

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.235

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*

Lê Hồng Giang*

Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Hồng Giang (email: lhgiang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 25/04/2022

Ngày nhận bài sửa: 01/06/2022

Ngày duyệt đăng: 03/06/2022

Title:

Effects of the elicitor of salicylic acid on growth and accumulation of secondary metabolites in *Plectranthus amboinicus* (Lour) *in vitro*

Từ khóa:

Chất biến dưỡng thứ cấp, *in vitro*, flavonoid, phenolic *Plectranthus amboinicus*, salicylic acid

Keywords:

In vitro, flavonoids, phenolics, *Plectranthus amboinicus*, salicylic acid, secondary metabolites

ABSTRACT

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng., a perennial herb, has antibacterial, anti-inflammatory, and anti-tumor effects which has been used to treat diseases such as respiratory, cardiovascular, and digestive. The study aimed to determine the effective treatment of salicylic acid (SA) to improve the accumulation of *in vitro* secondary metabolites in this plant. The concentrations of SA at 0, 50, 100, 150 and 200 μM were supplemented into Murashige & Skoog (1962) medium for culturing. The growth and total contents of flavonoids and phenolics in shoot samples were evaluated. The results showed that SA at 50 μM had almost no effect on the shoot growth including leaf number, root formation rate, fresh weight and chlorophyll index. However, it helped to significantly enhance the contents of these two substrates. The total flavonoid content achieved 7.08 mg QE/g dry weight and phenolics reached 2.30 mg GAE/g with the increasing of 1.14 and 1.73-fold compared to the control, respectively. Therefore, exposure to 50 μM SA could help to improve the production of *in vitro* secondary metabolites in this valuable medicinal plant.

TÓM TẮT

Húng chanh hay tần dày lá (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. là một loài thảo dược lâu năm có tác dụng kháng khuẩn, chống viêm, kháng u được dùng để chữa các bệnh như hô hấp, tim mạch, tiêu hóa, ... Nghiên cứu này nhằm xác định nồng độ salicylic acid (SA) xử lý thích hợp giúp cải thiện sự tích lũy các hợp chất biến dưỡng thứ cấp *in vitro* ở cây húng chanh. Các nồng độ SA ở 0, 50, 100, 150 và 200 μM được bổ sung vào môi trường nuôi cấy Murashige & Skoog (1962). Sự sinh trưởng và hàm lượng các hợp chất flavonoid và phenolic tổng số trong mẫu chồi được đánh giá. Kết quả cho thấy nồng độ SA 50 μM gần như không tác động lên sự sinh trưởng của chồi bao gồm số lá, tỷ lệ tạo rễ, khối lượng tươi và chỉ số diệp lục tổ nhưng có hiệu quả tăng cường hàm lượng của cả hai nhóm hợp chất này. Hàm lượng flavonoid tổng đạt 7,08 mg QE/g khối lượng khô và phenolic đạt 2,30 mg GAE/g, lần lượt tăng gấp 1,14 và 1,73 lần so với đối chứng. Như vậy, xử lý SA nồng độ 50 μM đã giúp cải thiện sản sinh các hợp chất thứ cấp *in vitro* ở cây dược liệu có giá trị này.

1. GIỚI THIỆU

Húng chanh còn gọi là tần dày lá (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) là một loại thảo mộc thơm, lâu năm và mọc nước thuộc Họ Hoa môi (Lamiaceae). Cây húng chanh có tác dụng kháng khuẩn, chống viêm, kháng u, chữa lành vết thương,... Ngoài ra, húng chanh còn có hiệu quả chống lại các bệnh về đường hô hấp, tim mạch, miệng, da, tiêu hóa và tiết niệu (Arumugam et al., 2016). Tinh dầu và các hoạt chất được chiết xuất từ húng chanh như các flavone, salvigenin, 6-methoxygenkwanin, quercetin, chrysoeriol và luteolin (Sahaykhare et al., 2011) đóng vai trò quan trọng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy các hợp chất có hoạt tính sinh học của thực vật có thể được sản sinh với số lượng lớn khi đáp ứng với các kích thích bên ngoài hoặc các chất kích hoạt (elicitor) (Zhao et al., 2005; Murthy et al., 2014). Các elicitor sinh học hoặc phi sinh học được sử dụng để kích thích hình thành sản phẩm trở thành một kỹ thuật quan trọng để cải thiện sản lượng các hợp chất thứ cấp có hoạt tính (Dornenburg, 2004).

Salicylic acid (SA) đóng vai trò quan trọng trong điều hòa các quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật thông qua việc điều chỉnh mạng lưới các tín hiệu có liên quan đến con đường sinh tổng hợp chất biến dưỡng thứ cấp (Miura & Tada, 2014). SA hoạt động như một elicitor sinh học trong cây và có khả năng làm tăng sản sinh các hợp chất có hoạt tính như alkaloid, phenolic, flavonoid và terpene (Ali et al., 2006; Silva et al., 2014). Xử lý SA đã có hiệu quả lên sự sinh trưởng và cải thiện sự tích lũy các chất biến dưỡng thứ cấp của nhiều loài được liệu như kích thích quang hợp và chất biến dưỡng thứ cấp của cây đậu xanh (*Vigna radiata*) (Nazar et al., 2011), cải thiện đáng kể hàm lượng các sắc tố quang hợp, tăng sinh khối, tăng cường hàm lượng các hợp chất thứ cấp như phenol, proline, anthocyanin và làm mạnh hệ thống bảo vệ chống oxy hóa trong nuôi cấy *in vitro* cây *Withania coagulans* (Bipin et al., 2019)... Tuy nhiên, các tài liệu công bố về tác động của SA lên sự sinh trưởng và tích lũy các hợp chất biến dưỡng thứ cấp *in vitro* trên cây húng chanh hiện chưa được tìm thấy. Vì vậy, việc xác định nồng độ SA xử lý thích hợp để cải thiện sự tích lũy các hợp chất này ở cây húng chanh là rất cần thiết, góp phần xây dựng quy trình sản xuất chất biến dưỡng thứ cấp *in vitro* ở cây dược liệu có giá trị này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chồi cây húng chanh được nuôi cấy tại phòng Nuôi cấy mô, Bộ môn Sinh lý - Sinh hóa, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Phòng Nuôi cấy mô có điều kiện nhiệt độ $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ chiếu sáng dao động khoảng 1.500 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

2.2. Hóa chất

Hóa chất sử dụng trong nuôi cấy mô là khoáng đa lượng, vi lượng theo Murashige & Skoog (1962) (MS), các vitamin gồm B1 (Thiamine), B3 (Nicotinic acid), B6 (Pyridoxine) (Ấn Độ), đường sucrose, agar, chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA (α -Naphthalene acetic acid), nước dừa tươi, salicylic acid (Trung Quốc).

Hóa chất phân tích hàm lượng flavonoid và phenolic acid gồm: quercetin (QE) (Sigma), AlCl_3 10%, ethanol 80%, ethanol 95%, potassium acetate 1M, gallic acid (Merck), thuốc thử folin-ciocalteu 10% (Sigma), NaCO_3 7,5%...

2.3. Thiết bị

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu gồm tủ cấy vô trùng, nồi hấp khử trùng nhiệt ướt, máy đo pH, tủ sấy, cân điện tử, máy đo chỉ số diệp lục tổ Spad (Konica Minolta) và máy đo quang phổ (PerkinElmer).

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu là phòng Nuôi cấy mô và phòng Sinh lý thực vật, Bộ môn Sinh lý Sinh hóa, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Thời gian nghiên cứu từ tháng 01/2022 đến tháng 4/2022.

2.5. Bố trí thí nghiệm

2.5.1. Chuẩn bị môi trường thí nghiệm

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản đa vi lượng MS có bổ sung đường sucrose 30 g/L, agar 8 g/L, thiamine 1 mg/L, pyridoxine 1 mg/L, nicotinic acid 1 mg/L, NAA 0,5 mg/L, nước dừa tươi 100 ml/L và SA với các nồng độ khác nhau. Môi trường sau khi pha chế xong được điều chỉnh về pH 5,8 và hấp khử trùng bằng nồi hấp khử trùng ở 121°C , áp suất 1 atm trong 20 phút.

2.5.2. Cách tiến hành

Mẫu chồi húng chanh có từ 2-3 cặp lá, chiều cao khoảng 0,6-0,9 cm được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung SA với các nồng độ khác nhau.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên thừa số một nhân tố là SA gồm 4 nghiệm thức (0, 50, 150 và 200 μ M). Mỗi nghiệm thức lặp lại 10 lần, mỗi lần lặp lại là 1 keo cấy 2 mẫu.

2.5.3. *Chỉ tiêu theo dõi*

Chỉ tiêu sinh trưởng: chiều cao chồi gia tăng (cm), số lá gia tăng, tỷ lệ tạo rễ (%), khối lượng tươi của cây (g), chỉ số diệp lục tổng (đo bằng máy Spad ở lá thứ 3 tính từ ngọn xuống). Các chỉ tiêu gia tăng được tính bằng chỉ tiêu ghi nhận tuần sau trừ chỉ tiêu tuần đầu tiên (thời gian ghi nhận là 1 tuần/lần trong 6 tuần). Chỉ số diệp lục tổng và khối lượng tươi của cây được ghi nhận ở tuần 6.

Chỉ tiêu hàm lượng các chất biến dưỡng thứ cấp: mẫu chồi thu nhận từ các nghiệm thức bổ sung SA ở 6 tuần sau khi cấy có chiều cao trung bình khoảng 1,0-2,5 cm được xác định hàm lượng flavonoid và phenolic tổng số.

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định theo phương pháp tạo màu với $AlCl_3$ từ qui trình của Chang et al. (2002) bằng cách xây dựng đường chuẩn với quercetin.

Dịch chiết mẫu được chuẩn bị theo phương pháp của Nurisa et al. (2017) có điều chỉnh: chồi cây húng chanh được làm khô trong tủ sấy đối lưu ở 60⁰C trong 48 giờ; cân 0,05 g mẫu khô, nghiền thành bột (sử dụng cối); bột được chiết xuất bằng cách sử dụng 5 mL ethanol tuyệt đối, ngâm trong 30 phút; đun cách thủy ở 60⁰C trong 5 phút, sau đó lọc bằng giấy lọc; dịch chiết được cô đặc ở nhiệt độ phòng cho đến khi đạt thể tích 2 mL.

Tiếp theo, 2 ml dịch chiết được pha loãng trong 2 ml ethanol 80%. Dịch chiết và các dung dịch quercetin chuẩn có nồng độ 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 và 100 μ g/ml được sử dụng 0,5 ml để làm phản ứng. Sau đó, 1,5 ml ethanol 95%, 0,1 ml $AlCl_3$ 10%, 0,1 ml potassium acetate 1M và 2,8 ml nước cất được thêm vào và ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút. Độ hấp thụ được đo ở 415 nm. Hàm lượng $AlCl_3$ 10% được thay thế bằng hàm lượng nước cất tương đương trong mẫu blank. Các thử nghiệm được lặp lại 4 lần.

Phương trình đường chuẩn của quercetin được dùng để tính hàm lượng flavonoid tổng bằng công thức:

$$F = (c \times V) / m$$

F: Hàm lượng flavonoid tổng (μ g quercetin (QE)/g khối lượng khô)

c: Giá trị x từ đường chuẩn với quercetin (μ g/ml)

V: Thể tích dịch chiết (ml)

m: Khối lượng khô có trong thể tích V (g).

Hàm lượng phenolic tổng số được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu mô tả bởi Mendoza et al. (2018) có điều chỉnh.

Dịch chiết mẫu được chuẩn bị theo phương pháp của Nurisa et al. (2017) có điều chỉnh tương tự như trên. Sau đó, dịch chiết thu được sẽ được pha loãng với nước cất 10 lần để dùng làm mẫu phân tích. Tiếp theo đó, 2 ml dung dịch được sử dụng phân tích cho phản ứng với 2,5 ml thuốc thử folin-ciocalteu 10%. Sau 2 phút, 2,5 ml $NaCO_3$ 7,5% được thêm vào và ủ ở 50⁰C trong 10 phút. Sau đó, độ hấp thụ được đo ở 765 nm. Mẫu blank được chuẩn bị tương tự nhưng thay 2 ml nước cất cho mẫu phân tích.

Đường chuẩn được xây dựng bằng gallic acid với các nồng độ 5, 10, 20, 40 và 80 μ g/ml. Các thử nghiệm được thực hiện 4 lần.

Kết quả được biểu thị bằng μ g đường lượng acid gallic trên gam mẫu (μ g GAE/g khối lượng khô) theo công thức:

$$P = (c \times V) / m$$

P: Hàm lượng phenolic tổng (μ g GAE/g khối lượng khô)

c: Giá trị x từ đường chuẩn với acid gallic (μ g/ml)

V: thể tích dịch chiết (ml)

m: Khối lượng khô có trong thể tích V (g).

2.6. *Xử lý số liệu*

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và thống kê bằng chương trình SPSS version 20, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 1% và 5%.

Các số liệu là tỷ lệ phần trăm biến động từ 0-100% được chuyển đổi sang dạng $Arcsin\sqrt{x}$ (Gomez & Gomez, 1984).

3. **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

3.1. **Ảnh hưởng của salycilic acid lên sự sinh trưởng của cây húng chanh *in vitro***

3.1.1. *Chiều cao chồi gia tăng (cm)*

Bảng 1 cho thấy từ tuần thứ 4 đến thứ 6, SA có ảnh hưởng lên chiều cao gia tăng của chồi. Các nồng độ xử lý từ 50 đến 200 μ M có khuynh hướng làm giảm chiều cao của chồi, khác biệt có ý nghĩa so với nồng độ 0 μ M (đối chứng). Sự gia tăng chiều cao chồi thấp nhất ở nồng độ 200 μ M. Nồng độ từ 50-

150 μM SA có chiều cao chồi gia tăng khác biệt không ý nghĩa.

Bảng 1. Ảnh hưởng của salicylic acid lên chiều cao chồi gia tăng (cm)

Nồng độ SA (μM)	Tuần 2	Tuần 4	Tuần 6
0	0,32	1,32a	2,12a
50	0,21	0,80b	1,03bc
100	0,27	0,75b	0,96bc
150	0,29	0,88b	1,12b
200	0,18	0,41c	0,61c
F	ns	**	**
CV (%)	45,4	37,1	38,2

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ cái (a,b,c) theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

3.1.2. Số lá gia tăng

Số lá gia tăng của chồi húng chanh không có sự khác biệt ở tuần 2 giữa các nghiệm thức xử lý SA và đối chứng nhưng có sự khác biệt ở tuần 4 và 6. Kết quả số lá gia tăng ở nồng độ SA từ 50 đến 150 μM cho thấy không bị ảnh hưởng bởi SA. Tuy nhiên, nồng độ SA cao (200 μM) làm giảm số lá đáng kể ở 6 tuần sau khi cấy. Số lá gia tăng ở nghiệm thức này chỉ đạt 5,6 lá (thấp nhất), trong khi các nồng độ khác (50-100 μM) không có ảnh hưởng (số lá gia tăng từ 7,5-8,3 lá).

Bảng 2. Ảnh hưởng của salicylic acid lên số lá gia tăng

Nồng độ SA (μM)	Tuần 2	Tuần 4	Tuần 6
0	1,7	5,8a	8,7a
50	1,4	5,2ab	7,8a
100	2,0	6,0a	8,3a
150	1,4	5,1ab	7,5a
200	1,1	4,0b	5,6b
F	ns	*	**
CV (%)	48,9	27,1	23,4

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ cái (a,b) theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (*): khác biệt ở mức ý nghĩa 5%; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

3.1.3. Tỷ lệ tạo rễ

Bảng 3 cho thấy xử lý SA nồng độ từ 50 đến 150 μM không ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo rễ của chồi húng chanh. Trong khi, ở nồng độ SA cao 200 μM , tỷ lệ tạo rễ (%) luôn thấp nhất ở các tuần theo dõi và giảm khác biệt so với các nghiệm thức còn lại và nghiệm thức không xử lý ở tuần 6. Tỷ lệ tạo rễ của chồi húng chanh đạt gần tối đa từ 90 đến 100% ở 6 tuần sau

khí cấy ở các nồng độ SA từ 0 đến 150 μM , ngoại trừ nồng độ SA 200 μM chỉ đạt 50%.

Bảng 3. Ảnh hưởng của salicylic acid lên tỷ lệ tạo rễ (%)

Nồng độ SA (μM)	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
0	70,0a	80,0a	95,0a
50	85,0a	95,0a	100,0a
100	85,0a	85,0a	95,0a
150	65,0ab	65,0ab	90,0a
200	35,0b	40,0b	50,0b
F	**	**	**
CV (%)	56,1	48,5	27,3

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ cái (a,b) theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

3.1.4. Khối lượng tươi của cây (g) và chỉ số diệp lục tố (Spad)

Bảng 4 cho thấy khối lượng tươi của cây qua 6 tuần nuôi cấy không bị ảnh hưởng bởi SA ở nồng độ 50 μM (đạt 2,05 g). Nồng độ SA tăng từ 100 đến 200 μM có khuynh hướng làm giảm khối lượng tươi của cây, thấp nhất là ở nồng độ 200 μM chỉ 0,35 g. Về chỉ số diệp lục tố Spad, các nồng độ SA xử lý không có ảnh hưởng lên hàm lượng diệp lục tố trong lá của chồi cây húng chanh.

Bảng 4. Ảnh hưởng của salicylic acid lên khối lượng tươi (g) và chỉ số Spad

Nồng độ SA (μM)	Khối lượng tươi (g)	Chỉ số Spad
0	2,00a	33,5
50	2,05a	30,6
100	1,27b	30,9
150	1,27b	31,1
200	0,35c	34,6
F	**	ns
CV (%)	46,3	13,2

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ cái (a,b,c) theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Theo Markwell et al. (1995), chỉ số Spad và hàm lượng diệp lục tố trong lá cây lúa và bắp có quan hệ rất chặt. Chỉ số Spad có thể phản ánh hàm lượng diệp lục tố trong lá cây, từ đó có thể khái quát được trạng thái sinh lý của cây. Cây có chỉ số Spad cao có nghĩa là hàm lượng diệp lục trong lá cao. Nghiên cứu của Bipin et al. (2019) ở cây *Withania coagulans* cho thấy khi xử lý SA ở nồng

độ 150 và 200 μM đã cải thiện đáng kể hàm lượng các sắc tố quang hợp và giúp tăng sinh khối.

Kết quả thí nghiệm cho thấy nồng độ SA 50 μM không có tác dụng kích thích và cũng gần như không có ảnh hưởng đến sinh trưởng của chồi húng chanh về các chỉ tiêu số lá, tỷ lệ tạo rễ, khối lượng tươi cũng như chỉ số diện tích lá, ngoại trừ có làm giảm sự gia tăng chiều cao của chồi. Tăng nồng độ SA từ 100 μM có khuynh hướng làm giảm sinh trưởng của chồi và nồng độ SA cao 200 μM đã có tác dụng ức chế rõ nhất (Hình 1). SA được biết là điều hòa các chức năng của thực vật phụ thuộc vào nồng độ, gây ra sự cảm ứng hoặc ức chế các chức năng sống của thực vật. Chẳng hạn như nồng độ 50 μM có thể kích thích và 250 μM ức chế sự sinh trưởng của cây *Matricaria chamomilla* (Kováčik et al., 2009). Một kết quả khác là nồng độ 100 và 500 μM đã kích thích quang hợp và chất biến dưỡng thứ cấp của cây đậu xanh *Vigna radiata*, tuy nhiên nồng độ ức chế sinh trưởng là 1 mM (Nazar et al., 2011).



Hình 1. Ảnh hưởng của SA lên sự sinh trưởng của cây húng chanh ở 6 tuần sau khi cấy

Ghi chú: SA 0 (A), 50 (B), 100 (C), 150 (D) và 200 μM (E)

3.2. Ảnh hưởng của salycilic acid lên sự tích lũy flavonoid và phenolic của cây húng chanh *in vitro*

Bảng 5 cho thấy sau 6 tuần nuôi cấy, hàm lượng flavonoid trong mẫu chồi húng chanh có sự gia tăng đáng kể khi được xử lý ở nồng độ SA 50 μM , đạt 7,08 mg QE/g khối lượng khô, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng, chỉ đạt 6,22 mg QE/g (tăng gấp 1,14 lần). Nồng độ SA tăng từ 100 đến 200 μM làm giảm sự tích lũy flavonoid ở cây húng chanh. Thấp nhất là nồng độ SA 200 μM , hàm lượng chỉ đạt 4,62 mg QE/g.

Hàm lượng phenolic tổng, nghiệm thức xử lý SA 50 μM cũng giúp cải thiện vượt bậc sự tích lũy hợp

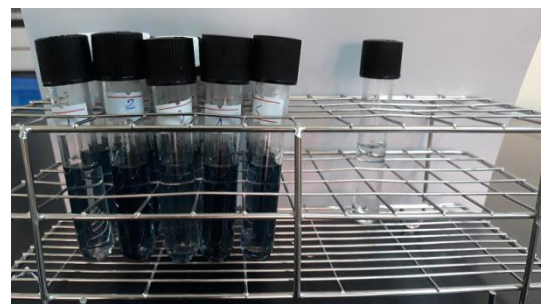
chất này, đạt kết quả cao nhất với 2,30 mg GAE/g khối lượng khô (gấp 1,73 lần so với đối chứng). Các nghiệm thức SA 150 và 200 μM cũng giúp gia tăng đáng kể hàm lượng phenolic tổng, đạt 2,02 và 1,51 mg GAE/g (gấp 1,53 và 1,14 lần so với đối chứng). Kết quả thấp nhất là ở nồng độ 100 μM (chỉ đạt 0,85 mg GAE/g) (Hình 2).

Bảng 5. Ảnh hưởng của salycilic acid lên hàm lượng flavonoid (mg QE/g khối lượng khô) và phenolic (mg GAE/g khối lượng khô) tổng số

Nồng độ SA (μM)	Flavonoid tổng (mg QE/g khối lượng khô)	Phenolic tổng (mg GAE/g khối lượng khô)
0	6,22b	1,33d
50	7,08a	2,30a
100	5,43c	0,85e
150	5,14cd	2,02b
200	4,62d	1,51c
F	**	**
CV (%)	6,0	3,7

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ cái (a,b,...) theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

SA cũng đã có hiệu quả tăng cường sự sản sinh chất biến dưỡng thứ cấp và hoạt động chống oxy hóa của chồi cây chuối *Musa acuminata* L. cv. ‘Gros Michel’ ở nồng độ 100 μM . Chồi được xử lý với SA 100 μM cho sự tích lũy saponin tổng (263,86 mg diosgenin/g chiết xuất khô), phenolic tổng (124,44 mg GAE/g chiết xuất khô) và flavonoid tổng (105,26 mg CE/g chiết xuất khô) cao nhất, lần lượt gấp 1,27, 1,25 và 1,34 lần so với đối chứng (Jirakiattikul et al., 2021). Ở chồi của cây *Melissa officinalis* L. thì hàm lượng phenolic cũng đạt cao nhất khi chồi 45 ngày tuổi được xử lý với SA 100 μM trong 14 ngày (Ebrahimi et al., 2019).



Hình 2. Dung dịch phân tích xác định hàm lượng phenolic tổng số trong mẫu chồi húng chanh ở các nghiệm thức SA

Ghi chú: SA 0 (1), 50 (2), 100 (3), 150 (4) và 200 μM (5)

Như vậy, trong kết quả thí nghiệm này, nồng độ SA 50 μM gần như đã không có ảnh hưởng lên sự sinh trưởng của chồi húng chanh nhưng có hiệu quả cải thiện đáng kể các hợp chất thứ cấp ở cây được liệu này, cho hàm lượng flavonoid và phenolic tổng cao nhất, gấp 1,14 và 1,73 lần so với đối chứng sau 6 tuần xử lý.

4. KẾT LUẬN

SA được xử lý ở nồng độ 50 μM 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 mẫu chồi. Trong đó, hàm lượng flavonoid đạt 7,08 mg QE/g khối lượng khô và phenolic tổng đạt 2,30 mg GAE/g tăng lần lượt là 1,14 và 1,73 lần so với đối chứng.

Vì vậy, có thể áp dụng xử lý SA nồng độ 50 μM để cải thiện sự tích lũy chất biến dưỡng thứ cấp *in vitro* ở cây húng chanh.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm ơn ThS. Lê Thị Hoàng Yến đã giúp đỡ thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ali, M., Yu, K.W., Hahn, E.J., & Paek, K.Y. (2006). Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and nonenzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep.*, 25(6), 613-62.
- Arumugam, G., Swamy, M. K., & Sinniah, U. R. (2016). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *Molecules*, 21(369), 1-26. doi:10.3390/molecules21040369
- Bipin, M., Krishna, K. R., Neha, P., Lakee S., Niraj K. G., & Shashi, P. R. (2019). Influence of salicylic acid elicitation on secondary metabolites and biomass production in in-vitro cultured *Withania coagulans* (L.) Dunal. *Plant Archives*, 19(1), 1308-1045.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182. https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748
- Dornenburg, H. (2004). Evaluation of immobilisation effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes. *Process Biochemistry*, 39(11) 1369-1375. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00262-0
- Ebrahimi, M., Kiarostami, K., & Bokaei, Z. N. (2019). Effect of salicylic acid on antioxidant properties of *in vitro* proliferated shoots of *Melissa officinalis* L. *Nova Biologica Reperta*, 5(4), 420-427. https://doi.org/10.29252/nbr.5.4.420
- Gomez, K.A., & Gomez, A.A. (1984). Statistical procedures for agricultural research. *John Wiley and Son. Inc.*
- Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Songsoem, K., & Itharat, A. (2021). Elicitation of Salicylic Acid on Secondary Metabolite Production and Antioxidant Activity of *In Vitro Musa acuminata* L. cv. 'Gros Michel' Shoots. *Current Applied Science and Technology*, 21(3), 569-578.
- Kováčik, J., Grúz, J., Baèkor, M., Strnad, M., & Repečák, M. (2009). Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Rep.*, 28, 135-143. https://doi.org/10.1007/s00299-008-0627-5
- Markwell, J., Osterman, J., & Mitchell, J. (1995). Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynth. Res.*, 46, 467-472.
- Mendoza, D., Cuaspuda, O., Ariasa, J. P., Ruizc, O., & Arias M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology reports* 19, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00273
- Miura, K., & Tada, Y. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.*, 5, 4. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00004
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3), 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Murthy, H. N., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(1), 1-16. https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7
- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S., & Khan, N.A. (2011). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mung bean cultivars. *J. Plant Physiol.*, 168, 807-815. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.001

- Nurisa, A., Kristanti, A. N., & Manuhara, Y. S. W. (2017). Effect of Sucrose, Erythrose-4-Phosphate and Phenylalanine on Biomassa and Flavonoid Content of Callus Culture from Leaves of *Gynura procumbens* Merr. *The 4th International Conference on Research, Implementation, and Education of Mathematics and Science (4th ICRIEMS)*. AIP Conf. Proc. 1868, 090013-1–090013-8; doi: 10.1063/1.4995205
- Sahaykhare, R., Banerjee, S., & Kundu, K., (2011). *Coleus aromaticus* Benth – a nutritive medicinal plant of potential therapeutic value. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 2(3), 488-500.
- Silva, S., Moreira, C.B., Esquibel, M.A., Gil, R., Riehl C., & Sato, A. (2014). Effect of salicylic acid on essential oil compounds of *Melissa officinalis* in vitro. plants. *Tec. Agropecu.*, 35(1), 178-184.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>