

ẢNH HƯỞNG CỦA ELICITOR ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ HÀM LƯỢNG PHENOLIC TỔNG SỐ CỦA CÂY LAN GẮM (*Anoectochilus roxburghii*) NUÔI CÂY *IN VITRO*

Trịnh Thị Hương^{1*}, Phạm Văn Lộc¹, Trương Thị Thanh Ngân¹, Huỳnh Thị Cẩm Tiên², Trần Trọng Tuấn³

¹Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Lan gấm (*Anoectochilus roxburghii*) là một cây thân thảo không chỉ có giá trị dược liệu mà còn được sử dụng làm cây hoa để trưng bày, trang trí. Trong nghiên cứu này, năm loại elicitor được khảo sát nhằm đánh giá khả năng gia tăng sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số trong cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*. Kết quả thu được cho thấy, cao nấm men (4 mg/L) giúp cải thiện sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm. Sau 8 tuần nuôi cấy, khối lượng khô và hàm lượng phenolic tổng số thu nhận được lần lượt là 0,084 g và 7,23 mg GAE/mg DW. Salicylic acid không có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của cây lan gấm, nhưng giúp gia tăng hàm lượng phenolic tổng số ở nồng độ 2 mg/L. Sau 8 tuần nuôi cấy, khối lượng khô và hàm lượng phenolic tổng số thu nhận được lần lượt là 0,093 g và 7,04 GAE/mg DW. Chitosan, abscisic acid và methyl jasmonate không thích hợp để bổ sung vào môi trường nuôi cấy cây lan gấm. Trong đó, chitosan cải thiện một số chỉ tiêu sinh trưởng (SPAD, chiều cao cây) nhưng hàm lượng phenolic tổng số giảm; abscisic acid giúp gia tăng hàm lượng phenolic tổng số nhưng lại ức chế sự sinh trưởng của cây; methyl jasmonate ức chế cả sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số. Các kết quả này chỉ ra rằng, các elicitor có tác động khác nhau đến sự trưởng và hàm lượng phenolic tổng số ở cây lan gấm. Việc xác định được loại elicitor với nồng độ thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy sẽ cải thiện được cả sự tích lũy sinh khối và hàm lượng hợp chất thứ cấp trong cây, từ đó gia tăng hiệu suất nuôi cấy sinh khối các loài cây dược liệu.

Từ khóa: Abscisic acid, cao nấm men, cây lan gấm, chitosan, methyl jasmonate, salicylic acid.

MỞ ĐẦU

Chi lan gấm (*Anoectochilus*) là một trong những cây dược liệu thuộc họ Orchidaceae. Tại Việt Nam, hiện thống kê được 12-15 loài, trong đó *Anoectochilus roxburghii* là loài có giá trị dược liệu cao, theo Đông y, lan gấm có tác dụng tăng cường sức khỏe, chữa các bệnh như viêm phế quản, viêm gan mãn tính, suy nhược thần kinh, đau nhức xương khớp. *A. roxburghii* có chứa hợp chất phenolic và các hợp chất khác như polysaccharide, triterpenoide, amino acid... (Xi, Wang, 2013). Các hợp chất phenolic được coi là có nhiều chức năng, chẳng hạn như loại bỏ oxy hoạt tính, ngăn ngừa xơ cứng mạch máu, cải thiện dinh dưỡng cho mô, chống lão hóa và ngăn ngừa chứng mất trí do lão hóa (Chen *et al.*, 2015).

Trong tự nhiên, lan gấm thường sống ở nơi ẩm ướt, mọc rải rác trong rừng sâu, tái sinh chậm và thường xuyên bị nhiều sâu bệnh hại. Do có nhiều đặc tính dược liệu mà số lượng quần thể lan gấm hoang dại bị khai thác quá mức làm suy giảm nghiêm trọng phạm vi phân bố và có nguy cơ bị tuyệt chủng nếu không có biện pháp bảo tồn hiệu quả. Chính vì thế, hiện nay các nghiên cứu về nuôi cấy *in vitro* cây lan gấm đang được quan tâm. Kỹ thuật nuôi cấy này đang được sử dụng rộng rãi để nhân giống, bảo tồn các loài cây quý hiếm cũng như ứng dụng trong nuôi cấy thu nhận sinh khối các loài cây dược liệu nhằm thu nhận được nguồn sinh khối dược liệu một cách chủ động trong thời gian ngắn mà không phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên. Việc nuôi cấy *in vitro* tế bào thực vật mang lại hiệu suất về sinh khối cao trong môi trường giàu dinh dưỡng, nhưng nhiều hợp chất thứ cấp ở thực vật được sản sinh ra thông qua cơ chế phòng vệ trước những tác động bất lợi của môi trường. Do đó, trong nhiều trường hợp hàm lượng các hợp chất thứ cấp trong sinh khối mô tế bào thực vật nuôi cấy thấp hơn nhiều so với cây trồng ở điều kiện tự nhiên.

Các nghiên cứu nhằm cải thiện hàm lượng các hợp chất thứ cấp tập trung vào nhiều khía cạnh khác nhau như: nghiên cứu các con đường truyền tín hiệu sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp; tác nhân phiên mã và cơ chế điều hòa của chúng (Memelink *et al.*, 2001), cải tiến quy trình nuôi cấy, sử dụng các elicitor, stress phi sinh học. Elicitor (chất kích kháng) là các chất có trọng lượng phân tử nhỏ thường liên quan đến phản ứng phòng vệ của thực vật bằng cách kích hoạt chuỗi tín hiệu (Patel *et al.*, 2020); được phân loại thành hai loại là elicitor sinh học (có nguồn gốc từ nấm, vi khuẩn...) hay hoá học (ion kim loại, các thành phần vô cơ). Việc xử lý thực vật với các elicitor có thể gây ra các phản ứng phòng vệ, bao gồm sự tích lũy của một dải các hợp chất thứ cấp có tính

phòng vệ ở thực vật như phytoalexin trong điều kiện không gây ảnh hưởng đối với thực vật. Các nghiên cứu của Trịnh Thị Hương và đồng tác giả (2015), Lê Giang Hồng (2022) đã cho thấy việc bổ sung elicitor vào môi trường đã góp phần gia tăng khả năng sản sinh hợp chất thứ cấp có trong mô thực vật nuôi cấy dẫn đến gia tăng giá trị dược liệu. Vì vậy, trong nghiên cứu này, kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* cây lan gấm được ứng dụng nhằm tạo ra nguồn sinh khối một cách chủ động thay thế cho nuôi trồng truyền thống, đồng thời bổ sung elicitor vào môi trường nuôi cấy nhằm cải thiện hàm lượng phenolic tổng số - một hợp chất có hoạt tính sinh học, từ đó nâng cao giá trị dược liệu từ nguồn sinh khối lan gấm thu nhận được.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thực vật

Nguồn vật liệu thực vật được sử dụng trong nghiên cứu là các chồi ngọn lan gấm (*A. roxburghii*) được nuôi cấy *in vitro* có chiều cao 2,5 cm với đường kính thân trung bình là 2,0 mm.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng ở nghiên cứu này là môi trường MS (Murashige, Skoog) bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar. Tất cả môi trường được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

Phương pháp bố trí thí nghiệm và chỉ tiêu theo dõi

Mẫu chồi cây lan gấm được nuôi cấy vào môi trường MS chứa 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và bổ sung 1 trong 5 loại elicitor riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau bao gồm: cao nấm men (1; 2; 3; 4; 5 mg/L), chitosan (1; 2; 3; 4; 5 mg/L), salicylic acid (SA) (1; 2; 3; 4; 5 mg/L), abscisic acid (ABA) (1; 2; 3; 4; 5 mg/L) và methyl jasmonate (MeJA) 95% (Sigma Aldrich) (50; 100; 150; 200; 250 µl/L). Đối chứng là môi trường MS không bổ sung elicitor.

Sau 8 tuần nuôi cấy, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu sinh trưởng (Hàm lượng chlorophyll-chỉ số SPAD, chiều cao cây, khối lượng khô), hàm lượng phenolic tổng số (TPC - Total Phenolic Content) và hàm lượng TPC/cây. Chỉ số SPAD được đo bằng máy Hansatech CL-01 (Anh), vị trí đo ở lá số 2 từ ngọn xuống. Hàm lượng phenolic tổng số (TPC) (mg acid galic (GAE)/ g chất khô (DW)) được xác định bằng phương pháp Folin – Ciocalteu tạo màu với thuốc thử Folin – Ciocalteu (Ainsworth, Gillespie, 2007). Hàm lượng TPC/cây được tính theo công thức sau:

Hàm lượng TPC/cây (mg GAE) = Hàm lượng TPC x Khối lượng khô của cây.

Điều kiện thí nghiệm và xử lý thống kê

Các thí nghiệm được đặt trong phòng nuôi cấy có thiết lập các điều kiện: nhiệt độ $24 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 2.000 – 2.500 lux.

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, các thí nghiệm được tiến hành với 5 lần lặp lại. Số liệu thu thập sẽ được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion với kiểm định LSD và độ tin cậy 95%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của cao nấm men đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Kết quả ghi nhận được sau 8 tuần nuôi cấy cho thấy, việc bổ sung cao nấm men vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng tích cực đến các chỉ tiêu sinh trưởng cũng như hàm lượng phenolic của cây lan gấm. Chỉ số SPAD phản ánh hàm lượng chlorophyll trong lá cây. Chỉ số này càng tăng, khả năng quang hợp của cây cũng gia tăng và dẫn đến cây sinh trưởng và tích lũy sinh khối tốt hơn. Trong thí nghiệm này, chỉ số SPAD ghi nhận được ở các nghiệm thức bổ sung cao nấm men đều cao hơn đối chứng (0 mg/L), trong đó đạt cao nhất ở nghiệm thức 3 và 4 mg/L cao nấm men. Chiều cao cây không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức 0-4 mg/L, và đạt cao nhất ở nghiệm thức 5 mg/L cao nấm men. Khối lượng khô không có sự khác biệt thống kê giữa tất cả các nghiệm thức (Bảng 1). Điều này là do cây lan gấm vốn sinh trưởng chậm, do vậy khối lượng chất khô của mỗi cây lan gấm chưa thể hiện sự khác biệt nhau rõ rệt sau 8 tuần nuôi cấy. Đối với chỉ tiêu hàm lượng phenolic tổng số (TPC), kết quả thu được cho thấy bổ sung cao nấm men vào môi trường nuôi cấy giúp gia tăng khả năng tích lũy TPC (Bảng 1). Cao nấm men là một elicitor sinh học và tác động tích cực của nó trong nuôi cấy sinh khối mô tế bào thực vật đã được ghi nhận trên nhiều đối tượng khác nhau như nuôi cấy tế bào rau má (Loc, Giang, 2012), nhân sâm (Rahimi *et al.*, 2014), sâm Ngọc Linh (Nguyễn Thị Nhật Linh *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu của Jha và Yadav (2023), nhóm tác giả chỉ ra rằng elicitor có thể gắn vào protein thụ thể của màng tế bào thực vật. Các protein thụ thể này có khả năng nhận biết các elicitor và kích hoạt tín hiệu phòng vệ nội bào dẫn đến tăng cường tổng hợp các chất chuyển hóa. Tương tự, Ashraf và đồng tác giả (2018) cũng nhấn mạnh rằng, các

elicitor ngoại sinh có thể hoạt động như chất kích thích sinh học, giúp cải thiện dinh dưỡng của thực vật, năng suất của thực vật và cơ chế phòng vệ chống lại nhiều loại stress khác nhau.

Bảng 1. Ảnh hưởng của cao nấm men đến sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

| Cao nấm men (mg/L) | SPAD | Chiều cao cây (cm) | Khối lượng khô (DW) (g) | TPC (mg GAE/g DW) | TPC/cây (µg GAE) |
|--------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|
| 0 | 10,56 ^c | 4,52 ^b | 0,076 ^a | 6,14 ^c | 467,8 |
| 1 | 14,84 ^b | 4,56 ^b | 0,083 ^a | 7,11 ^a | 588,4 |
| 2 | 14,38 ^b | 4,64 ^b | 0,078 ^a | 6,64 ^b | 518,3 |
| 3 | 17,14 ^{ab} | 4,54 ^b | 0,075 ^a | 7,09 ^a | 534,0 |
| 4 | 18,34^a | 4,84^b | 0,084^a | 7,23^a | 607,5 |
| 5 | 14,94 ^b | 5,20 ^a | 0,086 ^a | 6,39 ^{bc} | 549,8 |

*Các chữ cái a,b,c,... trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.

Do cơ chế tác động của elicitor thường liên quan đến các phản ứng phòng vệ, trong một số trường hợp các elicitor có những ảnh hưởng khác nhau đến pha sinh trưởng và pha tích lũy hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy mô thực vật. Vì vậy, việc lựa chọn được nồng độ elicitor thích hợp cho quá trình nuôi cấy sinh khối nhằm mục đích thu nhận các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cần phải dựa trên một tiêu chí thể hiện được hiệu suất thu nhận được hợp chất thứ cấp đó từ mẻ nuôi cấy. Chỉ tiêu TPC/cây thể hiện được cả sự sinh trưởng cũng như hàm lượng TPC thu nhận được từ 1 cây lan gấm, do vậy nó đại diện cho hiệu suất phenolic thu nhận được từ quá trình nuôi cấy sinh khối lan gấm. Dựa vào chỉ tiêu này thì nồng độ cao nấm men thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy cây lan gấm là 4 mg/L.

Ảnh hưởng của chitosan đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Trong thí nghiệm này, chitosan là một elicitor sinh học ngoại sinh được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Kết quả ghi nhận được cũng tương tự đối với cao nấm men, đó là bổ sung chitosan vào môi trường nuôi cấy đã giúp nâng cao chỉ số SPAD và chiều cao cây so với đối chứng (0 mg/L), và khối lượng khô không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa tất cả các nghiệm thức. Tuy nhiên, hàm lượng TPC và TPC/cây ghi nhận được ở các nghiệm thức bổ sung chitosan đều thấp hơn đối chứng (Bảng 2). Điều này chứng tỏ chitosan không thích hợp để bổ sung vào môi trường nuôi cấy sinh khối cây lan gấm. Ngược lại với kết quả của chúng tôi, Nguyễn Thị Nhật Linh và đồng tác giả (2017) lại báo cáo rằng, bổ sung chitosan vào môi trường nuôi cấy sinh khối rễ bất định cây sâm Ngọc Linh gây ra ức chế sự sinh trưởng của rễ, nhưng lại nâng cao hàm lượng saponin tích lũy trong rễ nuôi cấy. Điều này chứng tỏ rằng, đối với các loài khác nhau, thì tác động của chitosan đến sự sinh trưởng và tích lũy các nhóm hợp chất thứ cấp là khác nhau.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chitosan đến sự sinh trưởng và tích lũy phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

| Chitosan (mg/L) | SPAD | Chiều cao cây (cm) | Khối lượng khô (DW) (g) | TPC (mg GAE/g DW) | TPC/cây (µg GAE) |
|-----------------|---------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|------------------|
| 0 | 12,71 ^b | 3,97 ^b | 0,078 ^a | 7,25 ^a | 565,8 |
| 1 | 14,90 ^a | 4,68 ^a | 0,080 ^a | 6,48 ^b | 516,9 |
| 2 | 14,82 ^{ab} | 4,47 ^a | 0,086 ^a | 5,78 ^d | 502,0 |
| 3 | 14,76 ^{ab} | 4,38 ^{ab} | 0,079 ^a | 6,40 ^{bc} | 506,7 |
| 4 | 15,58 ^a | 4,43 ^{ab} | 0,087 ^a | 6,05 ^{cd} | 526,6 |
| 5 | 15,84 ^a | 4,53 ^a | 0,087 ^a | 6,56 ^b | 569,8 |

*Các chữ cái a,b,c,... trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.

Ảnh hưởng của salicylic acid đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Salicylic acid (SA) có vai trò quan trọng trong sự phát triển, quang hợp, thoát hơi nước, hấp thu và vận chuyển ion ở thực vật. SA còn cảm ứng sự biểu hiện gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp và sản sinh một số hợp chất biến dưỡng thứ cấp ở thực vật (Taguchi *et al.*, 2001). Nghiên cứu của Rahimi và đồng tác giả (2014) cho thấy, trong nuôi cấy rễ bất định nhân sâm, SA giúp tăng khả năng tích lũy các sesquiterpenoid.

Trong nghiên cứu này, khối lượng khô của cây lan gấm thu nhận được sau 8 tuần nuôi cấy không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa tất cả các nghiệm thức. Chiều cao cây đạt cao nhất ở nghiệm thức đối chứng (0 mg/L); trong khi đó, chỉ số SPAD đạt cao nhất ở nghiệm thức 1 mg/L SA (Bảng 3). Điều này cho thấy SA không

có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, hàm lượng TPC thu được ở các nghiệm thức môi trường nuôi cấy bổ sung 2–4 mg/L SA lại cao hơn so với đối chứng. Tương tự với kết quả ở nghiên cứu này, khối lượng của rễ tơ cây sâm Ngọc Linh thu được ở môi trường bổ sung SA thấp hơn đối chứng, nhưng SA lại giúp gia tăng hàm lượng saponin trong rễ tơ (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2015). Ở cây húng chanh, bổ sung SA ở nồng độ từ 100 - 200 μ M, sự sinh trưởng của cây giảm, nhưng ở nồng độ 50 μ M không ảnh hưởng đến số lá, tỷ lệ tạo rễ, khối lượng tươi và chỉ số diệp lục tố của cây húng chanh; bên cạnh đó cải thiện đáng kể hàm lượng flavonoid và phenolic tổng số trong cây (Lê Giang Hồng, 2022).

Bảng 3. Ảnh hưởng của SA đến sự sinh trưởng và tích lũy phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

| SA (mg/L) | SPAD | Chiều cao cây (cm) | Khối lượng khô (DW) (g) | TPC (mg GAE/g DW) | TPC/cây (μ g GAE) |
|-----------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0 | 12,90 ^{b*} | 4,86 ^a | 0,091 ^a | 6,41 ^b | 584,0 |
| 1 | 16,60 ^a | 4,39 ^b | 0,082 ^a | 6,58 ^b | 536,2 |
| 2 | 13,57^b | 4,44^b | 0,093^a | 7,04^a | 652,2 |
| 3 | 14,17 ^b | 4,34 ^b | 0,084 ^a | 7,11 ^a | 595,9 |
| 4 | 12,92 ^b | 4,14 ^b | 0,093 ^a | 6,78 ^{ab} | 627,5 |
| 5 | 13,22 ^b | 4,46 ^b | 0,093 ^a | 6,45 ^b | 596,4 |

*Các chữ cái a,b,c,... trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.

Do khối lượng khô không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê, và sự tích lũy TPC đạt cao nhất ở các nồng độ 2 - 4 mg/L SA (Bảng 3), nên sẽ dựa vào chỉ tiêu TPC/cây để xác định nồng độ SA phù hợp nhất. Theo đó, nồng độ SA thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy sinh khối cây lan gấm là 2 mg/L SA, với TPC/cây đạt giá trị cao nhất là 652,2 μ g GAE.

Ảnh hưởng của abscisic acid đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Trong thí nghiệm này kết quả thu được cho thấy, sự sinh trưởng của cây lan gấm trên môi trường bổ sung ABA đều thấp hơn đối chứng (Bảng 4). Nguyên nhân là do ABA là một chất điều hoà sinh trưởng thực vật thuộc nhóm ức chế, thường liên quan đến trạng thái ngủ nghỉ của hạt, sự trưởng thành của phôi, sự lão hoá và đáp ứng với stress của thực vật. Ngược lại, chỉ tiêu TPC gia tăng tỷ lệ thuận với nồng độ ABA, đạt cao nhất là 7,22 mg GAE/g DW tại nghiệm thức 5 mg/L ABA (Bảng 4). Tương tự với nghiên cứu này, ABA cũng được báo cáo là không thích hợp cho sự sinh trưởng nhưng lại kích thích khả năng tích lũy saponin tổng số của rễ thứ cấp (Nguyễn Thị Nhật Linh *et al.*, 2017) và rễ tơ cây sâm Ngọc Linh (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2015). ABA cũng đã được báo cáo là đóng vai trò trung gian trong quá trình sinh tổng hợp một số hợp chất thứ cấp như gia tăng khả năng tích lũy phenolic và các tanshinone trong rễ tơ cây *Salvia miltiorrhiza* (Zhang *et al.*, 2014).

Bảng 4. Ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng và tích lũy phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

| ABA (mg/L) | SPAD | Chiều cao cây (cm) | Khối lượng khô (DW) (g) | TPC (mg GAE/g DW) | TPC/cây (μ g GAE) |
|------------|----------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|------------------------|
| 0 | 12,24 ^{ab*} | 5,17 ^a | 0,105 ^a | 6,06 ^d | 636,4 |
| 1 | 11,01 ^b | 3,52 ^{bc} | 0,057 ^b | 6,83 ^b | 388,5 |
| 2 | 12,43 ^{ab} | 3,63 ^{bc} | 0,058 ^b | 6,39 ^{cd} | 367,8 |
| 3 | 12,76 ^a | 3,74 ^b | 0,061 ^b | 6,32 ^{cd} | 382,4 |
| 4 | 11,05 ^{ab} | 3,75 ^b | 0,055 ^b | 6,56 ^{bc} | 362,1 |
| 5 | 11,50 ^{ab} | 3,27 ^c | 0,051 ^b | 7,22 ^a | 368,6 |

*Các chữ cái a,b,c,... trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.

Như vậy, ABA có tác động trái ngược nhau đối với sự sinh trưởng và TPC của cây lan gấm, do vậy ở thí nghiệm này, chỉ tiêu hàm lượng phenolic/cây cũng được xem là chỉ tiêu quan trọng để xác định có nên bổ sung ABA vào môi trường nuôi cấy sinh khối cây lan gấm hay không. Theo đó thì TPC/cây ghi nhận được ở tất cả nghiệm thức bổ sung ABA đều thấp hơn nhiều so với đối chứng (Bảng 4). Do đó, việc bổ sung ABA vào môi trường nuôi cấy không thích hợp cho quá trình nuôi cấy sinh khối cây lan gấm.

Ảnh hưởng của methyl jasmonate đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Mặc dù MeJA đã được báo cáo là tham gia vào con đường truyền tín hiệu và kích thích các enzyme xúc tác trong các phản ứng hóa sinh, hình thành nhiều hợp chất thứ cấp trong cây như polyphenol, alkaloid, quinone, terpenoid

(Dicosmo, Tower, 1984), nhưng kết quả ghi nhận được trong nghiên cứu này lại cho thấy, khi bổ sung MeJA vào môi trường nuôi cấy, cả sự sinh trưởng và TPC của cây lan gấm thu được đều thấp hơn đối chứng rõ rệt (Bảng 5). Quan sát hình thái cho thấy, ở môi trường có bổ sung MeJA, có hiện tượng vàng và rụng lá, không tạo rễ mới, và sự sinh trưởng của cây giảm dần khi nồng độ MeJA càng gia tăng (Hình 1). Hàm lượng TPC tích lũy trong cây ở các nghiệm thức môi trường nuôi cấy bổ sung MeJA cũng thấp hơn đối chứng và giảm dần theo chiều tăng nồng độ MeJA (Bảng 5). Ngược lại với nghiên cứu của chúng tôi, nhiều công bố đã chỉ ra rằng, mặc dù MeJA làm giảm sự sinh trưởng nhưng lại kích thích sự tích lũy các hợp chất thứ cấp như saponin tổng số của rễ tơ (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2015), và rễ thứ cấp (Nguyễn Thị Nhật Linh *et al.*, 2017) sâm Ngọc Linh. Nguyên nhân sự khác biệt này là bởi sự đáp ứng đối với MeJA ngoại sinh ở các loài là khác nhau, hoặc do nồng độ MeJA được chọn khảo sát chưa phù hợp. Như vậy, ở nghiên cứu này bổ sung MeJA không thích hợp cho sự sinh trưởng và sự tích lũy TPC của cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*.

Bảng 5. Ảnh hưởng của MeJA đến sự sinh trưởng và tích lũy phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

| MeJA (µl/L) | SPAD | Chiều cao cây (cm) | Khối lượng khô (DW) (g) | TPC (mg GAE/g DW) | TPC/cây (µg GAE) |
|-------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|------------------|
| 0 | 11,57 ^a | 4,94 ^a | 0,091 ^a | 7,07 ^a | 645,8 |
| 50 | 2,78 ^b | 3,29 ^b | 0,056 ^{bc} | 5,91 ^b | 331,4 |
| 100 | 1,94 ^{bc} | 3,08 ^{bc} | 0,049 ^{bc} | 5,81 ^{bc} | 284,7 |
| 150 | 1,31 ^c | 3,06 ^{bc} | 0,058 ^b | 5,53 ^{bc} | 319,7 |
| 200 | 1,30 ^c | 2,84 ^{cd} | 0,048 ^c | 5,63 ^{bc} | 268,3 |
| 250 | 1,18 ^c | 2,66 ^d | 0,047 ^c | 5,46 ^c | 258,2 |

*Các chữ cái a,b,c,... trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.



Hình 1. Ảnh hưởng của các elicitor lên sự sinh trưởng và hàm lượng TPC của cây lan gấm nuôi cấy *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy. a, b, c, d, e, f: tương ứng với các nồng độ 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L đối với các elicitor cao nấm men, chitosan, SA, ABA; và tương ứng với nồng độ 0, 50, 100, 150, 200, 250 µl/L đối với MeJA.

KẾT LUẬN

Các elicitor khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số ở cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*. Trong năm loại elicitor khảo sát thì cao nấm men với nồng độ 4 mg/L và salicylic acid với nồng độ 2 mg/L là thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cải thiện sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ainsworth EA, Gillespie KM (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*, 2(4): 875-877.
- Ashraf MA, Iqbal M, Rasheed R, Hussain I, Riaz M, Arif MS (2018). Environmental stress and secondary metabolites in plants. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, 153-167.
- Chen A, Wang S, Zhang L, Peng J (2015). Optimization of the microwave roasting extraction of palladium and rhodium from spent automobile catalysts using response surface analysis. *International Journal of Mineral Processing*, 143: 18-24.
- Dicosmo F, Tower GHN (1984). Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. Timmermann BN, Steelink C and Loewus FA, eds. *Phytochemical Adaptation to Stress*, Plenum, USA: 97-175.
- Jha S, Yadav A (2023). Assessment of carbon and fullerene nanomaterials for sustainable crop plants growth and production. *Plant Biology, sustainability and climate change*, 145-160.
- Lê Giang Hồng (2022). Ảnh hưởng của elicitor salicylic acid lên sự sinh trưởng và tích lũy chất biến dưỡng thứ cấp ở cây húng chanh (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Đại học cần Thơ*, 58(5): 77-83.
- Loc NH, Giang NT (2012). Effects of elicitors on the enhancement of asiaticoside biosynthesis in cell cultures of centella (*Centella asiatica* L. Urban). *Chem Pap*, 66(7): 642-648.
- Memelink J, Kijne JW, van der Heijden R, Verpoorte R (2001). Genetic modification of plant secondary metabolite pathways using transcriptional regulators. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 103-125.
- Nguyễn Thị Nhật Linh, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt (2017). Ảnh hưởng của các elicitor sinh học và phi sinh học đến sinh khối và hàm lượng saponin của rễ thứ cấp trong nuôi cấy lỏng lác rễ bất định sâm Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15(2): 285-291.
- Patel ZM, Mahapatra R, Jampala SSM (2020). Role of fungal elicitors in plant defense mechanism. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, 143-158.
- Rahimi S, Devi BSR, Khorolragchaa A, Kim YJ, Kim JH, Jung SK, Yang DC (2014). Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots. *Russ J Plant Physiol*, 61(6): 811-817.
- Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M (2001). Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyl transferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur J Biochem*, 268(14): 4086-4094.
- Trịnh Thị Hương, Nguyễn Hồng Hoàng, Vũ Thị Hiền, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Bùi Thế Vinh, Trần Đình Phương, Lâm Diệp Thảo, Phạm Bích Ngọc, Trần Công Luận, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2015). Ảnh hưởng của một số elicitor lên sự sinh trưởng và tích lũy hoạt chất ở rễ sâm Ngọc Linh chuyển gen. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(3): 843-851.
- Xi J, Wang B (2013). Optimization of ultrahigh-pressure extraction of polyphenolic antioxidants from green tea by response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9): 2538-2546.
- Zhang S, Yan Y, Wang B, Liang Z, Liu Y, Liu F, Qi Z (2014). Selective responses of enzymes in the two parallel pathways of rosmarinic acid biosynthetic pathway to elicitors in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *J Biosci Bioeng*, 117(5): 645-651.

EFFECT OF ELICITORS ON GROWTH AND TOTAL PHENOLIC CONTENT OF *IN VITRO* *Anoectochilus roxburghii*

Trinh Thi Huong^{1*}, Pham Van Loc¹, Truong Thi Thanh Ngan¹, Huynh Thi Cam Tien², Tran Trong Tuan³

¹*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

²*Ho Chi Minh City University of Technology*

³*Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Anoectochilus roxburghii is a herbaceous plant that not only has medicinal value but is also used as a decorative plant. In this study, various elicitors were investigated to evaluate their potential to enhance growth and total phenolic content (TPC) in *in vitro* *A. roxburghii*. The results showed that yeast extract (4 mg/L) improved the growth and TPC of *A. roxburghii*. After 8 weeks of culture, the dry weight and TPC were 0.084 g and 7.23 mg GAE/mg DW, respectively. Salicylic acid had no positive effect on the growth of *A. roxburghii*, but increased the TPC with the optimal concentration of 2 mg/L, the dry weight and TPC were 0.093 g and 7.04 GAE/mg DW, respectively. Chitosan, abscisic acid and methyl jasmonate were not suitable for addition to the culture medium. Specifically, chitosan improved growth indices (SPAD, plant height) but decreased the TPC. Abscisic acid increased the TPC but inhibited plant growth. Methyl jasmonate inhibited both the growth and TPC. These results indicate that elicitors have varying effects on the growth and TPC in *A. roxburghii*. Determining the appropriate type and concentration of elicitor added to the culture medium can improve biomass and secondary compound content accumulation in the plant, thereby increasing the efficiency of biomass culture for medicinal plants.

Keywords: Abscisic acid, *Anoectochilus roxburghii*, chitosan, methyl jasmonate, salicylic acid, yeast extract.

* Author for correspondence: Tel: +84-982406187; Email: huongtt@huit.edu.vn