kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng thực vật và adenine trong nuôi cấy *in vitro*, Tạp chí Sinh học **34** (3se) (2012) 219-226.
17. Nhut D.T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto K., and Tanaka M. - Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs), Plant Cell Tissue and Organ Culture **73** (1) (2003) 43-52.
18. Kataoka I., Sugiyama A., and Beppu K. - Role of ultraviolet radiation in accumulation of anthocyanin in berries of 'Gros Colman' grapes (*Vitis vinifera* L.), Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **72** (2003) 1-6.
19. Tibbitts T.W., Morgan D.C., and Warrington J.J. - Growth of lettuce, spinach, mustard and wheat plants under four combinations of light-pressure sodium, metal halide and tungsten halogen lamp at equal PPFD, Jounal for the American Society for Horticultural Science **108** (1983) 622-630.
20. Giliberto L., Perrotta G., Pallara P., Weller J.L., Fraser P.D., Bramley P.M., Fiore A., Tavazza M., and Giuliano G. - Manipulation of the blue light photoreceptor crytochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content, Plant Physiology **137** (2005) 199-208.

21. Qian L., Kubota C. - Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce, Environmental and Experimental Botany **67** (2009) 59-64.

22. Lee N.Y., Lee M.J., Kim Y.K., Park J.C , Park H.K., Choi J.S., Hyun J.N., Kim K.J., Park K.H., Ko J.K., and Kim J.G. - Effect of light emitting diode radiation on antioxidant activity of barley leaf, Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry **53** (2010) 658-690.

ABSTRACT

THE EFFECTS OF LIGHT EMITTING DIODE ON GROWTH, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL PHENOLIC CONTENT OF *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. CULTURED *IN VITRO*

Tran Thi My Tram[1], Trinh Thi Huong[2], Le Quynh Loan[1],
Nguyen Hoang Dung[1], Tran Trong Tuan[1*]
[1]*Institute of Tropical Biology, VAST*
[2]*Ho Chi Minh City University of Food Industry*
*Email: *trantrongtuan.com@gmail.com*

Ehretia asperula Zoll. & Mor. contains compounds such as flavonoid, saponin triterpenoid, quinon. In this paper, the effects of kinetin on the shoot formation derived from *ex vitro* shoot and effect LED (Light emitting diode) on the growth plant, antioxidant activity, and total phenolic content were studied. *Ex vitro*-derived nodes were cultured on MS medium supplemented with KIN at a concentration of 3.0 mg/L, the shoot formation ratio (100%) and shoots per explant (1.57 shoots/explant) were the highest one. The *Ehretia asperula* shoots of 2,0 cm high were cultured in MS medium without plant growth regulators, and incubated under six different lighting conditions: monochromatic red LED (R), monochromatic blue LED (B), red and blue LED mixtures (50R:50B, 70R:30B), growth light and fluorescent lamp light (control experiment). After 4 weeks of culture, *in vitro* plants cultured under the growth light condition reached the highest level of fresh weight, plant height and leaf number (1.57 g, 4.46 cm and 9.11 leaves, respectively). In addition, the explants cultured under the growth light conditions showed antioxidant capacity (IC_{50} = 0.1166 mg/mL) and total phenolic content (81,06 mg GAE/g extract) higher than those cultured under other light conditions. Besides, there are many secondary compounds such as carbohydrate, protein - amino acid, lipid in extract of *E. asperula* plant.

Keywords: Antidioxidant activity, phenolic content, in vitro, growth, *Ehretia asperula.*