

Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của rễ tơ một số loài cây họ bông (Malvaceae) được cảm ứng từ chủng *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834

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

Tóm tắt—Một trong những phương pháp hiệu quả để điều trị bệnh tiểu đường tuýp 2 hiện nay là sự ức chế enzym α -glucosidase trong ruột nhằm làm chậm quá trình giải phóng glucose từ các carbohydrate trong khẩu phần ăn, làm giảm mức glucose trong huyết tương và ngăn ngừa tăng đường huyết sau bữa ăn. Do đó, việc nghiên cứu để tìm ra các chất ức chế α -glucosidase có nguồn gốc từ thực vật dùng trong điều trị bệnh tiểu đường là mối quan tâm của nhiều nhà khoa học hiện nay. Dựa trên những thành tựu mà công nghệ nuôi cấy rễ tơ đã đạt được, nghiên cứu này tập trung vào việc thử nghiệm khả năng cảm ứng tạo rễ tơ từ chủng *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 trên sáu loài thực vật thuộc họ Bông (Malvaceae) gồm Ké hoa đào (*Urena lobata*), Cối xay (*Abutilon indicum*), Bụp giấm (*Hibiscus Sabdariffa*), Dâm bụt (*Hibiscus rosa-sinensis*), Chối đực (*Sida acuta*) và Ké hoa vàng (*Sida rhombifolia*), nhằm khảo sát hoạt tính ức chế α -glucosidase của các rễ tơ tạo thành để chọn ra được rễ tơ của loài thực vật có hoạt tính ức chế α -glucosidase tiềm năng. Kết quả nghiên cứu cho thấy đã cảm ứng tạo rễ tơ thành công sáu loài cây họ Bông thông qua sự chuyển gen của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. Trong đó, tỉ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Bụp giấm và Ké hoa đào là cao nhất. Kiểm tra sự chuyển gen rễ tơ bằng phương pháp PCR cho thấy gen *rolB* và *rolC* đã sát nhập vào bộ gen của sáu loài cây họ Bông. Ở điều kiện nuôi cấy lỏng lác trên môi trường MS, rễ tơ Ké hoa đào, Bụp giấm và Chối đực phát triển tốt hơn các cây còn lại nên được chọn để tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế α -glucosidase. Kết quả cho thấy rễ tơ Ké hoa đào có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh hơn rễ tơ các cây được khảo sát, với giá trị IC₅₀

là 7,65 μ g/ml. Kết quả nghiên cứu này chứng minh tiềm năng của việc sản xuất rễ tơ của các cây họ Bông, đặc biệt là cây Ké hoa đào trong việc cung cấp nguồn nguyên liệu có hoạt tính hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường tuýp 2.

Từ khóa—*Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, hoạt tính ức chế α -glucosidase, rễ tơ, Ké hoa đào (*Urena lobata* L.), Cối xay (*Abutilon indicum* L.), Bụp giấm (*Hibiscus Sabdariffa* L.), Dâm bụt (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), Chối đực (*Sida acuta* Burm.f.), Ké hoa vàng (*Sida rhombifolia* L. var. *parvifolia* Gagn.)

1 GIỚI THIỆU

Bệnh tiểu đường hay còn gọi là đái tháo đường đang là căn bệnh gây tỉ lệ tử vong cao và có xu hướng trẻ hóa. Trong những năm gần đây, bệnh tiểu đường đang là một trong những nguyên nhân chính gây tử vong hàng đầu ở hầu hết các quốc gia trên thế giới. Một trong những biện pháp điều trị bệnh tiểu đường tuýp 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 enzym α -glucosidase trong ruột. Do đó, các chất ức chế α -glucosidase có thể làm chậm quá trình giải phóng glucose từ các carbohydrate phức tạp trong khẩu phần ăn và làm chậm sự hấp thu glucose, làm giảm mức glucose trong huyết tương và ngăn ngừa tăng đường huyết sau bữa ăn. Dựa trên cơ sở đó, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để xác định các chất ức chế α -glucosidase hiệu quả từ các nguồn tự nhiên đặc biệt là từ thực vật để phát triển thành các hợp chất chủ lực dùng trong điều trị bệnh tiểu đường. Nhiều chất ức chế α -glucosidase đã được phân lập từ thực vật là các

Ngày nhận bản thảo: 04-06-2018; Ngày chấp nhận đăng: 15-9-2018; Ngày đăng: 31-12-2018

Vũ Thị Bạch Phượng*, Phạm Thị Ánh Hồng, Quách Ngô Diễm Phương - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM; *Email: vtbbphuong@hcmus.edu.vn

chất như flavonoid, alkaloid, terpenoid, anthocyanin, glycosid, các hợp chất phenolic [1].

Từ khi rễ tơ được công nhận không thuộc trong danh sách sinh vật biến đổi gen GMO (Genetically Modified Organism) do sự sát nhập gen tự nhiên của chính chủng *Agrobacterium rhizogenes* vào bộ gen thực vật [2], công nghệ nuôi cấy rễ tơ đã bùng nổ và nhanh chóng được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực của công nghệ sinh học thực vật, đặc biệt là việc tăng sinh khối rễ nhằm thu nhận hợp chất thứ cấp ở thực vật. Công nghệ nuôi cấy rễ tơ là một phương pháp đơn giản, hiệu quả và đang được đầu tư nghiên cứu rộng khắp trên thế giới do tính ưu việt của rễ tơ. Trong đó, điều đáng chú ý là rễ tơ có thể tăng trưởng nhanh chóng, ổn định di truyền, giúp thu sinh khối cao mà lượng mẫu sử dụng ban đầu ít, lại không cần đến chất điều hòa tăng trưởng thực vật và quan trọng là có thể sản xuất ra những chất biến dưỡng giống hay thậm chí chưa từng thấy ở cây mẹ [3]. Ví dụ như, Li và cộng sự 1998 đã tách được một hợp chất mới tên là liocagrodione từ nuôi cấy rễ tơ *Glycyrrhiza glabra* và chỉ ra rằng chất này có hoạt tính kháng khuẩn mạnh [4], hay nghiên cứu của Berkov và cộng sự 2003 đã cho thấy có sự tổng hợp của một este alkaloid tropane mới trong rễ tơ của *Datura stramonium* [5]. Theo thống kê năm 2004, có đến 185 loài thực vật từ 41 họ đã được nuôi cấy rễ tơ thành công [6]. Do việc thu hái rễ ngoài tự nhiên gặp nhiều khó khăn, nếu lấy rễ sẽ làm chết cây, lượng rễ thu hái được là rất hạn chế, phải đợi khoảng thời gian lâu đủ để cây trưởng thành mới thu hái được và phải phụ thuộc vào mùa vụ và thời tiết. Do đó, việc đầu tư nghiên cứu vào công nghệ nuôi cấy rễ tơ sẽ mang lại nhiều tiềm năng và những lợi ích lớn về kinh tế trong sản xuất nguồn dược liệu có giá trị.

Trong các họ thực vật ở Việt Nam thì họ Bông (Malvaceae) là một họ lớn và đa dạng về loài, có nhiều chi trong họ Bông là các loài cây dược liệu. Trong nghiên cứu này, sáu loài cây họ Bông được dùng để khảo sát thuộc bốn chi (*Urena*, *Sida*, *Hibiscus*, *Abutilon*) đó là: Ké hoa đào (*Urena lobata* L.), Cối xay (*Abutilon indicum* L.), Bụp giấm (*Hibiscus Sabdariffa* L.), Dâm bụt (*Hibiscus rosasinensis* L.), Chối đực (*Sida acuta* Burm.f.), Ké hoa vàng (*Sida rhombifolia* L var. *parvifolia* Gagn.), các loài cây này thường được dân gian dùng để hạ

đường huyết và hạ huyết áp. Do đó, để tìm hiểu và khai thác thêm về giá trị dược liệu của các loại cây thuốc dân gian, mục đích của nghiên cứu này là thử nghiệm khả năng cảm ứng tạo rễ tơ của sáu loài thực vật họ Bông bằng chủng *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. Đồng thời, khảo sát hoạt tính ức chế α -glucosidase của các rễ tơ được tạo thành nhằm chọn ra được rễ tơ của loài thực vật có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase tiềm năng để phục vụ cho việc nuôi cấy làm tăng năng suất thu nhận nguồn rễ tơ có giá trị dược liệu cao trong hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường tuýp 2.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hạt của các cây ké hoa đào, cối xay, bụp giấm, chối đực, ké hoa vàng và cánh non của cây dâm bụt được thu hái tại thành phố Biên Hòa, tỉnh Đồng Nai.

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

Cảm ứng tạo rễ tơ

Khử trùng tạo nguồn nguyên liệu *in vitro*

Khử trùng hạt: Hạt của năm loài cây Ké hoa đào, Cối xay, Bụp giấm, Chối đực, Ké hoa vàng được khử trùng bằng ethanol 80% trong 1 phút. Tiếp theo lãc và ngâm mẫu trong dung dịch NaOCl 2,5% trong 10 phút. Rửa hạt lại bằng nước cất vô trùng. Hạt sau khi khử trùng được đặt trên môi trường Murashige và Skoog (MS) [7]. Sau 2 tuần quan sát và ghi nhận kết quả khử trùng tạo cây con *in vitro*.

Khử trùng cành: Dâm bụt là loài cây hiếm khi thu được hạt nên để có được nguồn vật liệu *in vitro* nghiên cứu này đã tiến hành khử cành của cây ngoài tự nhiên. Chọn cành Dâm bụt còn non, không bị sâu bệnh rửa sạch, cắt lấy các đốt thân non. Mỗi đốt thân chứa một chồi ngủ được rửa với xà phòng và rửa sạch lại bằng nước cất. Sau đó chuyển vào tủ cấy, lãc mẫu với ethanol 80% trong 3 phút. Tiếp theo lãc và ngâm mẫu trong dung dịch NaOCl 2,5% trong 20 phút. Rửa mẫu lại bằng nước cất vô trùng. Mẫu sau khi khử trùng được đặt trên môi trường MS. Sau 2 tuần quan sát và ghi nhận kết quả khử trùng.

Nuôi cấy chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 được nuôi trên môi trường lỏng Yeast Mannitol Broth (YMB) [8], lắc với vận tốc 100 – 130 vòng/phút trong 48 giờ, ở 25°C nuôi trong điều kiện tối. Khi *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 phát triển và đạt độ đục tối giá trị OD_{600 nm} = 0,5 được thu nhận để gây nhiễm chuyển gen.

Phương pháp cảm ứng tạo rễ tơ [9]

Lá *in vitro* của sáu loài cây họ Bông được tạo vết thương bằng dao cắt vô trùng và ngâm trong dịch vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 trong 20 phút. Sau đó, mẫu được đặt lên giấy thấm vô trùng, để khô bề mặt và chuyển sang môi trường MS rắn không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật để trong 4 ngày ở điều kiện tối và nhiệt độ 25°C. Sau 4 ngày đồng nuôi cấy, mẫu được chuyển qua môi trường MS rắn có bổ sung kháng sinh cefotaxime (250 mg/l) để loại bỏ vi khuẩn trên mẫu. Sau 3 tuần cảm ứng, tiến hành quan sát và ghi nhận khả năng cảm ứng tạo rễ tơ của mẫu được khảo sát. Tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ (%) là số mẫu hình thành rễ tơ/số mẫu xâm nhiễm.

Kiểm tra gen chuyển của các mẫu rễ tơ đã được cảm ứng [10]

Để kiểm tra sự hiện diện của các gen chuyển từ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 trong rễ tơ, phản ứng PCR với các cặp primer đặc hiệu được tiến hành. Rễ tơ được tách chiết DNA theo phương pháp CTAB của Doyle [11]. Phương pháp PCR được tiến hành nhằm xác định sự chuyển gen *rol B*, *rol C* từ vi khuẩn vào tế bào thực vật, đồng thời cũng tiến hành PCR với gen *virG* để khẳng định sự chuyển gen của *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 vào thực vật.

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 kì lặp lại (94°C/30 giây, 54°C/30 giây, 72°C/60 giây) và bước kéo dài cuối cùng (72°C/5 phút) [12]. Trình tự primer dùng cho phản ứng PCR ở các gen *rolB*, *rolC* và *virG* được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự primer cho phản ứng PCR gen *rolB*, *rolC* và *virG* [12]

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

Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của rễ tơ tạo thành

Rễ tơ *in vitro* của các cây họ Bông được tiến hành chiết cao ethanol và khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase nhằm đánh giá tiềm năng trị bệnh tiểu đường của các loại rễ tơ tạo thành.

Điều chế cao ethanol của rễ tơ

Phương pháp điều chế cao được thực hiện theo kỹ thuật chiết ngâm dầm [13]. Rễ tơ phơi khô đến khối lượng không đổi, xay nhuyễn thành bột và ngâm trong ethanol tuyệt đối. Giữ yên ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Sau đó, dung dịch được chiết 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 hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase [14]

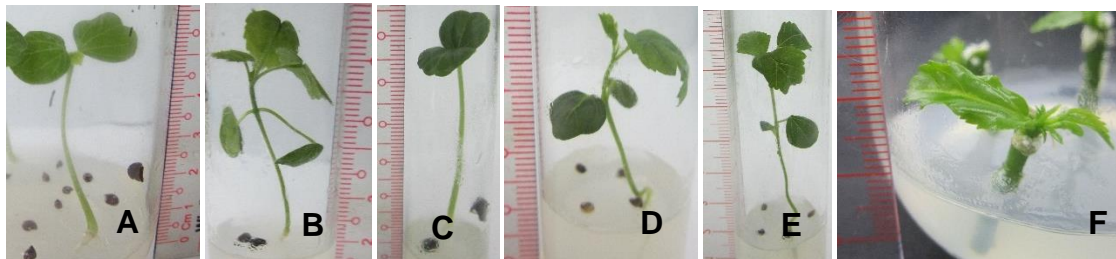
Cho 50 µl dung dịch cao chiết vào 40 µl dung dịch enzyme α -glucosidase (0,2 U/ml) ở nhiệt độ phòng trong 20 phút, bổ sung 40 µl cơ chất p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) (5 mM), ở nhiệt độ phòng 20 phút. Cuối cùng, 130 µl dung dịch Na₂CO₃ 0,2M được cho vào sẽ bắt màu sản phẩm tạo ra là p-nitrophenol và dừng phản ứng. Dựa trên mật độ quang tại 405 nm (OD₄₀₅), hoạt tính ức chế của mẫu thử được xác định và tính nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzyme (IC₅₀). Chứng dương là viên thuốc glucobay (acarbose 50mg) của công ty Bayer South East Asia Pte., Ltd. 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 =
$$\frac{\text{OD mẫu đối chứng} - \text{OD mẫu thử}}{\text{OD mẫu đối chứng}} \times 100$$

Phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu này 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%.



Hình 1. Cây con *in vitro* 2 tuần sau khi khử trùng. A, Ké hoa đào; B, Cối xay; C, Bụp giấm; D, Chối đực; E, Ké hoa vàng; F, Dâm bụt

Cảm ứng tạo rễ tơ

Sau 25 ngày cảm ứng và nuôi cấy tạo rễ tơ của sáu loài cây họ Bông, kết quả cho thấy Bụp giấm và Ké hoa đào là hai loài cây cho tỉ lệ cảm ứng tạo rễ tơ cao nhất đạt mức cao nhất (100% và 97,33%), tiếp theo là Cối xay 86,67% và Chối đực 78,67%, đạt tỉ lệ cảm ứng tạo rễ tơ thấp nhất là Dâm bụt 22,67% và Ké hoa vàng 34,33% (Bảng 2), trong khi các mẫu đối chứng không xâm nhiễm *Agrobacterium rhizogenes* đều không có sự cảm ứng tạo rễ tơ (Hình 2). Kết quả này chứng minh với cùng điều kiện cảm ứng tạo rễ tơ như nhau nhưng với những loài cây khác nhau sẽ cho tỉ lệ cảm ứng tạo rễ tơ khác nhau mặc dù các cây đó là cùng họ hay cùng chi.

Tỉ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ thông qua quá trình chuyển gen của *Agrobacterium rhizogenes* vào tế bào thực vật phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố. Ở cây trưởng thành, các mô hay cơ quan không có hoặc ít có khả năng phân phân hóa, cây còn non và cây mầm có khả năng phân phân hóa cao. Mô thực vật còn non thường được sử dụng cho việc xâm nhiễm tạo rễ tơ như trụ hạ diệp, lá mầm, cuống lá hoặc những lá còn non [15]. Trong nhiều nghiên cứu đã công bố, lá là bộ phận thường cho

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cảm ứng tạo rễ tơ

Khử trùng tạo nguồn nguyên liệu *in vitro*

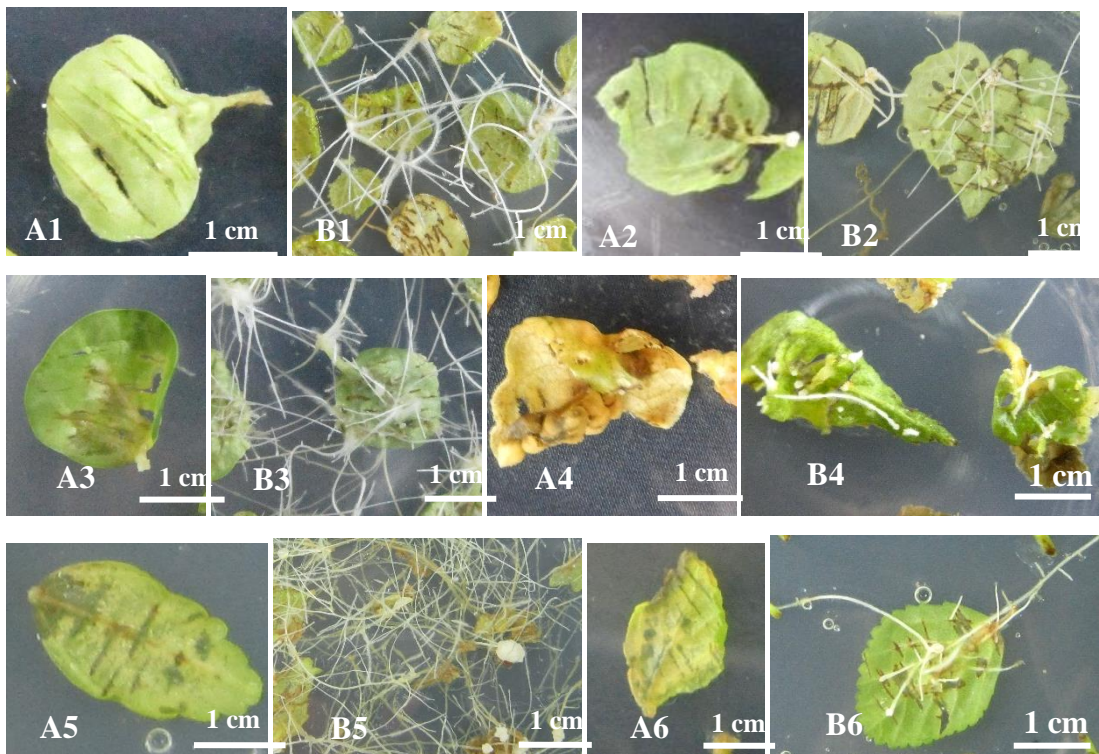
Hạt của năm loại cây Ké hoa đào, Cối xay, Bụp giấm, Chối đực và Ké hoa vàng cùng với mẫu đốt thân của cây Dâm bụt sau 2 tuần khử trùng và nuôi cấy trên môi trường MS cho tỉ lệ vô trùng đạt 90-100% và tạo được các cây con *in vitro* làm nguồn nguyên liệu cho thí nghiệm cảm ứng tạo rễ tơ (Hình 1).

tỉ lệ cảm ứng tạo rễ tơ cao nhất là do khả năng sản xuất số lượng lớn các tế bào chịu trách nhiệm đáp ứng với vết thương khi xâm nhiễm. Sự đáp ứng vết thương là yếu tố quan trọng nhất trong sự cảm ứng tạo rễ tơ [16]. Dựa trên các cơ sở đó, trong nghiên cứu này đã chọn lá của sáu cây họ Bông *in vitro* 2 tuần tuổi là đối tượng để khảo sát khả năng cảm ứng tạo rễ tơ, vì lá của cây con ở độ tuổi này đa số là các lá mầm và lá non, đây là mẫu mô thực vật thích hợp nhất cho sự cảm ứng tạo rễ tơ. Cùng với hướng nghiên cứu này, Stephanie (2006) khi khảo sát khả năng tạo rễ tơ từ hai loài cây thuộc họ Bông là *Gossypium hirsutum* và *Gossypium barbadense* cảm ứng bởi *A. rhizogenes* ATTC 15834 cũng cho thấy cả hai cây đều có lá mầm cho tỉ lệ tạo rễ tơ nhiều hơn trụ hạ diệp [17]. Mặt khác, Sujatha và cộng sự (2013) khi nghiên cứu sự cảm ứng tạo rễ tơ cây *Artemisia vulgaris* (Ngải cứu) bằng các chủng *Agrobacterium rhizogenes* khác nhau xâm nhiễm trên các mẫu cây chồi, lá và cuống lá, kết quả cũng cho thấy lá là bộ phận cho tỉ lệ tạo rễ tơ cao nhất ở tất cả các chủng khuẩn [18].

Bảng 2. Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ của sáu loài cây họ Bông

Loài thực vật	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)
Ké hoa đào	97,33 ^a ± 2,08
Cối xay	86,67 ^b ± 6,43
Bụp giấm	100,00 ^a ± 0,00
Dâm bụt	22,67 ^d ± 5,51
Chổi đực	78,67 ^b ± 6,11
Ké hoa vàng	34,33 ^c ± 5,86

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



Hình 2. Sự cảm ứng tạo rễ tơ ở sáu loài cây họ Bông. A, mẫu đối chứng; B, mẫu thử nghiệm; 1, Ké hoa đào; 2, Cối xay; 3, Bụp giấm; 4, Dâm bụt; 5, Chổi đực; 6, Ké hoa vàng

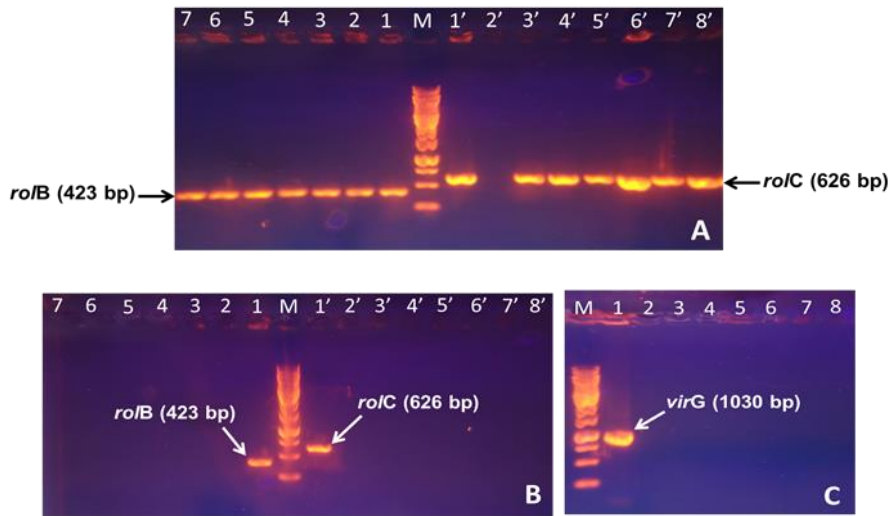
Kiểm tra gen chuyển của các mẫu rễ tơ đã được cảm ứng

Plasmid Ri của *A. rhizogenes* ATCC 15834 có vùng T-DNA chứa các gen *rol* chịu trách nhiệm cho sự cảm ứng tạo rễ tơ trên mô thực vật bị xâm nhiễm. Để chứng minh các gen này đã chèn thành công vào bộ gen rễ tơ của các cây họ Bông, chúng tôi thực hiện phản ứng PCR với các cặp primer đặc hiệu để phát hiện ba gen *rolB*, *rolC* và *virG*. Trong đó, gen *rolB*, *rolC* nằm trong vùng T-DNA, gen *virG* nằm ngoài vùng T-DNA.

Kết quả điện di ở Hình 3 cho thấy sản phẩm phản ứng PCR của mẫu chứng dương là plasmid Ri của *Agrobacterium 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 (giếng 1A và 1B), 626 bp (giếng 1'A và 1'B) và 1030 bp (giếng 1C). Sản phẩm PCR của mẫu đối chứng âm là rễ *in vitro* của cây Ké hoa đào, Cối xay, Bụp giấm, Dâm bụt, Chổi đực, Ké hoa vàng không được xâm nhiễm *Agrobacterium rhizogenes* không có sự hiện diện

của gen *rolB*, *rolC* và *virG* (các giếng ở bảng điện di B và C hình 3). Trong khi sản phẩm PCR của bộ gen rễ tơ của cây Ké hoa đào, Cối xay, Bụp giấm, Dâm bụt, Chổi đực, Ké hoa vàng với ba cặp mồi *rolB*, *rolC* và *virG* có sự xuất hiện của gen *rolB* và *rolC* (các giếng ở bảng điện di A hình 3) nhưng không có sự hiện diện của gen *virG* (các

giếng ở bảng điện di C hình 3). Kết quả này rõ ràng chứng minh cho thấy gen *rolB*, *rolC* từ plasmid Ri của *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 đã sát nhập thành công vào bộ gen rễ tơ của sáu loài cây họ Bông là Ké hoa đào, Cối xay, Bụp giấm, Dâm bụt, Chổi đực và Ké hoa vàng.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp mồi *rolB*, *rolC* và *virG*

A, Kết quả PCR với cặp mồi *rolB* và *rolC*, Giếng M, thang 100bp; Giếng 1 và 1', Plasmid Ri của *A. rhizogenes* ATCC 15834 với cặp mồi *rolB* và *rolC*; Giếng 2', chứng âm của phản ứng PCR; Giếng 2, 3, 4, 5, 6, 7 và 3', 4', 5', 6', 7', 8', DNA rễ tơ của cây Ké hoa đào, Cối xay, Bụp giấm, Dâm bụt, Chổi đực, Ké hoa vàng với cặp mồi *rolB* và *rolC*.

B, Kết quả PCR với cặp mồi *rolB* và *rolC*, Giếng M, thang 100bp; Giếng 1 và 1', Plasmid Ri của *A. rhizogenes* ATCC 15834 với cặp mồi *rolB* và *rolC*; Giếng 2', chứng âm của phản ứng PCR; Giếng 2, 3, 4, 5, 6, 7 và 3', 4', 5', 6', 7', 8', DNA mẫu đối chứng âm rễ *in vitro* của cây Ké hoa đào, Cối xay, Bụp giấm, Dâm bụt, Chổi đực, Ké hoa vàng không xâm nhiễm *A. rhizogenes* ATCC 15834 với cặp mồi *rolB* và *rolC*.

C, Kết quả PCR với cặp mồi *virG*. Giếng M, thang 100bp; Giếng 1, Plasmid Ri của *A. rhizogenes* ATCC 15834 với cặp mồi *virG*; Giếng 2, chứng âm của phản ứng PCR; Giếng 3, 4, 5, 6, 7, 8, DNA rễ tơ của cây Ké hoa đào, Cối xay, Bụp giấm, Dâm bụt, Chổi đực, Ké hoa vàng với cặp mồi *virG*.

Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các rễ tơ tạo thành

Rễ tơ của sáu loài cây họ Bông sau khi cảm ứng sẽ được thu nhận để nuôi cấy trên môi trường MS lỏng và lắc với vận tốc 80 vòng/phút, trong điều kiện tối hoàn toàn ở nhiệt độ 25°C để thu nhận sinh khối. Tuy nhiên, ở điều kiện nuôi cấy này chỉ có rễ tơ của ba loài cây đó là Ké hoa đào, Bụp giấm và Chổi đực là có hệ số tăng sinh khối rễ tơ cao khoảng từ 30-50 lần, tùy từng loài (Hình 4). Trong khi đó, rễ tơ của ba loài cây còn lại là

Dâm Bụt, Cối xay và Ké hoa vàng chậm phát triển hơn và sinh khối tăng rất ít, không đáng kể. Điều này có thể là do rễ tơ của cây Dâm Bụt, Cối xay và Ké hoa vàng không thích hợp với điều kiện nuôi cấy ở trên nên không phát triển. Do đó, việc đầu tư nghiên cứu sâu hơn về sự tăng sinh khối rễ tơ của các loài cây trên là cần thiết nhằm tạo ra những nguồn dược liệu có giá trị.

Trong nghiên cứu này, rễ tơ của ba loài cây có sinh khối tăng trưởng mạnh nhất là Ké hoa đào, Bụp giấm và Chổi đực sẽ được lựa chọn và thu

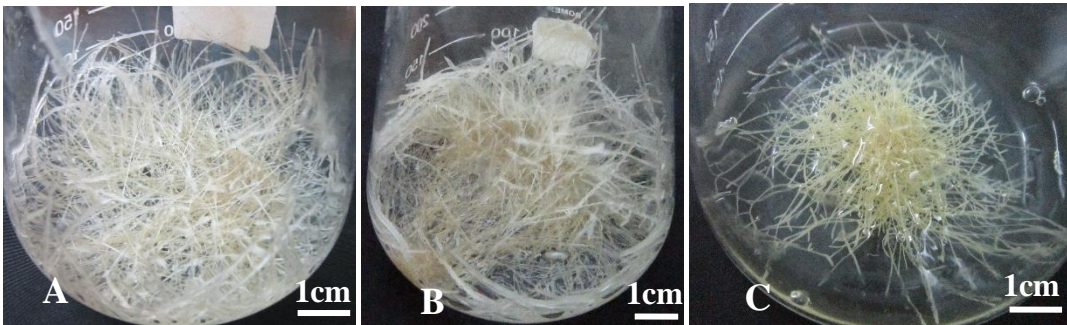
nhận để tiến hành chiết cao nhằm đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase.

Cao chiết ethanol rễ tơ của ba loài cây Ké hoa đào, Bụp giấm và Chối đực được đem đi khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase với nồng độ cao chiết là 2 mg/ml, chứng dương acarbose là viên thuốc glucobay có nồng độ là 20 mg/ml, kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Phần trăm ức chế enzyme α -glucosidase của rễ tơ cây Ké hoa đào, Bụp giấm và Chối đực

Loại rễ tơ	% ức chế
Ké hoa đào	98,090^a ± 1,016
Bụp giấm	74,287 ^c ± 3,246
Chối đực	63,997 ^d ± 3,161
Chứng dương (acarbose)	83,990 ^b ± 1,713

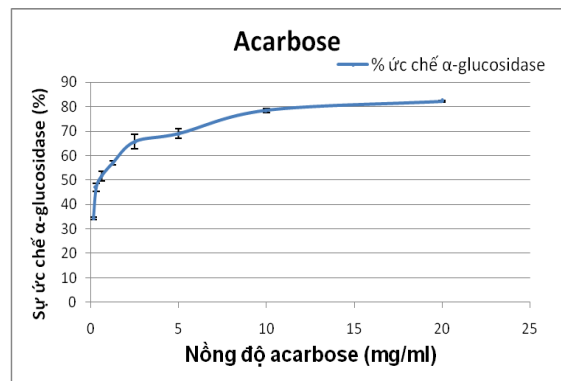
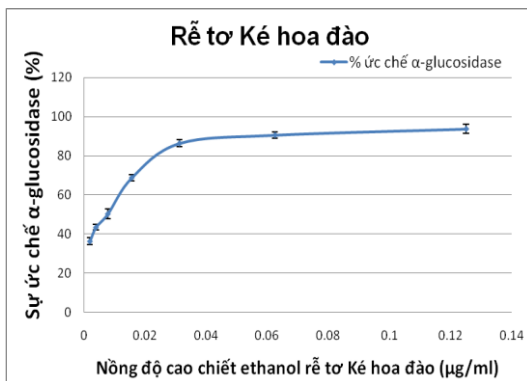
Ghi chú: Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%



Hình 4. Rễ tơ cây Ké hoa đào (A), Bụp giấm (B) và Chối đực (C) sau 25 ngày nuôi cấy trên môi trường MS lỏng

Kết quả cho thấy rễ tơ cây Ké hoa đào ức chế enzyme α -glucosidase cao nhất (98,09%), cao hơn cả chứng dương là acarbose (83,99%), tiếp đến là rễ tơ Bụp giấm (74,287%) và cuối cùng là rễ tơ Chối đực (63,997%). Từ kết quả khả quan này,

chúng tôi tiếp tục xác định nồng độ ức chế 50% (IC_{50}) α -glucosidase đối với cao chiết rễ tơ cây Ké hoa đào, chứng dương là acarbose, kết quả được thể hiện ở đồ thị Hình 5.



Hình 5. Đường tương quan giữa % ức chế α -glucosidase và nồng độ cao chiết ethanol rễ tơ cây Ké hoa đào và acarbose

Nội suy từ đường tương quan giữa % ức chế α -glucosidase và nồng độ hoạt chất, IC₅₀ của cao chiết ethanol rễ tơ cây Ké hoa đào và acarbose đã được xác định (Hình 5). Giá trị IC₅₀ của cao ethanol rễ tơ Ké hoa đào là 7,65 μ g/ml và giá trị IC₅₀ của acarbose là 441,73 μ g/ml. Kết quả cho thấy rễ tơ cây Ké hoa đào có hoạt tính ức chế α -glucosidase cao hơn cả viên thuốc glucobay (acarbose 50mg) được bán trên thị trường để chữa bệnh tiểu đường. Hiện tại, ngoài nhóm tác giả chưa thấy nghiên cứu nào công bố về việc nuôi cấy rễ tơ của sáu loài cây họ Bông và đặc biệt là rễ tơ cây Ké hoa đào thông qua sự chuyển gen của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* mà chủ yếu là các nghiên cứu về hoạt tính sinh học và thành phần hóa học của cây trồng ngoài tự nhiên. Ví dụ như, nghiên cứu của Omonkhua (2011) cho thấy tác động lâu dài của dịch chiết rễ Ké hoa đào đến lượng đường trong máu và chức năng gan ở thỏ [19], Onoagbe (2010) cũng cho thấy rễ Ké hoa đào có hiệu quả nhiều hơn so với lá trong việc làm giảm nồng độ glucose trong máu của chuột bị tiểu đường là do trong rễ Ké hoa đào có chứa những hợp chất tự nhiên làm giảm đáng kể hàm lượng glucose và cholesterol trong máu, cũng như triglyceride trong gan ở 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 tơ của các cây họ Bông, đặc biệt là cây Ké hoa đào trong việc cung cấp nguồn nguyên liệu có hoạt tính hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường tuýp 2.

4 KẾT LUẬN

Qua các kết quả thu được cho thấy sáu loài cây dược liệu thuộc họ Bông được chọn để khảo sát đều có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ và tỉ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Bụp giấm và Ké hoa đào là cao nhất. Ở điều kiện nuôi cấy lỏng lác trên môi trường MS, rễ tơ Ké hoa đào, Bụp giấm và Chối đực phát triển tốt hơn các cây còn lại. Khi so sánh hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các loài rễ tơ thu được, rễ tơ Ké hoa đào có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh nhất với giá trị IC₅₀ là 7,65 μ g/ml. Rõ ràng, kết quả này đã góp phần chứng minh cho thấy việc sản xuất rễ tơ cây Ké hoa đào với quy mô công nghiệp nhằm cung cấp nguồn dược liệu trong điều trị bệnh tiểu đường là hoàn toàn có tính khả thi.

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] S. Kumar, S. Narwal, V. Kumar, O. Prakash, "α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes", *Pharmacognosy Reviews*, vol. 5, no. 9, pp. 19–29, 2011.
- [2] K. Mishiba, M. Nishihara, Y. Abe, T. Nakatsuka, H. Kawamura, K. Kodama, T. Takesawa, J. Abe, S. Yamamura, "Production of dwarf potted gentian using wild-type *Agrobacterium rhizogenes*", *Plant Biotechnology*, vol. 23, pp. 33–38, 2006.
- [3] L. Bensaddek, M.L. Villarreal, M.A. Fliniaux, "Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds", *Electronic Journal of Integrative Biosciences*, vol. 3, no. 1, pp. 2–9, 2008.
- [4] W. Li, Y. Asada, T. Yoshikawa, "Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures", *Planta Med*, vol. 64, pp. 746–747, 1998.
- [5] S. Berkov, A. Pavlov, P. Kovacheva, P. Stanimirova, S. Philipov, "Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*", *Z Naturforsch C*, vol. 58, pp. 42–46, 2003.
- [6] I.N. Kuzovkina, B. Schneider, "Genetically transformed root cultures-generation, properties and application in plant sciences", *Prog Bot*, vol. 67, pp. 275–314, 2006.
- [7] T. Murashige, F. Skoog, "A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant*, vol. 15, pp. 473–497, 1962.
- [8] Y.R. Danesh, M.E. Goltapeh, A. Alizadeh, S.M. Modarres, "Optimizing Carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran", *Journy of Biologcal Sciences*, vol. 6, no. 10, pp. 87–91, 2006.
- [9] 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*, vol. 90, pp. 1229–1239, 2011.
- [10] V.P. Sinkar, F.F. White, M.P. Gordon, "Molecular biology of Ri-plasmid", *J Biosci – Indian Acad Sci*, vol. 11, pp. 47–57, 1987.
- [11] J.J. Doyle, J.L. Doyle, "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue", *Phytochemical Bulllletin*, vol. 19, pp. 11–15, 1987.
- [12] 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.
- [13] N.K.P. Phụng, "Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ", *Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP.HCM*, 2007.
- [14] 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.

- [15] A. Tomilov, N. Tomilova, J. Yoder, “*Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of the parasitic plant *Triphysaria versicolor* retain parasitic competence”, *Planta*, vol. 225, pp. 1059–1071, 2007.
- [16] I. Potrykus, “Gene transfer to plants: Assessment and perspectives”, *Physiol. Plant* vol. 79, pp. 125–134, 1990.
- [17] M. Stephanie, “Transformation of *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* by *Rhizobium rhizogenes*: Hairy root induction and gossypol production”, *University of New Orleans Theses and Dissertations*, pp. 34–48, 2006.
- [18] G. Sujatha, G. Flamini, D. Kumari, “High – efficiency *Agrobacterium rhizogenes* – mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and essential oil analysis”, *Industrial Crops and Products*, pp. 643–652, 2013.
- [19] A.A. Omonkhua, I.O. Onoagbe, “Evaluation of the long-term effects of *Urena lobata* root extracts on blood glucose and hepatic function of ormal rabbits”, *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, vol. 3, no. 8, pp. 204–213, 2011.
- [20] I.O. Onoagbe, E.O. Negbenebor, V.O. Ogbeibe, I.H. Dawha, V. Attah, H.U. Lau, A.A. Omonkhua, “A Study of the Anti-Diabetic Effects of *Urena lobata* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats”, *European Journal of Scientific Research*, vol. 43, no. 1, pp. 6–14, 2010.

Evaluating α -glucosidase inhibitory activity of hairy roots cultured from some plants in malvaceae family induced by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834

Vu Thi Bach Phuong*, Pham Thi Anh Hong, Quach Ngo Diem Phuong

University of Science, VNU-HCM

Corresponding author: vtbphuong@hcmus.edu.vn

Received: 04-06-2018; Accepted: 15-9-2018; Published: 31-12-2018

Abstract—One of the most effective methods for type 2 diabetes treatments is inhibition of enzyme α -glucosidase in the intestines to slow down the release of glucose from carbohydrates in the diet, reduce plasma glucose levels and prevent hyperglycemia after meals. Therefore, seeking α -glucosidase inhibitors used in the treatment of diabetes from plant is the attention of many scientists. Based on the potential of the hairy root culture technology in increasing valuable chemical compounds accumulating, this study aimed to induce hairy roots from six plants of the Malvaceae family including *Urena lobata*, *Abutilon indicum*, *Hibiscus Sabdariffa*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Sida acuta*, *Sida rhombifolia*, and screening which materials has the highest in α -glucosidase inhibitory activity. We have successfully induced hairy roots from six plant species by using

the *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 strain. The highest rates of hairy root induction were observed in *Hibiscus Sabdariffa* and *Urena lobata*. The stable introduction of *rolB* and *rolC* genes to plant genomes was confirmed by PCR. Under liquid-shake culture conditions on MS medium, hairy roots of *Hibiscus sabdariffa*, *Urena lobata* and *Sida acuta* showed better development than other species, and therefore, they are selected for the study of α -glucosidase inhibitory activity. This study proved that *Urena lobata* was stronger in inhibiting α -glucosidase activity than other studied plants, with the IC₅₀ value of 7.65 μ g/ml. The results of this study demonstrated *Urena lobata* hairy root might be considered as a potential supply of medicinal plants for the treatment of type 2 diabetes.

Keywords—*Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, α -glucosidase inhibitor activity, hairy root, *Urena lobata* L., *Abutilon indicum* L., *Hibiscus Sabdariffa* L., *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Sida acuta* Burm.f., *Sida rhombifolia* L var. *parvifolia* Gagn