

Đánh giá hoạt tính sinh học và cảm ứng tạo rễ tơ cây búp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Vũ Thị Bạch Phượng, Cao Minh Đại, Phạm Thị Ánh Hồng, Quách Ngô Diễm Phương

Tóm tắt—Búp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.) là cây dược liệu được sử dụng trong nhiều bài thuốc dân gian để điều trị các bệnh về tim, thần kinh, gan mật, huyết áp cao, xơ cứng động mạch, viêm họng, ho, hạ đường huyết, nhuận tràng, lợi tiểu, sỏi thận, bệnh scorbut.... Nghiên cứu này tập trung vào việc khảo sát hoạt tính sinh học của cây búp giấm ngoài tự nhiên và chủ động tạo nguồn dược liệu ổn định có hoạt tính cao. Kết quả nghiên cứu của Yen và Duh cho thấy khả năng kháng oxy hóa của cao chiết rễ và lá búp giấm trồng ngoài tự nhiên cao hơn thân khi thực hiện phương pháp thử năng lực khử. Hoạt tính ức chế α -glucosidase của rễ cây búp giấm (IC_{50} là 0,2 mg/mL) cao hơn so với thân và lá. Nghiên cứu này đã tập trung vào việc cảm ứng tạo rễ tơ cây búp giấm thông qua sự chuyển gen của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. Kết quả đạt được cho thấy, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ và số rễ tơ được tạo ra từ mẫu lá là cao nhất (100% và 12,89 rễ). Kiểm tra sự chuyển gen rễ tơ bằng phương pháp PCR cho thấy gene rolB và rolC đã sáp nhập vào bộ gene của cây búp giấm và trong rễ tơ tạo thành không có sự hiện diện của gene virG từ vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng của việc sản xuất rễ tơ nhằm cung cấp nguồn nguyên liệu ứng dụng trong y dược từ cây búp giấm.

Từ khóa—*Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, búp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.), hoạt tính ức chế α -glucosidase, kháng oxy hóa, rễ tơ.

1 MỞ ĐẦU

Cây búp giấm thuộc chi *Hibiscus* có tên khoa học là *Hibiscus sabdariffa* L., là một loại thảo dược được trồng nhiều ở các quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới, đây là loại cây thuốc bản địa quan trọng của Ấn Độ, Malaysia và nhiều khu vực ở Trung Mỹ. Trong y học dân gian, búp giấm được sử dụng làm thuốc lợi tiểu, điều trị rối loạn

tiêu hóa, bệnh gan, sốt, tăng cholesterol máu, tăng huyết áp [1]. Ở nước ta, búp giấm được trồng ở nhiều nơi thuộc Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Hà Nội, Hà Tây, Ninh Bình, Kom Tum, Gia Lai... Lá búp giấm chua được dùng làm rau ăn, đài hoa rất chua được dùng làm giấm hoặc chế biến nước giải khát, sắc hay hãm uống giúp tiêu hóa và trị các bệnh về mật, tim và thần kinh, huyết áp cao và xơ cứng động mạch [2]. Trên thế giới, nhiều nhất là ở châu Âu, búp giấm được sử dụng trong chế biến thực phẩm làm nước sốt, mứt, trà khô, các loại nước ép, thạch, siro và hương liệu, chất tạo màu cho thực phẩm và đồ uống được làm từ đài hoa với nhiều giá trị dinh dưỡng tốt cho sức khỏe. Các lĩnh vực được thế giới quan tâm nghiên cứu như chế biến trà khô, chiết xuất anthocyanin từ đài hoa để nhuộm màu thực phẩm, đồ uống, nghiên cứu về hoạt tính sinh học như hoạt tính hạ sốt, chống oxy hóa, bảo vệ gan, giảm độc, hạ lipid máu, hạ huyết áp [3], kháng khuẩn, kháng viêm, ức chế enzyme α -amylase [4], và α -glucosidase [5]... Thành phần hóa học của cây búp giấm gồm những nhóm hợp chất như: anthocyanin, flavonoid, polyphenol, saponin, alkaloid, citric acid, malic, tartaric, allo-hydroxycitric, L-ascorbic acid, beta-carotene, beta-sitosterol, polysaccharide arabin và arabinogalactan, quercetin, gossypetin [6]. Trên thế giới đã có một vài nghiên cứu về vi nhân giống, nuôi cấy mô sẹo và tái sinh phôi cây búp giấm *in vitro* [7, 8]. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có nghiên cứu nào công bố về việc nuôi cấy rễ tơ cây búp giấm thông qua sự chuyển gen 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

Ngày nhận bản thảo: 05-05-2018; Ngày chấp nhận đăng: 10-7-2018, Ngày đăng: 31-12-2018.

Vũ Thị Bạch Phượng, Cao Minh Đại, Phạm Thị Ánh Hồng, Quách Ngô Diễm Phương - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

*Email: vtbpuong@hcmus.edu.vn

phần rễ, thân, lá cây búp giấm và nghiên cứu làm tăng thu nhận bộ phận có hoạt tính sinh học cao bằng kỹ thuật cảm ứng tạo rễ tơ cây búp giấm nhằm hướng tới mục tiêu cung cấp nguồn dược liệu có hoạt tính cao cho ngành dược.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hạt và các bộ phận lá, thân, rễ của cây búp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.) thu hái ngoài tự nhiên trưởng thành đã có hoa được thu hái tại thành phố Biên Hòa, tỉnh Đồng Nai.

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

Phương pháp

Đánh giá hoạt tính sinh học của các bộ phận cây búp giấm (Hibiscus sabdariffa L.) thu hái ngoài tự nhiên

Điều chế cao ethanol của ba bộ phận: Phương pháp điều chế cao được thực hiện theo kỹ thuật chiết ngâm dầm (maceration) [9]. Rễ, thân, lá của cây búp giấm ngoài tự nhiên rửa sạch bằng nước, phơi khô đến khối lượng không đổi, rồi xay nhuyễn thành bột khô. Ngâm bột cây trong ethanol tuyệt đối. Giữ yên ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Sau đó, dung dịch được chiết 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.

Định tính sự hiện diện của một số nhóm chức có trong cao chiết đã điều chế từ ba bộ phận khác nhau của cây búp giấm bằng các phản ứng định tính hóa học đặc trưng [9]: mẫu thử nghiệm được pha trong ethanol tuyệt đối với nồng độ 1 mg/mL.

Định tính phenol bằng $FeCl_3$: cho 1 ml dung dịch $FeCl_3$ 5% vào 1 mL dung dịch chất cần thử. Phản ứng dương tính khi có màu xanh dương đen.

Định tính quinone, coumarin bằng thuốc thử Bortrager với KOH: nhỏ 1 mL dung dịch 5% KOH trong methanol vào 1 mL dung dịch chất cần thử. Các quinone, coumarin sẽ cho màu đỏ, tím hoặc xanh lục.

Định tính tanin: cho 1 mL dung dịch chất cần thử vào hỗn hợp gồm NaCl (5 g), gelatin (0,5 g) hòa tan trong 100 mL nước cất. Phản ứng dương

tính có tanin khi xuất hiện trầm hiện màu vàng nhạt, để lâu hóa nâu.

Định tính alkaloid: cho hỗn hợp gồm 1 mL dung dịch thử nghiệm và 1 mL sulfuric acid 1% vào ống nghiệm để tiến hành định tính alkaloid bằng thuốc thử Wagner: hòa tan 1,27 g I_2 và 2 g KI trong 20 mL nước cất; hòa trộn hai dung dịch, thêm nước cất cho đủ 100 mL; nhỏ 0,2 mL thuốc thử vào dung dịch acid loãng; mẫu có alkaloid sẽ xuất hiện tủa màu nâu.

Định tính flavonoid tác dụng với H_2SO_4 đậm đặc: nhỏ 0,5 mL H_2SO_4 đậm đặc vào thành ống nghiệm mang 1 mL dịch thử nghiệm; flavone và flavanol cho màu vàng đậm đến màu cam và có phát huỳnh quang; chalcone, aurone cho màu đỏ đậm đến xanh dương-đỏ; flavanon cho màu cam đến đỏ.

Tác dụng với dung dịch 1% NaOH/ethanol: nhỏ 0,5 mL NaOH 1% vào 1 mL dung dịch thử nghiệm, mẫu là flavon, isoflavone, isoflavanone, flavanol, chalcone, leucoanthocyanin sẽ có màu vàng; flavanol cho màu từ vàng đến cam; auron cho màu đỏ đến đỏ tím.

Tác dụng với dung dịch 1% $AlCl_3$ /ethanol: nhỏ 0,5 mL $AlCl_3$ 1% vào 1 mL dung dịch thử nghiệm; tùy theo khối lượng, vị trí các nhóm hydroxy – OH, hợp chất flavonoid có màu khác nhau từ xanh lục đến xanh đen.

Định tính saponin: chuẩn bị 2 ống nghiệm; ống 1 gồm 5 mL HCl 0,1N (pH=1), 0,3 mL dung dịch mẫu thử; ống 2 gồm 5 mL NaOH 0,1N (pH=13), 0,3 mL dung dịch mẫu thử; bịt miệng ống nghiệm và lắc mạnh trong 1 phút và để yên; quan sát cột bong bóng trong cả hai ống nghiệm: cột bọt trong cả 2 ống nghiệm cao bằng nhau và bọt có độ bền như nhau, mẫu có saponin triterpenoid; ống pH=13 có cột bọt cao hơn so với ống pH=1, mẫu có saponin steroid.

Khảo sát khả năng khử của các bộ phận cây búp giấm [10]: hút 1 mL chất thử nghiệm, vitamin C (chứng dương), ethanol (chứng âm) vào từng ống nghiệm, thêm 2,5 mL dung dịch đệm sodium phosphat 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 acid trichloroacetic 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 FeCl_3 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 hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các bộ phận cây búp giấm [11]: Cho 50 μL dung dịch cao chiết vào 40 μL dung dịch enzyme α -glucosidase (0,2 U/mL) ở nhiệt độ phòng trong 20 phút, bổ sung 40 μL cơ chất *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) (5 mM), ở nhiệt độ phòng 20 phút. Cuối cùng, 130 μL dung dịch Na_2CO_3 0,2M được cho vào sẽ bắt màu sản phẩm tạo ra là *p*-nitrophenol và dừng 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.

Chỉ tiêu theo dõi: % ức chế α -glucosidase = $[(\text{chứng âm} - \text{blank chứng âm}) - (\text{mẫu thử} - \text{blank mẫu thử}) / (\text{chứng âm} - \text{blank chứng âm})] \times 100$

Cảm ứng tạo rễ tơ cây búp giấm (Hibiscus Sabdariffa L)

Tạo cây con *in vitro*: Hạt cây búp giấm được khử trùng bằng ethanol 80% 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 2 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 *Agrobacterium 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 của cây *in vitro* được tạo vết thương bằng dao cấy vô trùng và ngâm trong dịch vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 trong 20 phút. Sau đó,

các mẫu cấy được chuyển sang môi trường MS để đồng nuôi cấy trong thời gian 5 ngày ở điều kiện tối. Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu được chuyển vào môi trường MS rắn bổ sung cefotaxime (250 mg/L) để loại bỏ vi khuẩn trong điều kiện tối. 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 gen chuyển của các mẫu rễ tơ đã được cảm ứng [14]: Rễ tơ cây búp giấm được tách chiết DNA theo phương pháp CTAB của Doyle [15]. Phương pháp PCR được tiến hành nhằm xác định sự chuyển gen *rolB*, *rolC* từ vi khuẩn vào tế bào thực vật, đây là những gen nằm trong vùng T-DNA. Đồng thời, tiến hành PCR với gen *virG*, là gene nằm trong plasmid của *A. rhizogenes* và ngoài vùng T-DNA nhằm xác định sự hiện diện của vi khuẩn trong rễ tơ tạo thành. 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 μL bao gồm: 2 μL DNA; 2 μL primer 5 μM ; 2,5 μL dNTP 2 mM, 5 μL dung dịch đệm phản ứng PCR 1X, 1 μL Taq polymerase 1U (Bioline) và nước cất vô trùng vừa đủ 25 μL . Phản ứng PCR gồm các bước: biến tính bước đầu (95°C/5 phút), 35 chu kỳ lặp lại (94°C/30 giây, 54°C/30 giây, 72°C/60 giây) và bước kéo dài cuối cùng (72°C/5 phút) và bảo quản ở 4°C.

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%.

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

Gen	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

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá hoạt tính sinh học của các bộ phận cây búp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.) thu hái ngoài tự nhiên

Định tính sự hiện diện của một số nhóm chức có trong cao chiết đã điều chế từ ba bộ phận khác

nhau của cây búp giấm bằng các phản ứng định tính hóa học đặc trưng:

Mẫu thử nghiệm được pha trong ethanol tuyệt đối với nồng độ 1 mg/mL, kết quả định tính được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả định tính sự hiện diện của một số nhóm chức có trong cao chiết của rễ, thân, lá búp giấm

Nhóm chức	Thuốc thử	Rễ	Thân	Lá
Phenol	FeCl ₃	+ (tủa màu xanh đen)	+ (tủa màu vàng)	+ (tủa màu xanh)
Quinon, coumarin	Bortrager với KOH/methanol	+ (tủa màu đỏ)	+ (tủa màu xanh lục)	- (không có tủa)
Tanin	Gelatin mặn	+ (tủa màu vàng nhạt)	+ (tủa màu vàng nhạt)	+ (tủa màu vàng nhạt)
Alkaloid	Wagner	+ (tủa màu nâu)	+ (tủa màu nâu)	+ (kết tủa màu nâu)
Flavonoid	H ₂ SO ₄ đậm đặc	+ (màu đỏ)	+ (màu cam)	+ (màu cam)
	NaOH 1%	+ (màu cam đỏ)	+ (màu vàng)	+ (màu vàng)
	AlCl ₃ 1%	+ (màu xanh lục)	+ (màu xanh lục)	+ (màu xanh đen)
Saponin	Thử tính tạo bọt với HCl 0,1N	- (không có cột bọt bền)	- (không có cột bọt bền)	- (không có cột bọt bền)
	Thử tính tạo bọt với NaOH 0,1N	+ (có cột bọt bền)	- (không có cột bọt bền)	- (không có cột bọt bền)

Chú thích: (-): Không có. (+): Có

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy cả ba bộ phận rễ, thân, lá của cây búp giấm đều có chứa nhóm hợp chất phenol, tanin, alkaloid, flavonoid. Ba loại thuốc thử khác nhau để định tính flavonoid đều cho kết quả dương tính, điều này thể hiện sự đa dạng về các nhóm flavonoid trong cây búp giấm. Rễ và thân đều có chứa quinone, coumarin nhưng lá lại không có. Rễ có chứa saponin steroid, thân và lá không có saponin.

Khảo sát khả năng khử của các bộ phận cây búp giấm

Cao chiết các bộ phận có nồng độ 2 mg/mL, chứng dương vitamin C có nồng độ là 0,5 mg/mL

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 C (Chứng dương)	2,2550 ^a ± 0,0075
Ethanol (Chứng âm)	0,0000 ^d ± 0,0000
Rễ	0,6920 ^b ± 0,0160
Thân	0,4900 ^c ± 0,0235
Lá	0,7033 ^b ± 0,0310

Chú thích: 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 lá của cây búp giấm thể hiện khả năng kháng oxy hóa cao hơn thân. Đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới cho

thấy khả năng kháng oxy hóa của cây búp giấm ở các bộ phận như cánh hoa [17], đài hoa, hạt, lá và thân [18], tuy nhiên, rễ là bộ phận chưa có nghiên cứu nào công bố về hoạt tính kháng oxy hóa. Norhaizan và đồng tác giả (2010) đã cho thấy khả năng kháng oxy hóa của cao chiết nước cũng như methanol của lá búp giấm đều cao hơn so với thân. Kết quả nghiên cứu này đã chứng minh được giá trị dược tính của rễ cây búp giấm cũng tương đương so với lá, là bộ phận được dân gian thường hay sử dụng.

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase của các bộ phận cây búp giấm

Cao chiết các bộ phận có nồng độ 2 mg/mL, chứng dương acarbose có nồng độ là 20 mg/mL.

Bảng 3. % ức chế α-glucosidase của 3 bộ phận rễ, thân, lá cây búp giấm

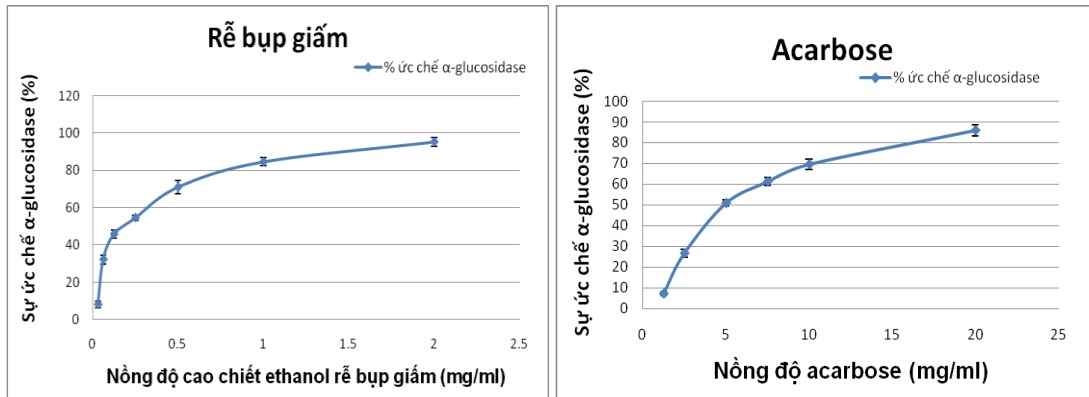
Bộ phận	% ức chế
Rễ	95,162 ^{a*} ± 0,598
Thân	35,741 ^c ± 0,491
Lá	28,689 ^d ± 0,545
Chứng dương (acarbose)	83,990 ^b ± 0,989

Chú thích: Các kí hiệu a, b... biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Kết quả Bảng 3 cho thấy rễ cây búp giấm là bộ phận ức chế α-glucosidase cao nhất (95,162%),

cao hơn cả chứng dương là acarbose (83,990%), thân (35,741%), lá (28,689%). 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 búp giấm, chứng dương là acarbose, kết quả được thể hiện ở đồ thị Hình 1.



Hình 1. Đường tương quan giữa % ức chế α -glucosidase và nồng độ cao chiết ethanol rễ cây búp giấm và acarbose

Nội suy từ đường tương quan giữa % ức chế α -glucosidase và nồng độ chất ức chế, IC₅₀ của cao chiết ethanol rễ cây búp giấm và acarbose (Hình 1) đã được xác định. Giá trị IC₅₀ của cao chiết ethanol rễ búp giấm là 0,2 mg/mL và giá trị IC₅₀ của acarbose là 5,5 mg/mL. Kết quả cho thấy rễ cây búp giấm có hoạt tính ức chế α -glucosidase cao hơn cả viên thuốc glucarbose 50 mg được bán trên thị trường để chữa bệnh tiểu đường gấp 27,5 lần. Trên thực tế, lá và đài hoa của cây búp giấm là hai bộ phận hay được dùng làm thức ăn và dùng trong các bài thuốc dân gian nhưng kết quả nghiên cứu cho thấy rễ lại là bộ phận có hoạt tính ức chế α -glucosidase cao hơn lá. Rõ ràng, kết quả có thể giúp chúng ta khai thác tốt hơn giá trị sử dụng của cây búp giấm mà dân gian hiện đang sử dụng theo thói quen. Hiện tại, mới chỉ có các nghiên cứu trên thế giới công bố về vai trò của đài hoa búp giấm trong điều trị bệnh tiểu đường ở chuột [19] và khả năng ức chế α -amylase [4], α -glucosidase *in vitro* [5], mà chưa thấy nghiên cứu nào ở các bộ phận khác của cây búp giấm. Do đó, kết quả này đã góp phần chứng minh được giá trị tiềm năng của rễ cây búp giấm trong việc làm nguồn nguyên liệu hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường tuýp 2.

Đánh giá chung về các kết quả khảo sát hoạt động sinh học đối với các bộ phận cây búp giấm

Từ kết quả của hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được khảo sát trong nghiên cứu này cho thấy rễ của cây búp giấm là bộ phận có hoạt tính sinh học tiềm năng hơn so với thân và lá, đặc biệt ở hoạt tính ức chế

enzyme α -glucosidase. Đồng thời, ở cây búp giấm có rễ, thân, lá đều chứa nhóm hợp chất thứ cấp như phenol, tanin, alkaloid, flavonoid. Do đó, việc nghiên cứu nhằm chủ động tạo ra nguồn rễ cây búp giấm là việc làm có ý nghĩa rất quan trọng, và đó là lý do mà những nghiên cứu về nuôi cấy rễ trong bước tiếp theo đã được tiến hành.

Cảm ứng tạo rễ tơ cây búp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Tạo cây con *in vitro*: Hạt cây búp giấm sau 2 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 2).



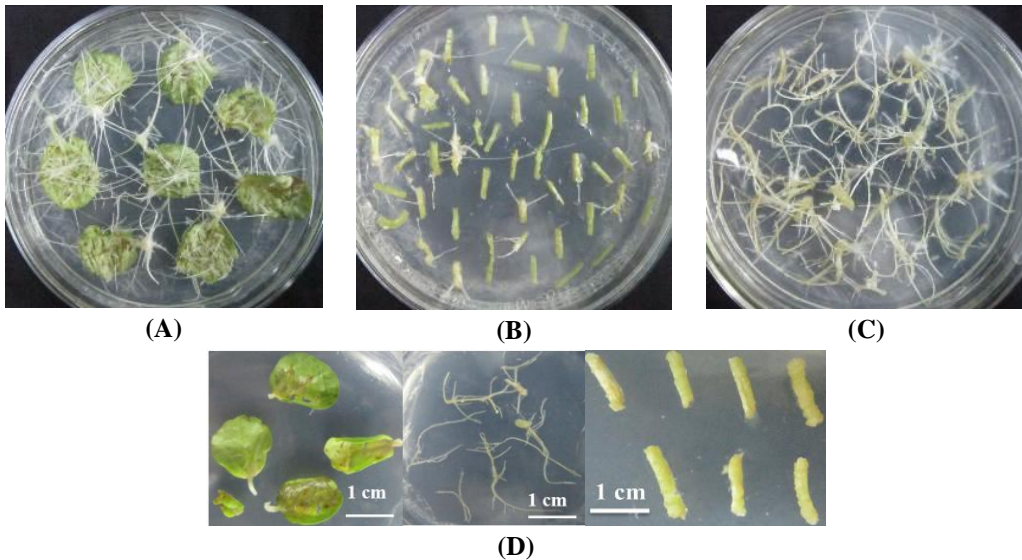
Hình 2. Cây búp giấm (*Hibiscus Sabdariffa* L.) 2 tuần tuổi

Cảm ứng tạo rễ tơ: Sau 22 ngày cảm ứng và nuôi cấy tạo rễ tơ cây búp giấm, kết quả được trình bày ở Bảng 5 và Hình 3.

Bảng 5. Tỷ lệ tạo rễ và số rễ cảm ứng từ vị trí vết thương các bộ phận khác nhau của cây búp giấm

Mẫu	% tạo rễ	Số rễ/mẫu
Lá	100,00 ^a ± 0,00	12,89 ^a ± 0,29
Thân	53,71 ^b ± 3,38	3,89 ^b ± 0,22
Rễ	43,60 ^c ± 4,83	4,78 ^b ± 0,29

Chú thích: Các chữ cái a, b, c biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.



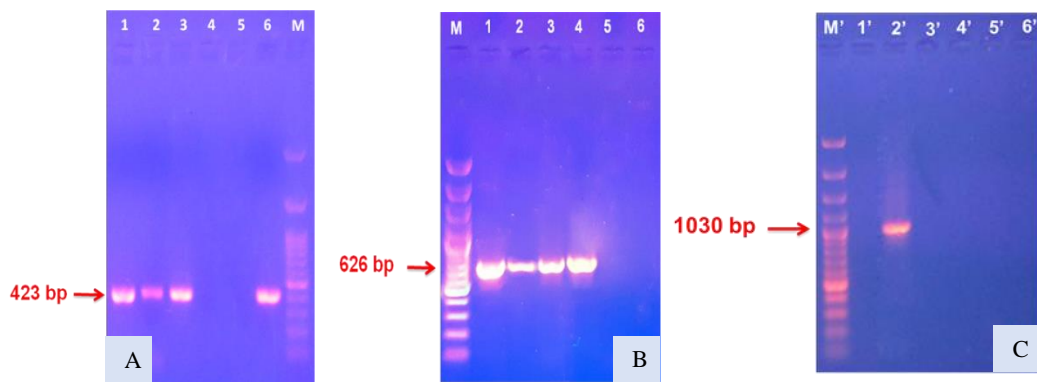
Hình 3. Rễ tơ được cảm ứng từ các bộ phận khác nhau của cây búp giấm sau 22 ngày nuôi cấy. (A) mẫu lá; (B) mẫu thân; (C) mẫu rễ; (D) mẫu đối chứng của lá, thân, rễ

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy các bộ phận khác nhau của cây búp giấm đã xâm nhiễm *A. rhizogenes* ATCC 15834 đều cảm ứng ra rễ nhưng với tỷ lệ khác nhau. Mẫu đối chứng không có sự hình thành rễ và vẫn còn xanh sau 22 ngày chứng tỏ mẫu vẫn sống nhưng vốn không có khả năng tự cảm ứng tạo rễ (Hình 3). Phần trăm cảm ứng tạo rễ và số rễ trên mỗi mẫu ở lá là cao nhất (100% và 12,89 rễ/mẫu), tiếp theo là ở mẫu thân (53,71% và 3,89 rễ/mẫu) và thấp nhất là ở mẫu rễ (43,6% và 4,78 rễ/mẫu). Như vậy, vật liệu thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ cây búp giấm là lá của cây con *in vitro*. Kết quả tạo rễ tơ cây búp giấm cao hơn so với kết quả 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 [13]. Điều này cho thấy tiềm năng của việc nuôi cấy sinh khối rễ tơ cây búp giấm với lượng lớn nhằm chủ động tạo ra nguồn dược liệu là hoàn toàn có thể thực hiện được.

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

Các mẫu rễ được cảm ứng từ ba bộ phận rễ, thân, lá cây búp giấm đều được kiểm tra gen 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 được cảm ứng từ ba bộ phận rễ, thân, lá cây búp giấm đều có gene chuyển của *A. rhizogenes* ATCC 15834 (Hình 4).



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp mồi *rolB*, *rolC* và *virG*

A) Kết quả PCR với cặp mồi *rolB*. Giếng M, thang 100bp; giếng 1,2,3, rễ tơ được cảm ứng từ 3 bộ phận rễ, thân, lá của cây búp giấm bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 4, cây búp giấm *in vitro* không xâm nhiễm *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 5, chứng âm của phản ứng PCR; giếng 6, chứng dương DNA tổng của *A. rhizogenes* ATCC 15834.

B) Kết quả PCR với cặp mồi *rolC*, Giếng M, thang 100bp plus; giếng 1, chứng dương DNA tổng của *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 2,3,4, rễ tơ được cảm ứng từ 3 bộ phận rễ, thân, lá của cây búp giấm bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 5, cây búp giấm *in vitro* không xâm nhiễm *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 6, chứng âm của phản ứng PCR.

C) Kết quả PCR với cặp mồi *virG*. Giếng M', thang 100bp plus; giếng 1', chứng âm của phản ứng PCR; giếng 2', chứng dương DNA tổng của *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 3',4',5', rễ tơ được cảm ứng từ 3 bộ phận rễ, thân, lá của cây búp giấm bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834; giếng 6', cây búp giấm *in vitro* không xâm nhiễm *A. rhizogenes* ATCC 15834.

Kết quả điện di ở Hình 4 cho thấy các giếng phản ứng PCR của đối chứng âm đều không có sản phẩm khuếch đại. Phản ứng PCR của mẫu chứng dương (DNA tổng của *A. rhizogenes* ATCC 15834) với 3 cặp mồi *rolB*, *rolC* và *virG* cho sản phẩm khuếch đại đặc hiệu vùng trình tự tương ứng 423 bp, 626 bp và 1030 bp. Sản phẩm PCR của mẫu cây búp giấm *in vitro* không xâm nhiễm *A. rhizogenes* không có sự hiện diện của gen *rolB* và *rolC*. Trong khi sản phẩm PCR của bộ gen rễ tơ cây búp giấm được cảm ứng từ 3 bộ phận rễ, thân, lá với ba cặp mồi *rolB*, *rolC* và *virG* khi điện di đều có sự xuất hiện của gene *rolB* và *rolC* nhưng không có sự hiện diện của gene *virG*. Rõ ràng, gene *rolB* và *rolC* từ Ri plasmid của *A. rhizogenes* ATCC 15834 đã sáp nhập thành công vào bộ gen rễ tơ của cây búp giấm.

4 KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu đã này góp phần chứng minh giá trị dược liệu của rễ cây búp giấm trong việc sử dụng làm nguồn dược liệu từ thực vật. Cao chiết ethanol từ các bộ phận cây búp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.) có đều khả năng khử và ức chế α -glucosidase. Trong đó cao chiết rễ có hoạt tính sinh học cao nhất. Tỷ lệ cảm ứng rễ tơ ở

cây búp giấm từ 43,6% đến 100% tùy thuộc vào loại bộ phận của cây.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số C2018-18-18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A.S.N. Formagio, D.D. Ramos, M.C. Vieira, S.R. Ramalho, M.M. Silva, N.A. Zárate, M.A. Foglio, J.E. Carvalho, "Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties". *Braz. J. Biol.*, vol. 75, no. 1, pp. 69–76, 2015.
- [2]. Đ.T. Xuyên, N.K. Khôi, "Đặc điểm và phân bố của các loài cây thuốc họ Bông ở Việt Nam". *Tạp chí Dược liệu*, vol. 7, no. 5, 133–137, 2002.
- [3]. C.H. Peng, C.C. Chyau, K.C. Chan, T.H. Chan, C.J. Wanq, *Hibiscus sabdariffa* polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol., no. 18, pp. 9901–9909, 2011.
- [4]. C. Hansawasdi, J. Kawabata, T. Kasai T, Alpha-amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 5, pp. 1041–1043, 2000.
- [5]. I. Ifie, L. Abrankó, J.A. Villa-Rodriguez, N. Papp, P. Ho, G. Williamson, L.J. Marshall, The effect of ageing temperature on the physicochemical properties,

- phytochemical profile and α -glucosidase inhibition of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) wine, *Food Chemistry*, 2017.
- [6]. B.B. Mohamed, A.A. Sulaiman, A.A. Dahab, Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Sudan, Cultivation and Their Uses. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, vol. 1, no. 6, pp. 48–54, 2012.
- [7]. S.S. Raoul, C. Gilbert, F.S. Hamidou, T. Yannick, D. Yao, S. Abdourahamane, B. Michel, Protocols for callus and somatic embryo initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): Influence of explant type, sugar, and plant growth regulators. *AJCS*, vol. 4, no. 2, pp. 98–105, 2010.
- [8]. J. Govinden-Soulangé, N. Boodia, C. Dussoo, R. Gunowa, S. Deensah, S. Facknath, B. Rajkomar, Vegetative Propagation and Tissue Culture Regeneration of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle). *World J. Agric. Sci.*, vol. 5, no. 5, pp. 651–661, 2009..
- [9]. N.K.P. Phụng, Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP.HCM, 2007.
- [10]. G.C. Yen, P.D. Duh, “Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 70, no. 4, pp. 383–386, 1993.
- [11]. 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*, 2010.
- [12]. T. Murashige, F. Skoog, A Revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, vol. 15, pp. 473–497, 1962.
- [13]. H.T.T. Minh, Q.N.D. Phuong, B.V. Lê, Nghiên cứu quy trình chuyển gen tạo rễ to *in vitro* cây đậu phộng (*Arachis hypogaea* L.) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* nhằm thu nhận resveratrol. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, vol. 9, no. 4A, pp. 665–672, 2011.
- [14]. V.P. Sinkar, F.F. White, M.P. Gordon, Molecular biology of Ri-plasmid. *J Biosci – Indian Acad Sci*, 11, pp. 47-57, 1987.
- [15]. J.J. Doyle, J.L. Doyle, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, no.19, pp. 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.*, vol. 4, no. 14, pp. 1477–1481, 2010.
- [17]. A.P. Obouayeba, N.B. Djyh, S. Diabate, A.J. Djaman, J.D. N'guessan, M. Kone, T.H. Kouakou, Phytochemical and Antioxidant Activity of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Petal Extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5, 2, 2014.
- [18]. M.E. Norhaizan, S.H. Fong, I. Amin, L.Y. Chew, Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry*, 122, pp. 1055–1060, 2010.
- [19]. J.M. Sini, I.A. Umar, H.M. Inuwa, “The beneficial effects of extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces in alloxan-diabetic rats: Reduction of freeradical load and enhancement of antioxidant status”. *J. Pharmacognosy Phytother.*, vol. 3, no. 10, pp. 141–149, 2011.

Biological activity and hairy roots induction of *Hibiscus sabdariffa* L.

Vu Thi Bach Phuong*, Cao Minh Dai, Pham Thi Anh Hong, Quach Ngo Diem Phuong
VNUHCM-University of Science

*Corresponding author: vtbpuong@hcmus.edu.vn

Received: 05-05-2018; Accepted: 10-7-2018; Published: 31-12-2018

Abstract—*Hibiscus sabdariffa* L. has been used traditionally in many countries of the world as food, especially as a flavouring agent in food industry. *H. Sabdariffa* is used for treating heart, nerve, liver disease, high blood pressure, arteriosclerosis, sore throat, cough, hypoglycaemia, laxative, diuretic, kidney stone, scurvy... The aims of this study are evaluation of bioactivities of *H. Sabdariffa* and the production of transformed hairy root of *H. Sabdariffa* for pharmaceutical production. In this study, Yen and Duh method showed the reducing power of ethanol the root extract and leaf extract are higher than that of stem. The root extract showed the α -glucosidase inhibitory activity with IC_{50} at 0.2 mg/mL is higher than those of stem and leaf. These

results shows that root has higher bioactivities than stem and leaf. In this study, hairy roots of *H. Sabdariffa* were successfully induced 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 (100% and 12.89 roots). The stable introduction of rolB and rolC genes of *A. rhizogenes* ATCC 15834 into *H. Sabdariffa* plants was confirmed by PCR analysis. Besides, the absence of virG gene confirmed hairy roots as bacteria-free. Subsequently, these results demonstrated that *H. Sabdariffa*, particularly the roots, has great potential as pharmacological values and hairy root production can be used as pharmaceutical sources.

Keywords—*Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, *Hibiscus sabdariffa* L., α -glucosidase inhibitor activity, antioxidant, hairy root.