

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CALLUS CÂY BÁCH BỆNH (*Eurycoma longifolia* Jack)

Effects of culture media on growth ability of *Eurycoma longifolia* Jack callus

Nguyễn Hữu Nhân^{1,3}, Hoàng Tấn Quảng⁴, Nguyễn Hoàng Lộc^{1,2*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

²Viện nghiên cứu hoạt chất sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

³Trường Cao đẳng Lương thực – Thực phẩm, 101B Lê Hữu Trác, Đà Nẵng, Việt Nam

⁴Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

Tác giả liên hệ Nguyễn Hoàng Lộc (Thư điện tử: nhloc@hueuni.edu.vn)
(Ngày nhận bài (received): 18–9–2019; Ngày chấp nhận đăng (accepted): 26–9–2019)

Tóm tắt. Cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) thuộc chi *Eurycoma* là một trong những cây thuốc phổ biến ở Đông Nam Á. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh dưới ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau nhằm tạo nguyên liệu để sản xuất eurycomanone sau này. Kết quả nghiên cứu cho thấy phối hợp nhiều chất điều hòa sinh trưởng cho hiệu quả cao hơn sử dụng các chất riêng lẻ. Môi trường cơ bản MS có bổ sung kết hợp 1,5 mg/L naphthaleneacetic acid và 1,0 mg/L kinetin cho kết quả tốt nhất: callus sinh trưởng mạnh với chỉ số sinh trưởng đạt 11,24, khối lượng tươi lên tới 32,92 g/bình, tương ứng với khối lượng khô là 1,76 g/bình. Trên sắc đồ HPLC của dịch chiết callus 14 ngày tuổi ở môi trường này xuất hiện 1 peak có thời gian lưu trùng với peak chuẩn eurycomanone là 4,15 phút, tương ứng với hàm lượng eurycomanone là 0,17 mg/g chất khô.

Từ khóa: bách bệnh, *Eurycoma longifolia* Jack, eurycomanone, chất điều hòa sinh trưởng, callus

Abstract. *Eurycoma longifolia* Jack (Simaroubaceae), one of the most popular tropical medicinal plants in South-east Asia. In this study, we investigated the growth ability of *E. longifolia* callus on various culture media to produce materials for later eurycomanone production. The results show that the combination of plant growth regulators was more effective than individuals. MS basal medium supplemented with 1.5 mg/L naphthaleneacetic acid and 1.0 mg/L kinetin had the best results. Callus grew strongly with a growth index of 11.24, fresh weight up to 32.92 g/flack, corresponding to a dry weight of 1.76 g/flack. HPLC analysis showed that callus extract had a peak with the same retention time as that of the eurycomanone standard and natural sample (4.15 min) with the eurycomanone content of 0.17 mg/g dry weight.

Keywords: *Eurycoma longifolia* Jack, eurycomanone, plant growth regulators, callus

1 Đặt vấn đề

Cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) (Hình 1) thuộc chi *Eurycoma*, họ Simaroubaceae là một trong những loài thảo dược nhiệt đới phổ biến, có nguồn gốc ở các nước Đông Nam Á như Malaysia, Indonesia và Việt Nam [1]. Ở Việt Nam, cây bách bệnh phân bố rải rác ở các tỉnh vùng núi thấp (dưới 1000 m) và trung du. Các tỉnh Tây Nguyên và miền Trung gặp nhiều hơn các tỉnh phía Bắc [2].

Dịch chiết của cây này, đặc biệt là từ rễ, được sử dụng để tăng cường testosterone ở nam giới. Dịch chiết được sử dụng như phương thuốc dân gian của người bản địa để kháng khuẩn, hạ sốt, chống viêm, gây độc tế bào và kích thích tính dục. Dịch chiết của rễ còn được dùng để giảm huyết áp, sốt và sự mệt mỏi. Eurycomanone là chất đặc trưng của cây bách bệnh, có hoạt tính chính trong tăng cường sinh lý ở nam giới, cảm ứng quá trình apoptosis ở tế bào ung thư, v.v. [1, 3].

Gần đây, nhu cầu về loại thảo dược này tăng rất nhanh, vì vậy, việc trồng ở quy mô lớn loại dược liệu này mới có thể đáp ứng được nhu cầu lớn hiện nay. Tuy nhiên, cây bách bệnh sinh trưởng chậm, cây trưởng thành cần tới 5 năm mới thu hoạch [3]. Vì vậy, nuôi cấy *in vitro* cây bách bệnh để sản xuất hợp chất thứ cấp thay thế cho nguồn nguyên liệu tự nhiên là cần thiết. Một số hợp chất thứ cấp từ cây bách bệnh như 9-methoxycanthin-6-one và canthin-6-one đã được nghiên cứu thu nhận từ nuôi cấy *in vitro* [3], [4].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên sự phát triển của callus cây bách bệnh, đây là nguyên liệu để sản xuất eurycomanone sau này.

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

Callus của cây bách bệnh mà chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu này được TS. Võ Châu Tuấn, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng cung cấp.

2.2 Phương pháp

Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên tích lũy sinh khối của callus

Khoảng 3 g callus được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) cơ bản chứa 0,8% agar, 3% saccharose và bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng là 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (naphthaleneacetic acid) và KIN (kinetin) ở các nồng độ khác nhau để khảo sát khả năng tăng sinh của callus cây bách bệnh.

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh ở pH 5,8 trước khi khử trùng; các mẫu thí nghiệm được nuôi ở nhiệt độ 25 ± 2 °C; cường độ ánh sáng 2000–3000 lux và thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày.

Sau 2 tuần nuôi cấy, callus được thu nhận. Loại bỏ nước bám bên ngoài callus bằng phương pháp lọc (giấy lọc Whatman No. 1) và xác định khối lượng tươi (FW). Sau đó callus được sấy đến khối lượng không đổi ở 50 °C để xác định khối lượng khô (DW).



Hình 1. Cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) [5]

Chỉ số sinh trưởng (GI – growth index) của tế bào được tính theo công thức:

$$GI = \frac{FW_f}{FW_i}$$

trong đó FW_f và FW_i là khối lượng tươi của tế bào tại thời điểm đánh giá và thời điểm bắt đầu nuôi cấy [6].

Chiết xuất eurycomanone

Sinh khối khô của callus được nghiền thành bột mịn, sau đó chiết bằng cách ngâm 0,5 g mẫu trong 10 mL methanol, lắc 120 vòng/phút ở 60 °C trong 8 giờ, sau đó để lắng và thu dịch chiết. Quy trình chiết được lặp lại 3 lần. Dịch chiết (khoảng 30 mL) được lọc qua giấy lọc Whatman và cô đặc ở 50 °C. Sau đó, kết tủa được hòa tan trong 5 mL methanol, lọc qua màng lọc Minisart 0,2 μm (Sartorius, Goettingen, Đức) để xác định hàm lượng eurycomanone.

Xác định hàm lượng eurycomanone

Hàm lượng eurycomanone được xác định bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo Norhidayah và cs. có điều chỉnh phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [7]. 20 μL dịch chiết được tiêm vào máy HPLC bằng Hamilton syringe. Điều kiện chạy HPLC: nhiệt độ phòng, cột C18 (Xbridge: 5 μm, 4,6 × 250 mm); tốc độ chạy: 0,8 mL/phút; thời gian chạy: 17,5 phút; detector đọc ở bước sóng 245 nm; pha tĩnh là silica gel và pha động là acetonitril:H₂O (15:85).

Quy trình phân tích HPLC được thực hiện trên máy LC-20 Prominence (Shimadzu, Kyoto, Nhật Bản), với SPD-20A UV-VIS detector, sử dụng phần mềm LC-Solution. Các hóa chất sử dụng để phân tích HPLC được mua từ hãng Merck & Co. Inc. (Darmstadt, Đức). Đường chuẩn của eurycomanone (Santa Cruz, CA, Mỹ) được sử dụng để xác định hàm lượng eurycomanone trong mẫu phân tích.

Xử lý thống kê

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Số liệu trung bình được phân tích one-way ANOVA (Duncan's test, $p < 0,05$) bằng chương trình SPSS (ver. 20).

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên tích lũy sinh khối của callus

Theo các tài liệu đã công bố, callus cây bách bệnh thường sinh trưởng tốt trên các môi trường MS cơ bản có bổ sung 2,4-D, NAA và KIN [8]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát khả năng phối hợp của các chất này lên sự tích lũy sinh khối của callus cây bách bệnh, trong đó các chất 2,4-D, NAA được sử dụng riêng rẽ hay kết hợp với KIN.

Ảnh hưởng của 2,4-D

Khi nuôi cấy callus lên môi trường chỉ có 2,4-D ở tất cả các nồng độ khảo sát, callus đều sinh trưởng tốt, chỉ số sinh trưởng đạt trên 2, khối lượng tươi đạt 6,56–7,56 g/bình (tương ứng với khối lượng khô đạt 0,36–0,55 g/bình). Trong đó, công thức bổ sung 2 mg/L 2,4-D cho kết quả tốt nhất; chỉ số sinh trưởng của callus đạt 2,53; khối lượng tươi và khô lần lượt là 7,56 và 0,55 g/bình (Bảng 1). Công thức này sẽ được sử dụng làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

Theo Hussein và cs., callus phát sinh phôi của cây bách bệnh hình thành trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D [8]. Trong khi đó theo Mahmood và cs., 2,4-D là loại auxin phù hợp nhất để cảm ứng tạo callus cũng như nhân sinh khối callus từ nhiều nguồn khác nhau của cây bách bệnh, callus tạo thành từ mẫu lá, cuống lá đơn, cuống lá kép và lá mầm trên các môi trường có bổ sung 2,4-D đều cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ tạo callus từ 78,33 đến 88,33% [4]. Vì vậy, chúng tôi sử dụng 2,4-D là chất điều hòa sinh trưởng đầu tiên để khảo sát khả năng sinh trưởng của callus.

Ảnh hưởng của NAA

Trong nghiên cứu của chúng tôi, sự sinh trưởng của callus ở các công thức thí nghiệm bổ sung NAA mạnh hơn rất nhiều khi so sánh với 2,4-D, chỉ số sinh trưởng dao động từ 4,50 đến 8,06. Trong đó, công thức bổ sung 1,5 mg/L NAA cho hiệu quả tốt nhất: chỉ số sinh trưởng của callus đạt tới 8,06 với khối lượng tươi và khô lần lượt là 24,18 và 1,68 g/bình, cao hơn rất nhiều so với khi sử dụng 2,4-D (Bảng 2). Ở các nồng độ NAA cao hơn, callus sinh trưởng tốt nhưng bị xốp và chuyển qua màu trắng.

Theo Siregar và cs., môi trường để cảm ứng tạo callus cây bách bệnh từ mẫu lá là MS cơ bản có bổ sung 10 mg/L NAA. Sau 4 tuần nuôi cấy, khối lượng tươi của callus đạt 2,72–3,82 g, tương ứng với khối lượng khô là 0,11–0,14 g [9].

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D lên khả năng sinh trưởng của callus

| 2,4-D (mg/L) | Khối lượng tươi (g) | Khối lượng khô (g) | Chỉ số sinh trưởng |
|--------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 0,5 | 6,56 ^b | 0,36 ^b | 2,19 |
| 1,0 | 6,84 ^{ab} | 0,39 ^b | 2,28 |
| 1,5 | 7,47 ^a | 0,48 ^{ab} | 2,49 |
| 2,0 | 7,56 ^a | 0,55 ^a | 2,52 |
| 2,5 | 7,41 ^a | 0,42 ^b | 2,47 |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test). Chú thích này dùng chung cho các bảng 2–4.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng sinh trưởng của callus

| NAA (mg/L) | Khối lượng tươi (g) | Khối lượng khô (g) | Chỉ số sinh trưởng |
|------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 0,5 | 13,50 ^b | 1,02 ^b | 4,50 |
| 1 | 21,24 ^{ab} | 1,32 ^b | 7,08 |
| 1,5 | 24,18 ^a | 1,68 ^a | 8,06 |
| 2 | 19,32 ^a | 1,32 ^b | 6,44 |
| 2,5 | 16,98 ^a | 1,20 ^b | 5,66 |



Hình 2. Callus bách bệnh trên môi trường bổ sung 1,5 mg/L NAA

Ảnh hưởng của 2,4-D và KIN

Sau khi xác định được nồng độ tối ưu khi bổ sung 2,4-D là 2 mg/L, chúng tôi tiếp tục khảo sát sự kết hợp giữa 2,4-D với KIN (0,25–2 mg/L) lên sự sinh trưởng của callus. Ở tất cả các công thức phối hợp, callus đều sinh trưởng tốt hơn đối chứng chỉ có 2,4-D. Chỉ số sinh trưởng dao động trong khoảng 2,9–4,02, cao hơn nhiều so với đối chứng (2,52). Trong các công thức phối hợp, công thức kết hợp giữa 2,4-D và 1 mg/L KIN cho kết quả tốt nhất: khối lượng tươi và khô thu được lần lượt là 12,06 và 0,84 g/bình, cao hơn đối chứng khoảng 1,5 lần (Bảng 3).

Sử dụng kết hợp giữa 2,4-D và KIN để nhân callus cây bách bệnh cũng đã được thực hiện trong các nghiên cứu trước đây. Natanael và cs. đã nhân sinh khối callus cây bách bệnh trên môi trường MS có bổ sung 2,2 mg/L 2,4-D và 2 mg/L KIN sau đó mới chuyển sang nuôi cấy huyền phù [10]. So với nghiên cứu của chúng tôi, các tác giả đã sử dụng một lượng tương đương 2,4-D, nhưng lượng KIN tăng lên gấp đôi. Trong khi đó, nghiên cứu của Hussein và cs. cho thấy callus phát sinh phôi cây bách bệnh sinh trưởng cao nhất trên môi trường có bổ sung 1 mg/L 2,4-D và 0,5 mg/L KIN, thấp hơn các nồng độ trong nghiên cứu của chúng tôi. Nghiên cứu của Iriwati và cs. lại cho thấy kết hợp giữa 2,25 mg/L 2,4-D và 2 mg/L KIN là phù hợp để nhân callus cây bách bệnh [11]. Như vậy, có thể thấy môi trường thích hợp để nhân callus phụ thuộc rất lớn vào dòng tế bào callus, mỗi dòng callus có thể có môi trường nhân thích hợp khác nhau.

Bảng 3. Ảnh hưởng của 2 mg/L 2,4-D và nồng độ KIN từ 0,25 đến 2 mg/L lên khả năng sinh trưởng của callus

| KIN (mg/L) | Khối lượng tươi (g) | Khối lượng khô (g) | Chỉ số sinh trưởng |
|------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 0 | 7,56 ^c | 0,55 ^c | 2,52 |
| 0,25 | 11,28 ^a | 0,72 ^{ab} | 3,76 |
| 0,5 | 11,46 ^a | 0,78 ^b | 3,82 |
| 1 | 12,06 ^a | 0,84 ^a | 4,02 |
| 1,5 | 8,88 ^b | 0,66 ^{bc} | 2,96 |
| 2 | 8,70 ^b | 0,60 ^c | 2,90 |

Ảnh hưởng của NAA và KIN

Naphthaleneacetic acid với nồng độ 1,5 mg/L (Bảng 2) được sử dụng để kết hợp với KIN ở các nồng độ khác nhau. Callus sinh trưởng rất tốt, chỉ số sinh trưởng vượt trội so với việc kết hợp 2,4-D và KIN. Trong các công thức khảo sát, sự kết hợp giữa 1,5 mg/L NAA và 1 mg/L KIN cho hiệu quả tốt nhất: callus sinh trưởng mạnh với chỉ số sinh trưởng đạt 11,24, khối lượng tươi lên tới 32,92 g/bình, tương ứng với khối lượng khô là 1,76 g/bình (Bảng 4).

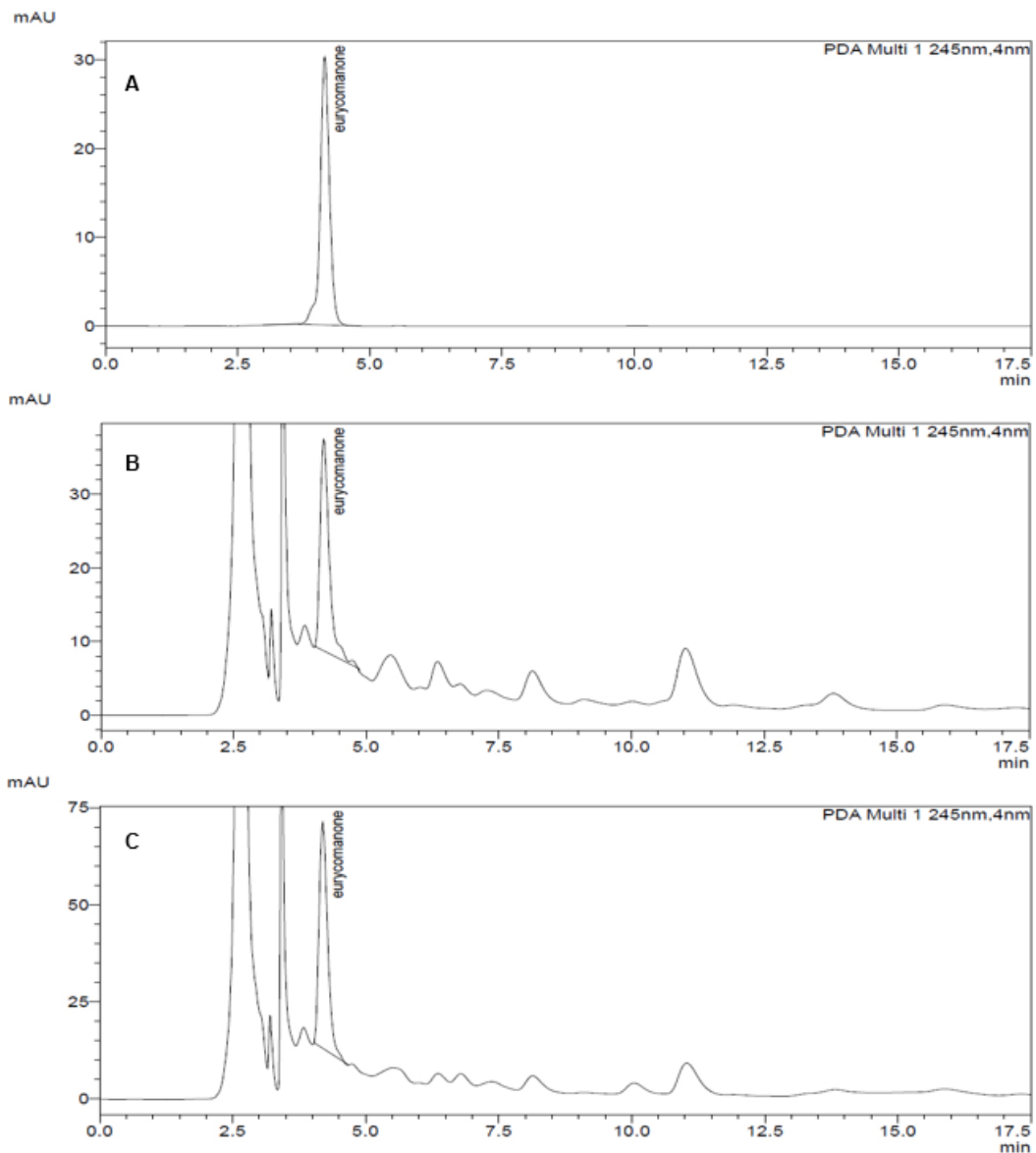
Trên thế giới, việc sử dụng cả NAA và KIN trong nuôi cấy callus cây bách bệnh để sản xuất hợp chất thứ cấp đã được thực hiện. Chẳng hạn, Galih và Esyanti đã sử dụng môi trường Zenk để nuôi cấy callus cây bách bệnh. Các tác giả đã bổ sung vào môi trường 0,5 mg/L NAA và 0,5 mg/L KIN để nuôi cấy callus trước khi chuyển qua chính môi trường này (không có agar) để nuôi cấy lỏng [12].

Sự tích lũy eurycomanone trong callus cây bách bệnh

Kết quả phân tích HPLC mẫu dịch chiết từ callus 14 ngày tuổi trên môi trường tốt nhất (MS cơ bản có bổ sung 1,5 mg/L NAA và 1 mg/L KIN) và rễ cây bách bệnh tự nhiên khoảng 5 năm tuổi cho thấy trên sắc ký đồ của tất cả các mẫu đều xuất hiện 1 peak có thời gian lưu giống với thời gian lưu của chất chuẩn eurycomanone (khoảng 4,15 phút) (Hình 3). Hàm lượng eurycomanone trong callus là 0,17 mg/g chất khô (bằng khoảng 8% so với mẫu rễ cây tự nhiên là 2,09 mg/g). Như vậy, có thể khẳng định có sự sinh tổng hợp eurycomanone trong callus cây bách bệnh. Đây là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu nuôi cấy tế bào huyền phù cây bách bệnh nhằm sản xuất eurycomanone sau này.

Bảng 4. Ảnh hưởng của 1,5 mg/L NAA và nồng độ KIN từ 0,25 đến 2 mg/L lên khả năng sinh trưởng của callus

| KIN (mg/l) | Khối lượng tươi (g) | Khối lượng khô (g) | Chỉ số sinh trưởng |
|------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 0 | 24,18 ^c | 1,68 ^a | 8,06 |
| 0,25 | 30,36 ^{ab} | 1,52 ^a | 10,12 |
| 0,5 | 31,04 ^{ab} | 1,56 ^a | 10,33 |
| 1 | 32,92 ^a | 1,76 ^a | 11,24 |
| 1,5 | 30,08 ^b | 1,52 ^a | 10,00 |
| 2 | 28,12 ^b | 1,28 ^b | 9,33 |



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC phân tích eurycomanone. A. Eurycomarone chuẩn, B. Dịch chiết callus cây bách bệnh, C. Dịch chiết thân rễ cây bách bệnh trồng trong điều kiện tự nhiên

4 Kết luận

Chúng tôi đã nghiên cứu cải thiện khả năng sinh trưởng của callus cây bách bệnh trên môi trường có bổ sung các loại chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Môi trường cơ bản MS có bổ sung 1,5 mg/L NAA và 1 mg/L KIN cho callus sinh trưởng mạnh với chỉ số sinh trưởng đạt 11,24, khối lượng tươi lên tới 32,92 g/bình, tương ứng với khối lượng khô là 1,76 g/bình. Hàm lượng eurycomanone trong callus là 0,17 mg/g chất khô, bằng khoảng 8% so với mẫu rễ cây tự nhiên.

Tài liệu tham khảo

1. Bhat R, Karim AA. Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): A review on its ethnobotany and pharmacological importance. *Fitoterapia*. 2010;81(7):669-79.
2. Kiệt PV. Nghiên cứu hóa học và hoạt tính sinh học của một số cây thuốc dân tộc Việt Nam nhằm tạo sản phẩm thuốc có giá trị cao phục vụ cuộc sống: Báo cáo tổng kết nhiệm vụ hợp tác quốc tế theo nghị định thư Việt Nam-Italia (2006-2008), Bộ khoa học và Công nghệ; 2009.
3. Hasnida N. Micropropagation and production of eurycomanone, 9-methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11.
4. Mahmood M, Normi R, Subramaniam S. Optimization of suitable auxin application in a recalcitrant woody forest plant of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) for callus induction. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(49):8417-28.
5. Loc NH, Lan P, Thi Yen V, Dat H. Some physiological and biochemical characteristics of *Eurycoma longifolia* Jack tree grown in the arboretum. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 2018;19:249-55.
6. Loc NH, An NTT. Asiaticoside production from centella (*Centella asiatica* L. Urban) cell culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2010;15(6):1065-70.
7. Norhidayah A, Vejayam J, Yusoff MM. Detection and quantification of eurycomanone levels in Tongkat Ali herbal products. *Journal of Applied Sciences*. 2015 15(7):999-1005.
8. Hussein S, Ibrahim R, Kiong ALP, Fadzillah NM, Daud SK. Micropropagation of *Eurycoma longifolia* Jack via formation of somatic embryogenesis. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2005;4:472-85.
9. Siregar LAM, Chan LK, Boey PL. Selection of cell source and the effect of pH and MS macronutrients on biomass production in cell cultures of tongkat ali (*Eurycoma longifolia* Jack). *J Plant Biotechnol*. 2003;5:131-5.
10. Natanael J, Esyanti RR, Manurung R. Growth kinetics and secondary metabolite production of *Eurycoma longifolia* Jack cell culture elicited by UV in flask scale and bubble column bioreactor scale. *Int J Tech Res Appl*. 2014;2:29-32.
11. Iriawati, Rahmawati A, Esyanti RR. Analysis of secondary metabolite production in somatic embryo of Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.). *Procedia Chemistry*. 2014;13:112-8.
12. Galih PR, Esyanti RR. Effect of immobilization on cell growth and alkaloid contents in cell-aggregate culture of *Eurycoma longifolia* Jack. *International Journal of Chemical, Environmental and Biological sciences*. 2014;2:90-3.