

Khảo sát hoạt tính sinh học và nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ cây cỏ xay *Abutilon indicum* (L.)

- Vũ Thị Bạch Phượng
- Hoàng Thị Thanh Minh
- Phạm Thị Ánh Hồng
- Quách Ngô Diễm Phương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 24 tháng 06 năm 2016, nhận đăng ngày 02 tháng 12 năm 2016)

TÓM TẮT

Cỏ xay (*Abutilon indicum* (L.)) là cây dược liệu được sử dụng phổ biến trong nhiều bài thuốc điều trị các bệnh như sốt rét, hạ đường huyết và giang mai... Nhận thấy giá trị dược liệu của cây cỏ xay, nghiên cứu này tập trung vào việc khảo sát hoạt tính sinh học và chủ động tạo nguồn nguyên liệu ổn định có hoạt tính cao. Kết quả cho thấy khả năng kháng oxy hóa của rễ và thân cao hơn lá khi thực hiện phương pháp Yen và Duh. Mức độ gây độc tế bào của cao chiết ethanol rễ lên ấu trùng *Artemia salina* có giá trị LC_{50} 37,04 μ g/mL. Hoạt tính ức chế α -glucosidase và acetylcholinesterase của rễ cây cỏ xay cao hơn

so với thân và lá. Ngoài ra, chúng tôi đã cảm ứng tạo rễ tơ cây cỏ xay thành công thông qua sự chuyển gene của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. Phần trăm cảm ứng tạo rễ tơ và số rễ tơ được tạo ra từ mẫu lá là cao nhất (86,66 % và 8,66 rễ). Kiểm tra sự chuyển gene rễ tơ bằng phương pháp PCR cho thấy gen *rolB* và *rolC* đã sát nhập vào bộ gene của cây cỏ xay. Kết quả nghiên cứu này chứng minh rễ cây cỏ xay là bộ phận có hoạt tính sinh học cao và cho thấy tiềm năng của việc sản xuất rễ tơ nhằm cung cấp nguồn nguyên liệu sử dụng trong y dược.

Từ khóa: *Abutilon indicum* (L), *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, *Artemia salina*, hoạt tính ức chế acetylcholinesterase và α -glucosidase, kháng oxy hóa, rễ tơ

MỞ ĐẦU

Cây cỏ xay thuộc họ Bông hoặc họ Búp (Malvaceae) có tên khoa học là *Abutilon indicum* (L), là cây dược liệu được dân gian sử dụng phổ biến ở nhiều vùng miền trên thế giới. Đặc biệt ở Ấn Độ, các bộ phận của cây như rễ, thân, lá, hoa, hạt đều được sử dụng để làm thuốc trị các bệnh như: bệnh lỵ, giảm sốt, dị ứng, lợi tiểu, đau răng, đau lưng, làm dịu chứng viêm, bệnh tiểu đường, viêm phế quản, tiêu chảy, bệnh lậu, diệt giun sán, nhuận tràng, long đờm, phong thấp, tê bại, đau nhức gân xương, ngã ứ huyết, thanh nhiệt giải độc, lá cây giã ra dùng đắp nhọt và rắn cắn [1, 2].

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu công bố về giá trị dược tính của cây cỏ xay như hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, hạ đường huyết, bảo vệ gan, chữa lành vết thương, kháng viêm, chống sốt rét, kháng tế bào ung thư, điều hòa miễn dịch, chống co giật, chống tiêu chảy, ức chế acetylcholinesterase, ức chế α -amylase và α -glucosidase... [3, 4]. Thành phần hóa học của cây cỏ xay gồm những nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học phổ biến như: phenol, tannin, alkaloid, flavanoid, saponine, steroid, α -tocopherol, gallic acid, fumaric acid, *p*-coumaric

acid, vanillic acid, caffeic acid,... [5], *p*- β -D-glucosyloxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid... [6]. Về nhân giống và nuôi cấy mô, mới chỉ có vài nghiên cứu ở Ấn Độ công bố về nuôi cấy mô sẹo và tái sinh cây cối xay *in vitro*. Trong đó, chưa có nghiên cứu nào công bố về việc nuôi cấy rễ tơ cây cối xay thông qua sự chuyển gene của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* nhằm thu nhận nguồn nguyên liệu cho sản xuất hợp chất thứ cấp. Ưu điểm của rễ tơ là có thể tăng trưởng nhanh, thu nhận sinh khối cao, không cần đến chất điều hòa tăng trưởng thực vật, ổn định về mặt di truyền và có thể sản xuất ra những chất biến dưỡng giống hoặc hơn hẳn cây mẹ. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là đánh giá hoạt tính sinh học của ba bộ phận rễ, thân, lá cây cối xay và nghiên cứu làm tăng thu nhận bộ phận có hoạt tính sinh học cao bằng kỹ thuật cảm ứng tạo rễ tơ cây cối xay nhằm hướng tới mục tiêu cung cấp nguồn dược liệu có hoạt tính cao cho ngành dược.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hạt và các bộ phận của cây cối xay (*A. indicum* (L.)) được thu hái tại Quận 2, thành phố Hồ Chí Minh.

Chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 được mua từ ngân hàng RIKEN-BRC thông qua dự án MEXT, Nhật Bản.

Phương pháp

Khảo sát hoạt tính sinh học của các bộ phận cây cối xay thu hái ngoài tự nhiên

Điều chế cao ethanol của 3 bộ phận: Phương pháp điều chế cao được thực hiện theo kỹ thuật chiết ngâm dầm (maceration) [7]. Rễ, thân, lá của cây cối xay ngoài tự nhiên được rửa sạch bằng nước, phơi khô đến khối lượng không đổi, xay nhuyễn thành bột khô. Ngâm bột cây trong ethanol tuyệt đối ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Sau đó, dung dịch chiết được lọc qua giấy lọc, thu dịch lọc. Tiếp theo, rót dung môi mới vào bình bột mẫu và tiếp tục quá trình chiết thêm vài

lần nữa cho đến khi chiết kiệt mẫu. Phần dịch lọc được cô quay chân không dưới dung môi ở 40 °C để có được cao chiết.

Khảo sát khả năng khử của các bộ phận cây cối xay bằng phương pháp thử năng lực khử của Yen và Duh [8]: hút 1 mL chất thử nghiệm, vitamin E (chứng dương), ethanol (chứng âm) vào từng ống nghiệm, thêm 2,5 mL dung dịch đệm sodium phosphate 0,2 M; pH 6,6; lắc đều, thêm 2,5 mL dung dịch potassium ferricyanide 1 %. Hỗn hợp phản ứng được ổn định ở nhiệt độ 50 °C trong thời gian 20 phút. Sau đó, thêm vào hỗn hợp phản ứng 2,5 mL trichloroacetic acid 10 %, lắc đều, ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ kết tủa, thu lấy dịch nổi. Lấy 1 mL dịch nổi, thêm 2 mL nước cất và 0,5 mL dung dịch FeCl₃ 1 %, lắc đều, để yên trong 5 phút. Sau cùng, đo độ hấp thụ ở bước sóng 700 nm. Độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 700 nm càng cao thể hiện năng lực khử của dung dịch thử nghiệm càng cao.

Khảo sát khả năng gây độc tế bào của các bộ phận cây cối xay lên ấu trùng Brine shrimp (*Artemia salina*) [9]: Trứng *A. salina* (xuất xứ: USA, nhà phân phối: GAAN TRADING CO., LTD) được ấp ở nước muối biển 3 %, sục oxygen. Sau 24 giờ trứng sẽ nở thành ấu trùng Naplius và được dùng để thử nghiệm. Cao chiết rễ, thân, lá của cây cối xay được hòa tan trong DMSO (dimethyl sulfoxide) 0,25 % và hòa vào nước muối biển 3 % để được các dung dịch cao chiết có nồng độ là 6,25; 12,5; 25; 50; 100 μ g/mL. Mỗi giếng trong đĩa 24 giếng chứa 10 ấu trùng Naplius và 5 mL nước muối biển 3 % chứa cao chiết với nồng độ khác nhau. Đối chứng là dung dịch nước muối biển 3 % bổ sung DMSO 0,25 %. Sau 24 giờ, đếm số ấu trùng Naplius chết ở mỗi nồng độ và xác định liều gây chết LC₅₀ (nồng độ gây chết 50 % sinh vật thử nghiệm).

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các bộ phận cây cối xay [10]: Cho 50 μ L dung dịch cao chiết vào 40 μ L dung

dịch enzyme α -glucosidase (0,2 U/mL) ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút, bổ sung 40 μ L cơ chất p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) (5 mM), ở nhiệt độ phòng 20 phút. Cuối cùng, 130 μ L dung dịch Na_2CO_3 0,2 M được cho vào sẽ bắt màu sản phẩm tạo ra là p-nitrophenol và dùng phản ứng. Dựa trên mật độ quang tại 405 nm (OD_{405}), hoạt tính ức chế của mẫu thử được xác định và tính nồng độ ức chế 50 % hoạt tính enzyme (IC_{50}). Chứng dương là viên thuốc glucarbose (acarbose 50 mg) của Công ty TNHH một thành viên dược phẩm và sinh học y tế. Mẫu blank là mẫu không chứa enzyme và mẫu chứng âm là mẫu không chứa cao chiết.

$$\text{Chỉ tiêu theo dõi: \% ức chế } \alpha\text{-glucosidase} = \frac{\text{OD mẫu đối chứng} - \text{OD mẫu thử}}{\text{OD mẫu đối chứng}} \times 100$$

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase của các bộ phận cây cối xay theo phương pháp của Ellman [11]: Hỗn hợp phản ứng gồm 25 μ L dung dịch cao chiết, 25 μ L dung dịch acetylthiocholine iodide (15 mM), 125 μ L 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) (3 mM), 125 μ L đệm 50 mM Tris HCl pH8, 0,1 % bovine serum albumin (BSA), 25 μ L enzyme aetylcholinesterase. Sau đó, cho enzyme vào, ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, đo mẫu ở bước sóng 405 nm. Dựa trên mật độ quang tại 405 nm (OD_{405}), hoạt tính ức chế của mẫu thử được xác định và tính nồng độ ức chế 50 % hoạt tính enzyme (IC_{50}). Galantamin được sử dụng làm chứng dương. Mẫu blank là mẫu không chứa enzyme và mẫu chứng âm là mẫu không chứa cao chiết. Chỉ tiêu theo dõi: % ức chế aetylcholinesterase = $\frac{\text{OD mẫu đối chứng} - \text{OD mẫu thử}}{\text{OD mẫu đối chứng}} \times 100$

Cảm ứng tạo rễ tơ cây cối xay

Tạo cây con *in vitro*: Hạt cây cối xay được khử trùng bằng ethanol 70 % trong 1 phút, tiếp theo ngâm trong dung dịch NaOCl 2,5 % trong

10 phút và nuôi cấy trên môi trường Murashige và Skoog (MS) [12]. Sau 3 tuần quan sát và ghi nhận kết quả khử trùng tạo cây con *in vitro*.

Cảm ứng tạo rễ tơ [13]: Rễ tơ được tạo thành thông qua sự chuyển gene của vi khuẩn *A. rhizogenes* vào tế bào thực vật. Vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 được nuôi trong môi trường lỏng Nutrient Broth (NB) đến khi đạt giá trị $\text{OD}_{600} = 0,5$. Các bộ phận rễ, thân, và lá được tạo vết thương bằng dao cây vô trùng và ngâm trong dịch vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 trong 20 phút. Sau đó, các mẫu cây được chuyển sang môi trường MS để đồng nuôi cấy trong thời gian 5 ngày. Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu được chuyển vào điều kiện tối trên môi trường MS rắn bổ sung cefotaxime (250 mg/L) để loại bỏ vi khuẩn. Sau 2-3 tuần, quan sát sự hình thành rễ ở vị trí vết thương so với đối chứng không xâm nhiễm khuẩn.

Kiểm tra gene chuyển của các mẫu rễ tơ đã được cảm ứng [14]: Rễ tơ cây cối xay được tách chiết DNA theo phương pháp CTAB của Doyle [15]. Phương pháp PCR được tiến hành nhằm xác định sự chuyển gene *rol B*, *rol C* từ vi khuẩn vào tế bào thực vật, đồng thời cũng tiến hành PCR với gene *virG* để khẳng định sự chuyển gene của *A. rhizogenes* vào thực vật. Trình tự primer dùng cho phản ứng PCR ở các gene *rolB*, *rolC* và *virG* được thể hiện ở Bảng 1.

Mỗi phản ứng PCR có thể tích 25 μ L bao gồm: 2 μ L DNA; 2 μ L primer 5 μ M; 2,5 μ L dNTP 2 mM, 5 μ L dung dịch đệm phản ứng PCR 1X, 1 μ L *Taq* polymerase *IU* (Bioline) và nước cất vô trùng vừa đủ 25 μ L. Phản ứng PCR gồm các bước: biến tính bước đầu (95 $^{\circ}\text{C}/5$ phút), 35 chu kì lặp lại (94 $^{\circ}\text{C}/30$ giây, 54 $^{\circ}\text{C}/30$ giây, 72 $^{\circ}\text{C}/60$ giây) và bước kéo dài cuối cùng (72 $^{\circ}\text{C}/5$ phút).

Bảng 1. Trình tự primer cho phản ứng PCR gene *rolB*, *rolC* và *virG* [16]

Gene	Tên primer	Trình tự primer (5' – 3')
<i>rolB</i>	<i>rolBF</i>	GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT
	<i>rolBR</i>	GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC
<i>rolC</i>	<i>rolCF</i>	CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC
	<i>rolCR</i>	TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA
<i>virG</i>	<i>virGF</i>	TTA TCT GAG TGA AGT CGT CTC
	<i>virGR</i>	CGT CGC CTG AGA TTA AGT GTC

Phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng chương trình SPSS 16.0 (Copyright SPSS Inc.) với độ tin cậy là 95 %.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát hoạt tính sinh học của các bộ phận cây cối xay thu hái ngoài tự nhiên

Khảo sát khả năng khử của các bộ phận cây cối xay bằng phương pháp thử năng lực khử của Yen và Duh

Bảng 2. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các loại cao ethanol theo phương pháp Yen và Duh

Chất thử nghiệm	Kết quả đo OD (700nm)
Vitamin E (Chứng dương)	1,997 ^a ± 0,021
Ethanol (Chứng âm)	0,000 ^d ± 0,000
Rễ	0,817 ^b ± 0,018
Thân	0,780 ^b ± 0,009
Lá	0,298 ^c ± 0,011

Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95 %

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy rễ và thân của cây cối xay thể hiện khả năng kháng oxy hóa cao hơn hẳn lá. Trong nghiên cứu của Yasmin (2010) cũng cho thấy khả năng kháng oxy hóa của cao chiết butanol rễ cây cối xay cao hơn so với các phần trên mặt đất của cây [17]. Trên thực tế, lá cây cối xay là bộ phận thường được dùng trong các bài thuốc dân gian nhưng kết quả nghiên cứu lại cho thấy rễ và thân là hai bộ phận có hoạt tính

cao hơn lá. Rõ ràng, kết quả có thể giúp khai thác tốt hơn giá trị sử dụng của cối xay mà dân gian hiện đang sử dụng theo thói quen. Hiện nay, trong các công nghệ nhân sinh khối thực vật, nuôi cấy rễ tơ đang là thể mạnh trên thế giới. Do đó, đối với loài cây này, việc nghiên cứu làm tăng thu nhận sinh khối rễ có hoạt tính sinh học cao sẽ là hướng nghiên cứu cần được đầu tư nhiều hơn.

Khảo sát khả năng gây độc tế bào của các bộ phận cây cối xay lên ấu trùng Brine shrimp (A. salina)

Bảng 3. Giá trị LC₅₀ của các bộ phận rễ, thân, lá cây cối xay

Mẫu	LC ₅₀ (µg/mL)
Rễ	37,04 ^c ± 0,48
Thân	56,08 ^b ± 1,01
Lá	90,35 ^a ± 0,65

Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95 %

Thử nghiệm khả năng gây chết ở ấu trùng tôm Brine Shrimp (*A. salina*) là một thử nghiệm sinh học phổ biến được sử dụng như là một chỉ thị để xác định độc tính và cũng là thông tin để phát hiện ra các hợp chất có tiềm năng kháng khối u và diệt côn trùng. Thử nghiệm này giúp sàng lọc nhanh các hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào để làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn khi nghiên cứu về khả năng kháng phân bào. Do đó, mẫu thử nghiệm có giá trị LC₅₀ càng thấp, khả năng có hoạt tính kháng tế bào ung thư càng cao.

Kết quả Bảng 3 cho thấy mẫu đối chứng âm không gây chết ấu trùng, chứng tỏ dung dịch nước muối biển 3 % bổ sung DMSO 0,25 % không ảnh hưởng đến khả năng sống của *A. salina*, tỉ lệ chết của ấu trùng *A. salina* tăng dần với sự gia tăng nồng độ cao chiết. Nồng độ gây chết 50 % (LC₅₀) ấu trùng *A. salina* sau 24 giờ của mẫu cao ethanol rễ là thấp nhất (37,04 µg/mL), kế đến là mẫu thân (56,08 µg/mL) và cao nhất ở mẫu lá (90,35 µg/mL). Thực tế, đã có nghiên cứu chứng minh về việc sử dụng cao chiết ethanol lá của cây cối xay trong việc ức chế tế bào ung thư phổi dòng A549 [18]. Liệu có thể nhìn nhận một kết quả khả quan khi rễ có hoạt tính kháng phân bào cao hơn rất nhiều so với lá, mà lá đã được chứng minh hiệu quả đối với dòng tế bào ung thư phổi như thế này? Với nồng độ gây chết LC₅₀ thấp, rễ cây cối xay hứa hẹn là một đối tượng tiềm năng trong việc nghiên cứu ứng dụng trong điều trị ung thư.

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các bộ phận cây cối xay: Cao chiết các bộ phận có nồng độ 2 mg/mL, chứng dương acarbose có nồng độ là 20 mg/mL.

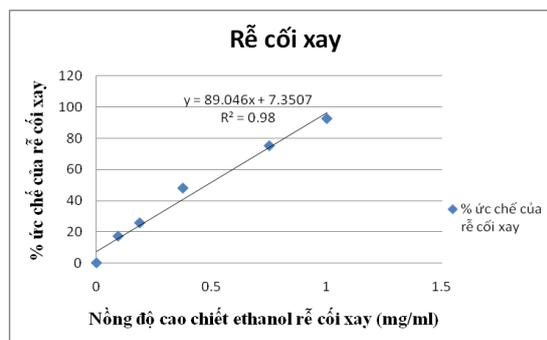
Bảng 4. Biểu thị % ức chế α -glucosidase của 3 bộ phận rễ, thân, lá cây cối xay

Bộ phận cây	% ức chế
Rễ	93,14 ^a ± 0,43
Thân	68,85 ^c ± 0,81
Lá	Không ức chế
Chứng dương (acarbose)	83,46 ^b ± 1,50

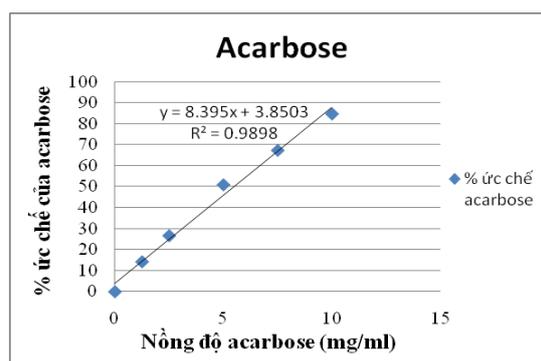
Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95 %.

Một trong những biện pháp điều trị bệnh tiểu đường loại 2 là ức chế quá trình phân hủy thức ăn thành đường để giảm thiểu sự tăng cao đường huyết thông qua việc ức chế enzyme α -glucosidase trong ruột. Do đó, một hợp chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase càng cao, hợp chất đó càng có tiềm năng trong hỗ trợ trị bệnh tiểu đường.

Kết quả bảng 4 cho thấy rễ cây cối xay là bộ phận ức chế α -glucosidase cao nhất (93,138 %), cao hơn cả chứng dương là acarbose (83,459 %), thân (68,847 %), lá không ức chế. Từ kết quả khả quan này, chúng tôi tiếp tục xác định nồng độ ức chế 50 % (IC₅₀) α -glucosidase đối với cao chiết rễ cây cối xay, chứng dương là acarbose, kết quả được thể hiện ở đồ thị Hình 1 và 2.



Hình 1. Đồ thị thể hiện khả năng ức chế α -glucosidase của cao chiết ethanol rễ cối xay



Hình 2. Đồ thị thể hiện khả năng ức chế α -glucosidase của viên thuốc acarbose

Từ phương trình của đồ thị Hình 1, giá trị IC₅₀ của cao ethanol rễ cối xay là 0,48 mg/mL và ở Hình 2 giá trị IC₅₀ của acarbose là 5,50 mg/mL. Kết quả cho thấy rễ cây cối xay có hoạt tính ức chế α -glucosidase cao hơn 11 lần so với viên thuốc glucarbose 50 mg được bán trên thị trường để chữa bệnh tiểu đường. Thêm vào đó, thành phần rễ cây cối xay từng được xác định là có chứa một hàm lượng lớn các nhóm hợp chất như

flavonoid, phenolic mà các nhóm hợp chất này đã được nghiên cứu chứng minh có khả năng làm giảm đường huyết [19]. Nghiên cứu của Krisanapun và cộng sự cũng đã cho thấy khả năng làm ức chế sự hấp thu glucose và kích thích tiết insulin của dịch chiết nước cây cối xay đối với chuột bị bệnh tiểu đường [20]. Do đó, kết quả thí nghiệm này đã góp phần chứng minh được tiềm năng của việc nghiên cứu nuôi cấy rễ cây cối xay có hoạt tính hỗ trợ điều trị tiểu đường, đáp ứng nhu cầu của xã hội hiện nay đối với căn bệnh "không lây phát triển nhanh nhất của thế kỷ 21" này.

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase của các bộ phận cây cối xay: Cao chiết ethanol của các bộ phận có nồng độ 6 mg/mL, chứng dương galathamine có nồng độ 0,02 mg/mL.

Bảng 5. % ức chế acetylcholinesterase của 3 bộ phận rễ, thân, lá cây cối xay

Bộ phận	% ức chế
Rễ	38,486 ^b ± 2,398
Thân	20,296 ^d ± 1,741
Lá	31,556 ^c ± 0,902
Galathamine	48,796 ^a ± 2,318

Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95 %.

Hướng điều trị bệnh Alzheimer có hiệu quả hiện nay là nhóm thuốc ức chế enzyme acetylcholinesterase để ngăn chặn phân hủy acetylcholine (một chất dẫn truyền thần kinh). Do đó, một hợp chất có khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase càng cao, hợp chất đó càng có tiềm năng trị bệnh Alzheimer.

Ở kết quả Bảng 5, rễ cối xay là bộ phận ức chế acetylcholinesterase cao nhất trong 3 bộ phận (38,486 %), tiếp đến là lá (31,556 %) và thân

(20,296 %). Nghiên cứu của Ingganinan và cộng sự cũng cho kết quả gần tương tự, % ức chế enzyme acetylcholinesterase của cao chiết methanol toàn bộ cây cối xay với nồng độ 5 mg/mL là 30,66 %. Tuy nhiên, khi so sánh khả năng ức chế acetylcholinesterase của cối xay so với các loài thực vật khác như *Sonneratia ovate* (IC₅₀ = 96,1 μM) [21], *Stephania suberosa* (0,1 mg/mL cao chiết ức chế 91,93 %), *Tabernaemontana divaricata* (0,1 mg/mL cao chiết ức chế 93,5 %) thì cối xay ở mức độ ức chế acetylcholinesterase trung bình. Theo Ingganinan, đa số các loài thực vật có khả năng ức chế acetylcholinesterase cao đều có chứa nhiều alkaloid [22]. Do đó, nếu có thể tiến hành thêm các nghiên cứu sâu hơn, việc tăng hoạt tính ức chế acetylcholinesterase của rễ cối xay bằng chiến lược tăng hàm lượng alkaloid là hướng nghiên cứu hoàn toàn mang tính khả thi và tiềm năng.

Nhận xét chung về các kết quả khảo sát hoạt sinh học đối với các bộ phận cây cối xay: Từ kết quả của các hoạt tính sinh học được khảo sát trong nghiên cứu này đều cho thấy rễ của cây cối xay là bộ phận có hoạt tính sinh học tiềm năng hơn hẳn thân và lá, đặc biệt là ở hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase và khả năng gây chết ở ấu trùng Brine Shrimp (*A. salina*). Do đó, việc nghiên cứu nhằm chủ động tạo ra nguồn rễ cây cối xay là việc làm có ý nghĩa rất quan trọng, và đó là lý do mà những nghiên cứu về nuôi cấy rễ tơ trong bước tiếp theo đã được tiến hành.

Cảm ứng tạo rễ tơ cây cối xay

Tạo cây con in vitro: Hạt cây cối xay sau 3 tuần khử trùng và nuôi cấy trên môi trường MS cho kết quả khử trùng đạt 95–100 % và tạo được các cây con *in vitro* làm nguồn nguyên liệu cho thí nghiệm cảm ứng tạo rễ tơ (Hình 3).



Hình 3. Cây cối xay 3 tuần tuổi

Cảm ứng tạo rễ tơ: Sau 25 ngày cảm ứng và nuôi cấy tạo rễ tơ cây cối xay, kết quả được trình bày ở Bảng 6 và Hình 4.

Bảng 6. Tỷ lệ tạo rễ tơ và số rễ tơ cảm ứng từ vị trí vết thương các bộ phận khác nhau của cây cối xay

Mẫu	% tạo rễ tơ	Số rễ tơ
Rễ	50,00 ^b ± 5,77	5,00 ^b ± 0,57
Lá	86,66 ^a ± 6,66	8,66 ^a ± 0,88
Thân	65,00 ^b ± 3,21	6,33 ^a ± 0,88

Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95 %.



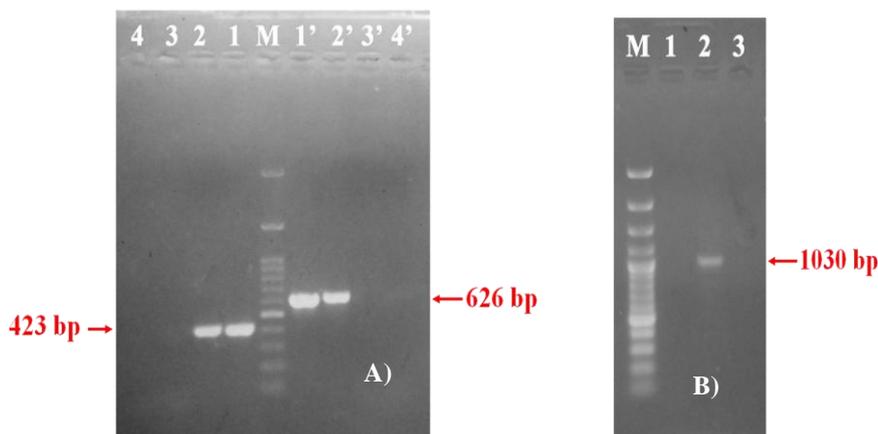
Hình 4. Rễ tơ được cảm ứng từ các bộ phận khác nhau của cây cối xay sau 25 ngày nuôi cấy
A) mẫu đối chứng, B) mẫu lá, C) mẫu thân, D) mẫu rễ

Từ kết quả ở Bảng 6 và Hình 4 cho thấy các bộ phận khác nhau của cây cối xay đã xâm nhiễm *A. rhizogenes* ATCC 15834 đều cảm ứng ra rễ tơ nhưng với tỉ lệ khác nhau. Mẫu đối chứng không có sự hình thành rễ và vẫn còn xanh sau 25 ngày chứng tỏ mẫu vẫn sống nhưng vốn không có khả năng tự cảm ứng tạo rễ. Phần trăm cảm ứng tạo rễ tơ và số rễ trên mỗi mẫu ở lá là cao nhất (86,66 % và 8,66 rễ/mẫu), tiếp theo là ở mẫu thân (65,00 % và 6,33 rễ/mẫu) và thấp nhất là ở mẫu rễ (50 % và 5 rễ/mẫu). Như vậy, vật liệu thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ cây cối xay là lá của cây *in vitro*. Kết quả này cũng trùng với kết quả của nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả khi nghiên cứu cảm ứng tạo rễ tơ với cùng chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 trên cây đậu phộng (*Arachis hypogaea*, phần trăm cảm ứng tạo rễ tơ trên lá là

cao nhất 81,43 % với 7,97 rễ/mẫu) [23]: cây cối xay cũng là loài có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ cao tương đương với cây đậu phộng và cũng cho thấy tiềm năng của việc nuôi cấy và nhân sinh khối rễ tơ cối xay với lượng lớn nhằm chủ động tạo ra nguồn rễ cối xay có hoạt tính sinh học cao.

Kiểm tra gene chuyển của các mẫu rễ tơ đã được cảm ứng

Mẫu rễ tơ được cảm ứng từ ba bộ phận rễ, thân, lá cây cối xay đều được đem đi kiểm tra gene chuyển bằng phương pháp PCR với ba cặp mồi của ba gene *rolB*, *rolC* và *virG*. Kết quả cho thấy ở tất cả các mẫu rễ tơ được cảm ứng từ ba bộ phận rễ, thân, lá cây cối xay đều có gene chuyển của *A. rhizogenes* ATCC 15834.



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp mồi *rolB*, *rolC* và *virG*

A. Kết quả PCR với cặp mồi *rolB* (trái) và *rolC* (phải). Giếng M: thang 100bp; giếng 1 và 1': chứng dương Ri plasmide của *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 2 và 2': rễ tơ cây cối xay cảm ứng bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 3 và 3': mẫu đối chứng âm rễ *in vitro* cây cối xay không xâm nhiễm *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 4 và 4': chứng âm của phản ứng PCR với cặp mồi *rolB* và *rolC*. **B.** Kết quả PCR với cặp mồi *virG*. Giếng M: thang 100bp plus; giếng 1: chứng âm của phản ứng PCR với cặp mồi *virG*; giếng 2: chứng dương DNA tổng của *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 3: rễ tơ cây cối xay cảm ứng bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834.

Kết quả điện di ở Hình 5 cho thấy các giếng phản ứng PCR của đối chứng âm (giếng 4 và 4' ở Hình 5A và giếng 1 ở Hình 5B) đều không có sản phẩm khuếch đại. Phản ứng PCR của mẫu chứng dương (Ri plasmid của *A. rhizogenes* ATCC 15834) với 3 cặp mồi *rolB*, *rolC* và *virG* đều cho sản phẩm khuếch đại đặc hiệu vùng trình tự tương ứng 423 bp, 626 bp và 1030 bp. Sản phẩm PCR của mẫu đối chứng âm rễ *in vitro* cây cối xay không xâm nhiễm *A. rhizogenes* không có sự hiện diện của gen *rolB* và *rolC* (giếng 3 và 3' Hình 5A). Trong khi sản phẩm PCR của bộ gene rễ tơ cây cối xay với ba cặp mồi *rolB*, *rolC* và *virG* khi điện di đều có sự xuất hiện của gene *rolB* và *rolC* (giếng 2 và 2' Hình 5A) nhưng không có sự hiện diện của gene *virG* (giếng 3 Hình 5B). Rõ ràng, gene *rolB*, *rolC* từ Ri plasmide của *A. rhizogenes* ATCC 15834 đã sát

nhập thành công vào bộ gene rễ tơ của cây cối xay.

KẾT LUẬN

Cao chiết ethanol từ các bộ phận cây cối xay (*A. indicum* L.) có năng lực khử, khả năng gây độc tế bào lên ấu trùng *A. salina* và ức chế α -glucosidase và acetylcholinesterase. Trong đó cao chiết rễ có hoạt tính sinh học cao nhất. Kết quả này mở ra tiền đề nghiên cứu tác dụng của cây cối xay trong điều trị bệnh tiểu đường loại 2 và Alzheimer. Ngoài ra, đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam cũng như trên thế giới công bố cảm ứng tạo rễ tơ thành công trên cây cối xay. Tỷ lệ cảm ứng rễ tơ từ 50 đến 86,66 % tùy thuộc vào loại bộ phận. Kết quả của nghiên cứu đã này góp phần chứng minh giá trị dược liệu của rễ cây cối xay trong việc sử dụng làm nguồn dược liệu từ thực vật.

Biological activities and hairy roots induction of *Abutilon indicum* (L.)

- Vu Thi Bach Phuong
 - Hoang Thi Thanh Minh
 - Pham Thi Anh Hong
 - Quach Ngo Diem Phuong
- University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Abutilon indicum L. belonging to Malvaceae is used as traditional medicinal herbs to treat syphilis, hypoglycemia, hepatic disorders, and malaria... Because of the medicinal value of *A. indicum*, the aims of this study are the evaluation of bioactivities of *A. indicum* and production of transformed hairy root for pharmaceutical production. In this study, the reducing power of ethanol root extract and stem extract are higher than that of leaf. The root extract exhibited potent brine shrimp (*Artemia salina*) lethality with LC_{50} 37.04 μ g/mL. The α -glucosidase and acetylcholinesterase inhibitory activities of the root extract are the highest. These results showed that roots are higher bioactivities than stems and

Key words: *Abutilon indicum* (L), *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, *Artemia salina*, acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibitor activity, antioxidant, hairy root

leaves. This study induced successfully hairy roots of *A. indicum* L. via *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 in the plant cells. The frequency of hairy root and number of hairy root induction from the wounded sites of leaves are the highest (88.66 % and 8.66 roots). The stable introduction of the *rolB* and *rolC* genes of *A. rhizogenes* strain 15834 into *A. indicum* plants was confirmed by PCR analysis. Besides, the absence of the *virD* gene confirmed hairy roots as a bacteria-free. Subsequently, these results demonstrated that *A. indicum*, particularly the roots, have great potential as pharmacological values and hairy root production maybe used for pharmaceutical sources.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S.B. Gaikwad, G.K. Mohan, Atibala: an overview, *JPRHC*, 3, 2, 29–37 (2011).
- [2]. R. Sarkar, A. Haque, S. Ranjan, M. Sarker, Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial effects of *Abutilon indicum* (linn.) leaves extracts, *Archives*, 1, 94–103 (2015).
- [3]. M. Mangla, N. Bimal, B. Gughria, Review on pharmacological activities of traditional medicine: *Abutilon indicum*, *International Journal of Pharmaceutical, Medical and Applied Sciences*, 1, 2, 29–43 (2012).
- [4]. G. Pant, J.K. Sai, S. Babasaheb, P.R. Reddy, G. Sibi, *In vitro* α -amylase and α -glucosidase inhibitor activity of *Abutilon indicum* leaves, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 6, 5, 22–24 (2013).
- [5]. M. Reyad-ul-ferdous, M. Rahman, M.K. Mahamud, S.S. Ayshi, M.D. Sohel, Pharmacologicals and Phytochemicals Potential of *Abutilon indicum*: A Comprehensive Review, *American Journal of BioScience*, 3, 2-1, 5–11 (2015).
- [6]. D.P. Pandey, M.A. Rather, D.P. Nautiyal, R.K. Bachheti, Phytochemical analysis of *Abutilon indicum*, *International Journal of ChemTech Research*, 3, 2, 642-645 (2011).
- [7]. N.K.P. Phụng, Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP.HCM (2007).

- [8]. G.C. Yen, P.D. Duh., Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 4, 383–386 (1993).
- [9]. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, *Journal of Medicinal Plant Research*, 45, 31–34 (1982).
- [10]. L.J. Shai, P. Masoko, M.P. Mokgotho, S.R. Magano, A.M. Mogale, N. Boaduo, J.N. Eloff, Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in halaborwa, South Africa, *South African Journal of Botany*, 76, 465–470 (2010).
- [11]. G.L. Ellman, D. Courtney, V. Andies, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95 (1961).
- [12]. T. Murashige, F. Skoog, A Revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15, 473–497 (1962).
- [13]. M.L. Zhou, X.M. Zhu, J.R. Shao, Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1229–1239 (2011).
- [14]. V.P. Sinkar, F.F. White, M.P. Gordon, Molecular biology of Ri-plasmide, *J Biosci – Indian Acad Sci*, 11, 47–57 (1987).
- [15]. J.J. Doyle, J.L. Doyle, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15 (1987).
- [16]. X. Lan, H. Quan, Hairy root culture of *Przewalskia tangutica* for enhanced production of pharmaceutical tropane alkaloids, *J. Med. Plant. Res*, 4, 14, 1477–1481 (2010).
- [17]. S. Yasmin, M.A. Kashmiri, M.N. Asghar, M. Ahmad, A. Mohy-ud-Din, Antioxidant potential and radical scavenging effects of various extracts from *Abutilon indicum* and *Abutilon muticum*, *Pharm Biol*, 48, 3, 282–289 (2010).
- [18]. D.S.V.G.K. Kaladhar, S.K. Swathi, V. Vadlapudi, N.S. Yarla, Evaluation of anti-inflammatory and anti-proliferative activity of *Abutilon indicum* L. plant ethanolic leaf extract on lung cancer cell line A549 for system network studies, *J. Cancer Sci. Ther.*, 6, 6, 188–194 (2014).
- [19]. K. Tadera, Y. Minami, K. Takamatru, T. Matsuoka, Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 52, 149–153 (2006).
- [20]. C. Krisanapun, P. Peungvicha, R. Tamsiririrkkul, Y. Wongkrajang, Aqueous extract of *Abutilon indicum* Sweet inhibits glucose absorption and stimulates insulin secretion in rodents, *Nutrition Research* 29, 579–587 (2009).
- [21]. N.T.H. Thu, P.H.V. Thong, P.N.K. Tuyen, Q.N.D. Phuong, K. Pudhom, P.E. Hansen, N.K.P. Phung, Chemical constituents from *Sonneratia ovata* Backer and their in vitro cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activities, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 2366–2371 (2015).
- [22]. K. Ingkaninan, P. Temkitthawon, K. Chuenchom, T. Yuyaem, W. Thongnoi, Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies, *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 261–264 (2003).
- [23]. H.T.T. Minh, Q.N.D. Phuong, B.V. Lê, Nghiên cứu quy trình chuyển gene tạo rễ tơ in vitro cây đậu phộng (*Arachis hypogaea* L.) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* nhằm thu nhận Resveration, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 9, 4A, 665–672 (2011).