

Hoạt tính kháng oxi hóa, kháng khuẩn của cao chiết ethanol từ cây tía tô (*Perilla frutescens*) và thử nghiệm cảm ứng tạo rễ tơ bằng chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*

Trà Đông Phương^{1,2}, Lê Thị Mộng Vương², Quách Ngô Diễm Phương^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹PTN. Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

²Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

Liên hệ

Quách Ngô Diễm Phương, Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

PTN. Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
Email: qndphuong@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 2020-05-28
- Ngày chấp nhận: 2020-12-21
- Ngày đăng: 2021-1-28

DOI: 10.32508/stdjns.v5i1.917



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

Tía tô (*Perilla frutescens*) – một loài thực vật thuộc họ Hoa môi (Lamiaceae) – được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền để chữa nhiều loại bệnh thường gặp (cảm lạnh, đau đầu, ho, đầy bụng, chướng bụng, ngộ độc, ...) do chứa nhiều hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học. Khi tiến hành điều chế cao ethanol từ các cơ quan rễ, thân và lá rồi khảo sát khả năng kháng oxi hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH và khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch, kết quả cho thấy cao chiết ethanol từ các cơ quan cây Tía tô đều có hoạt tính kháng oxi hóa và kháng khuẩn. Bằng các phản ứng đặc trưng, tất cả cao chiết ethanol từ rễ, thân và lá Tía tô đều có chứa các nhóm phenol, flavonoid, saponin, alkaloid và glycoside, nhưng triterpenoid chỉ có ở lá. Các hợp chất thứ cấp này có liên quan đến hoạt tính kháng oxi hóa và kháng khuẩn của cây Tía tô. Bên cạnh đó, khi thử nghiệm khả năng cảm ứng tạo rễ tơ bằng chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 trên các cơ quan cây Tía tô thì lá là cơ quan tạo rễ tơ tốt nhất ($67,67 \pm 3,51\%$ số mẫu cảm ứng tạo rễ tơ). Hiệu quả tạo rễ tơ ở lá cao nhất với thời gian ngâm mẫu 20 phút và đồng nuôi cấy trong 72 giờ. Các kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo liên quan đến nuôi cấy rễ tơ để thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Từ khoá: Hợp chất thứ cấp, kháng khuẩn, kháng oxi hóa, rễ tơ, Tía tô

TỔNG QUAN

Tía tô (*Perilla frutescens*) là một loài thực vật thuộc họ Hoa môi (Lamiaceae). Tía tô được trồng chủ yếu ở các nước châu Á từ hơn 2000 năm về trước và là một trong những loài cây trồng quan trọng trong nông nghiệp^{1,2}. Ngoài việc dùng Tía tô như là một loại thực phẩm thông thường, Tía tô còn được sử dụng như là một loại thuốc trong y học cổ truyền châu Á để chữa nhiều loại bệnh thường gặp (cảm lạnh, đau đầu, ho, đầy bụng, chướng bụng, ngộ độc, ...) do nó chứa nhiều hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học³. Tại Việt Nam, cây Tía tô cũng hiện đang được tập trung nghiên cứu để phát hiện các hợp chất thứ cấp và các hoạt tính sinh học tiềm năng⁴⁻⁶, nhưng có sự khác nhau về hoạt tính sinh học lẫn hợp chất thứ cấp được tích lũy trong Tía tô khi trồng tại những khu vực địa lý khác nhau. Do đó, nghiên cứu này nhằm mục đích xác định hoạt tính kháng oxi hóa và kháng khuẩn của cao chiết ethanol từ cây Tía tô được trồng tại huyện Tây Hòa, tỉnh Phú Yên. Đồng thời, nghiên cứu này cũng thử nghiệm cảm ứng tạo rễ tơ Tía tô với chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 nhằm tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực nuôi cấy rễ tơ Tía tô để thu nhận hợp chất thứ cấp có giá trị.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu sinh học

Hạt giống Tía tô được mua từ công ty TNHH TM Trang Nông. Cây Tía tô 3 tháng tuổi (trồng tại thị trấn Phú Thứ, huyện Tây Hòa, tỉnh Phú Yên) được thu hoạch vào buổi sáng để điều chế cao chiết ethanol. Các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Acetobacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa* do phòng thí nghiệm Vi sinh (khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG – HCM) cung cấp.

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

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường Luria-Bertani (LB) có pH 7,0 \pm 0,1 dùng để nuôi cấy các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *B. subtilis*, *Acetobacterium* sp., *Streptococcus* sp., *S. typhi*, *E. coli* và *P. aeruginosa*. Môi trường Yeast Mannitol Broth (YMB) có pH 7,0 \pm 0,1 dùng để nuôi cấy vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834. Môi trường Murashige and Skoog (MS) bổ sung đường sucrose 30 g/L, agar 8 g/L

Trích dẫn bài báo này: Phương T D, Vương L T M, Phương Q N D. Hoạt tính kháng oxi hóa, kháng khuẩn của cao chiết ethanol từ cây tía tô (*Perilla frutescens*) và thử nghiệm cảm ứng tạo rễ tơ bằng chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 5(1):975-983.

và pH $5,80 \pm 0,05$ dùng cho nuôi cấy mô cây Tía tô. Tất cả các môi trường đều được hấp khử trùng trong 15 phút bằng nồi hấp ở nhiệt độ 121°C , 1 atm. Các chủng vi khuẩn được tăng sinh trong các môi trường lỏng thích hợp trên máy lắc ở 37°C , tốc độ lắc 130 vòng/phút và không có ánh sáng. Các mẫu mô thực vật được nuôi trong phòng nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C .

Phương pháp điều chế cao chiết ethanol

Phương pháp điều chế cao chiết ethanol được thực hiện theo Basri và Fan (2005)⁷, nhưng có một số thay đổi. Mỗi cơ quan rễ, thân và lá Tía tô sau khi thu hoạch được sấy khô ở 37°C cho đến khi trọng lượng không thay đổi. Sau đó, 500 gam bột khô của mỗi cơ quan được ngâm chìm trong 2 lít ethanol ở nhiệt độ phòng. Sau 48 giờ ngâm, dịch chiết của mỗi cơ quan được lọc qua giấy lọc Whatman. Phần bã thực vật còn lại tiếp tục sử dụng cho 5 lần chiết kế tiếp, mỗi lần chiết sử dụng 1 lít ethanol và ngâm trong 48 giờ. Toàn bộ dịch chiết thu được sau mỗi lần chiết được cô đặc lại bằng thiết bị cô quay chân không ở 50°C , thu được cao chiết ethanol (cao chiết thô). Cao chiết ethanol của mỗi cơ quan được làm khô trong tủ Hood (ở nhiệt độ phòng) cho đến khi đạt khối lượng không đổi.

Phương pháp DPPH

Hoạt tính kháng oxi hóa của cao chiết ethanol được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate) của Brand-Williams và cộng sự⁸, nhưng có một số biến đổi. Hoà 0,5 mL cao chiết ethanol ở các nồng độ khác nhau (mg/mL) vào 3,5 mL dung dịch DPPH 0,09 mM (pha trong ethanol). Ethanol và vitamin C tương ứng được sử dụng như là chứng âm và chứng dương của phản ứng. Dung dịch được giữ trong điều kiện tối 30 phút, ở nhiệt độ phòng. Sau đó, độ hấp thụ của dung dịch được đo ở bước sóng 517 nm. Hoạt tính kháng oxi hóa được biểu thị bằng % ức chế DPPH theo công thức $[(A_o - A_m)/A_o] \times 100\%$, trong đó A_o là độ hấp thụ của mẫu chứng âm và A_m là độ hấp thụ của mẫu thử nghiệm.

Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp đục lỗ thạch⁹ được sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn (kháng *S. aureus*, *B. subtilis*, *Acetobacterium* sp., *Streptococcus* sp., *S. typhi*, *E. coli* và *P. aeruginosa*) của các cao chiết ethanol từ cây Tía tô. Môi trường LB-agar (LB bổ sung 15 gam agar, pH $7,0 \pm 0,1$) được chuẩn bị trong các đĩa vô trùng

cho thử nghiệm này. Dịch khuẩn được hoạt hóa trong môi trường LB lỏng qua đêm, rồi được điều chỉnh độ đục sao cho giá trị $\text{OD}_{620} = 0,10 \pm 0,01$ (tương đương 10^8 tế bào vi khuẩn/mL). Vi khuẩn được trải đều trên bề mặt đĩa môi trường (100 μl /đĩa) trước khi đục lỗ thạch bằng cách sử dụng que trải vô trùng. Cao chiết ethanol của từng cơ quan (rễ, thân và lá) cây Tía tô được pha trong DMSO 10% để đạt đến nồng độ 6 mg/mL. Sau đó, 50 μl cao chiết này được thêm vào mỗi lỗ thạch (mỗi lỗ thạch có đường kính 9 mm và cách nhau ít nhất 30 mm). Sau 24 giờ khảo sát (ở 37°C , trong điều kiện hiếu khí), khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn được ghi nhận bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn (lấy đường kính vòng vô khuẩn đo được trên đĩa trừ đi đường kính lỗ thạch) theo đơn vị mm. Chloramphenicol (1 mg/mL) và DMSO 10% tương ứng được sử dụng như là chứng dương và chứng âm cho thử nghiệm.

Phương pháp định tính các hợp chất thứ cấp

Định tính phenol¹⁰: cao chiết ethanol được trộn với 2 mL dung dịch FeCl_3 2%. Sự xuất hiện màu xanh lam hoặc đen trong dung dịch cho thấy có phenol hiện trong mẫu.

Định tính flavonoid¹⁰:

Tác dụng với H_2SO_4 đậm đặc: nhỏ từ từ 0,5 mL H_2SO_4 đậm đặc vào 1 mL dung dịch cao chiết ethanol. Nếu dung dịch xuất hiện màu vàng đậm, cam, đỏ xanh hoặc đỏ sậm thì trong mẫu có chứa flavonoid.

Tác dụng với tác nhân kiểm: cao chiết ethanol được hòa tan trong 2 mL dung dịch NaOH 2%. Màu vàng xuất hiện trong dung dịch sau đó trở thành không màu khi thêm vài giọt acid loãng chứng tỏ có sự hiện diện của flavonoid trong mẫu.

Định tính saponin¹⁰: cao chiết ethanol được trộn với 5 mL dung dịch HCl 0,1 N hoặc NaOH 0,1 N, rồi lắc mạnh. Sự hình thành bọt bền là một dấu hiệu cho thấy có sự hiện diện của saponin trong mẫu.

Định tính steroid – triterpenoid¹⁰:

Phản ứng Rosenhein: hòa 0,2 mL acid trichloroacetic vào 1 mL dung dịch cao chiết ethanol rồi quan sát trong 20 phút. Phản ứng dương tính (có saponin triterpenoid) khi dung dịch chuyển sang màu xanh dương.

Định tính alkaloid¹⁰: và 2 gam KI trong 100 mL nước cất). Sự xuất hiện của các kết tủa màu nâu lơ lửng chứng minh sự hiện diện của alkaloid trong mẫu thử.

Định tính glycoside¹⁰:

Phản ứng Salkowski: cao chiết ethanol được trộn với 2 mL chloroform, sau đó, 2 mL H_2SO_4 đậm đặc được thêm vào từ từ rồi lắc nhẹ. Màu đỏ gạch hoặc nâu xuất hiện trong dung dịch cho thấy có sự hiện diện của vòng steroid, là phần aglycone của glycoside.

Phản ứng với thuốc thử Molisch: cao chiết ethanol được trộn với 1 mL H₂SO₄ đậm đặc và 0,5 mL dung dịch thuốc thử Molisch (α -naphthol 1% hoặc resorcinol 5%, trong dung môi ethanol 80%). Sự xuất hiện một vòng màu tím hoặc đỏ ở mặt phân cách giữa hai dung dịch chứng tỏ trong mẫu thử có sự hiện diện của đường aldose hoặc ketose.

Phương pháp khử trùng hạt tạo cây con in vitro

Hạt cây Tía tô được rửa sạch bằng nước xà phòng trong 30 phút, rồi lần lượt được khử trùng bằng ethanol 70% trong 1,5 phút và nước Javel 20% trong 15 phút. Sau khi khử trùng bề mặt, hạt Tía tô được rửa sạch 5 lần bằng nước cất (đã được hấp khử trùng), cấy trải hạt trên môi trường MS và cho nảy mầm trong phòng nuôi cấy (cường độ ánh sáng 2500 lux, chiếu sáng 16 giờ/ngày).

Phương pháp cảm ứng tạo rễ tơ

Cây Tía tô *in vitro* sau 45 ± 5 ngày nảy mầm được tách riêng từng cơ quan (rễ, thân và lá), tạo vết thương trên mẫu mô bằng dao cắt, rồi nhúng vào dịch khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 (dịch khuẩn được chuẩn bị bằng cách tăng sinh vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 trong môi trường YMB lỏng lắc cho đến khi giá trị OD₆₀₀ của dịch khuẩn đạt 0,50 ± 0,05) trong một khoảng thời gian thích hợp. Sau đó, các mẫu mô được thấm bớt dịch khuẩn bằng giấy thấm vô trùng và được đồng nuôi cấy trên môi trường MS (không chiếu sáng) trong một khoảng thời gian thích hợp. Sau thời kỳ đồng nuôi cấy, các mẫu mô sẽ được cấy chuyển sang môi trường MS mới (có bổ sung 250 mg/L cefotaxime) để loại bỏ vi khuẩn¹¹. Các rễ mọc ra từ vị trí vết thương được giả định là rễ tơ.

Phần trăm số mẫu tạo rễ tơ (%) = ((Số mẫu tạo rễ tơ)/(Tổng số mẫu xâm nhiễm))x100%

Phương pháp PCR phát hiện gen chuyển

Rễ tơ giả định được thu nhận để tách DNA bộ gen theo phương pháp CTAB của Doyle & Doyle¹². Mỗi phản ứng PCR có thể tích 25 μ l (gồm 1U Taq polymerase, 0,5 μ M primer, 2 μ l DNA và dung dịch đệm 1X cho phản ứng PCR) được thiết lập để phát hiện các gen *rolB* và *virG* với trình tự primer được liệt kê ở Bảng 1.

Phản ứng PCR được thực hiện gồm các giai đoạn: 1 giai đoạn biến tính ban đầu (95°C trong 5 phút), 35 chu kỳ lặp lại (mỗi chu kỳ có 3 bước: 94°C trong 0,5 phút, 54°C trong 0,5 phút và 72°C trong 1 phút) và 1 giai đoạn kéo dài sau cùng (72°C trong 5 phút). Sản phẩm thu được sau khi kết thúc phản ứng PCR được

phân tích trên gel agarose 1% (w/v). Băng gel sau khi điện di được nhuộm với ethidium bromide rồi được soi trên bàn đèn UV để phát hiện sự hiện diện của phân đoạn DNA mục tiêu.

Phương pháp xử lý số liệu thống kê

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần (với số mẫu từ 30 đến 35 mẫu cho mỗi lần lặp lại). Kết quả được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0 (phân nhóm các giá trị bằng phương pháp Duncan với độ tin cậy là 95%) và được trình bày dưới dạng Giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn. Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoạt tính kháng oxi hóa của cao chiết ethanol từ các cơ quan cây Tía tô

Hoạt tính kháng oxi hóa của cao chiết ethanol từ các cơ quan rễ, thân và lá Tía tô được đánh giá bằng phương pháp DPPH. Kết quả thu được (Hình 1) cho thấy giá trị IC₅₀ ở cao chiết ethanol của thân (3,30 ± 0,30 mg/mL) cao hơn cao chiết ethanol của rễ (2,16 ± 0,16 mg/ml) và lá (1,30 ± 0,63 mg/mL), điều này chứng tỏ các hợp chất chiết bởi dung môi ethanol từ lá và rễ cây Tía tô có hoạt tính kháng oxi hóa cao hơn so với các hợp chất chiết từ thân.

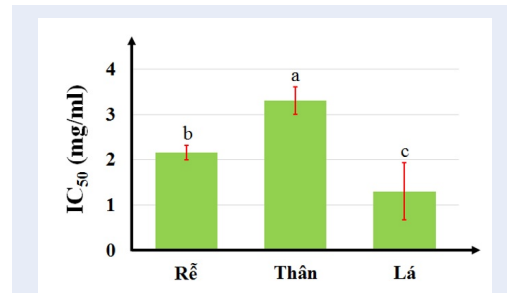
Tía tô là loài thực vật phổ biến ở Việt Nam và châu Á. Các nghiên cứu cho thấy Tía tô là một nguồn nguyên liệu tự nhiên chứa nhiều chất chống oxy hóa¹³⁻¹⁵. Li và cộng sự (2014) chứng minh cao chiết ethanol từ lá Tía tô có khả năng bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC₅₀ = 0,1482 mg/mL¹⁶. Trong khi đó, cao chiết methanol của thân và lá Tía tô cũng có khả năng bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC₅₀ tương ứng là 5,92 μ g/mL và 7,97 μ g/mL¹⁷. Các kết quả kháng oxi hóa (ở các công trình đã đề cập và trong nghiên cứu này) cho thấy hoạt tính kháng oxi hóa của Tía tô phụ thuộc vào các hợp chất thứ cấp được tích lũy khi được trồng ở các vùng địa lý khác nhau và loại dung môi dùng để chiết.

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết ethanol từ các cơ quan cây Tía tô

Cao chiết ethanol từ các cơ quan Tía tô cũng được thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch. Kết quả cho thấy các loại cao chiết ethanol từ các cơ quan Tía tô đều có khả năng kháng khuẩn (Bảng 2 và Hình 2), với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ khoảng 3,33 mm đến 7,50 mm. Cao chiết lá Tía tô có khả năng kháng khuẩn thấp hơn (đối với *S. aureus* và *Streptococcus* sp.) hoặc bằng (*B. subtilis*, *Acetobacterium* sp., *S. typhi*, *E. coli* và *P. aeruginosa*) so với thân và rễ. Tính kháng *S. aureus*

Bảng 1: Trình tự primer dùng để phát hiện các gen *rolB* và *virG*

Gen	Tên primer	Trình tự primer (5' → 3')
<i>rolB</i>	<i>rolB</i> F	GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT
	<i>rolB</i> R	GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC
<i>virG</i>	<i>virG</i> F	TTA TCT GAG TGA AGT CGT CTC
	<i>virG</i> R	CGT CGC CTG AGA TTA AGT GTC



Hình 1: Khả năng bắt gốc tự do DPPH (giá trị IC₅₀) của cao chiết ethanol từ các cơ quan rễ, thân và lá Tía tô. Ký hiệu a, b và c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các loại cao chiết ethanol trong cùng một nhóm thí nghiệm.

của cao chiết từ rễ và thân cao hơn đáng kể so với lá, còn tính kháng *Streptococcus* sp. của cao chiết từ rễ lại cao hơn đáng kể so với các cơ quan còn lại. Dung môi DMSO 10% được sử dụng để hòa tan cao chiết luôn cho kết quả âm tính (không xuất hiện vòng kháng khuẩn), cho thấy dung môi này không ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết được thử nghiệm.

Một số nghiên cứu trước đây cũng cho thấy Tía tô có hoạt tính kháng khuẩn. Kim và cộng sự (2007) nhận thấy cao chiết ethanol từ lá Tía tô có hoạt tính kháng *S. aureus*, *B. subtilis* và *P. aeruginosa*, nhưng không có khả năng kháng *E. coli*¹⁸. Cao chiết ethanol cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn yếu đối với *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri*¹⁹. Như vậy, tùy thuộc vào loài vi khuẩn mà cao chiết Tía tô thể hiện hoạt tính kháng khuẩn khác nhau.

Sự hiện diện của các hợp chất thứ cấp trong cao chiết ethanol từ các cơ quan cây Tía tô

Cao chiết ethanol từ các cơ quan cây Tía tô được phân tích định tính các hợp chất, kết quả cho thấy ở tất cả các cao chiết đều có chứa phenol, flavonoid, saponin, glycoside và alkaloid, nhưng triterpenoid chỉ có ở lá (Bảng 3). Thông thường, các hợp chất thứ cấp này được biết là có hoạt tính sinh học để bảo vệ cơ thể thực vật chống chịu các stress sinh học và phi sinh học.

Hoạt tính kháng oxi hóa của lá Tía tô cao hơn các cơ quan còn lại có thể là do sự đóng góp của triterpenoid hiện diện trong lá (nhưng không có ở thân và rễ).

Trong các nghiên cứu *in vitro*, phenol, flavonoid, saponin, triterpenoid và alkaloid đã được báo cáo là có hoạt tính kháng oxi hóa và kháng khuẩn^{20,21}. Hoạt tính chống oxi hóa là do các chất này có khả năng cho nguyên tử hydro, electron hoặc tạo phức với các ion kim loại²²⁻²⁴, ngoài ra, chúng có khả năng làm thay đổi tính thấm của màng tế bào hoặc liên kết với các enzyme để làm thay đổi một số chức năng nội bào ở vi sinh vật, do đó, chúng cũng có hoạt tính kháng khuẩn²⁵⁻²⁷. Như vậy, sự hiện diện của các hợp chất thứ cấp trong cao chiết ethanol đã tạo nên hoạt tính kháng oxi hóa và kháng khuẩn *in vitro*.

Ảnh hưởng của các loại cơ quan khác nhau đến hiệu quả tạo rễ tơ ở Tía tô

Một cách thức mới để tăng cường sản xuất các hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật là sử dụng *A. rhizogenes* để cảm ứng tạo rễ tơ trên thực vật. Rễ tơ – một sản phẩm chuyển gen tự nhiên bởi *A. rhizogenes* – có khả năng tăng trưởng không giới hạn trong môi trường nuôi cấy mà không cần chất điều hòa sinh trưởng thực vật và có thể sản xuất hợp chất thứ cấp tương đương hoặc thậm chí lớn hơn cả cây mẹ^{28,29}. Do đó, bước tiếp theo của nghiên cứu này đã tiến hành cảm ứng tạo rễ tơ Tía tô bằng chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 trên các cơ quan rễ, thân và lá Tía tô (ngâm mẫu 20 phút và đồng nuôi cấy 72 giờ). Kết quả cho thấy tất cả các cơ quan rễ, thân và lá đều có thể cảm ứng tạo rễ tơ (Bảng 4 và Hình 3), trong đó lá là cơ quan có khả năng tạo rễ tơ cao nhất ($67,67 \pm 3,51\%$ số mẫu cảm ứng tạo rễ tơ). Hiệu quả tạo rễ tơ có sự phụ thuộc vào cơ quan mà *A. rhizogenes* xâm nhiễm, trong đó lá là cơ quan có hiệu quả xâm nhiễm cao nhất³⁰⁻³². Do đó, lá Tía tô được sử dụng để làm vật liệu cho các thí nghiệm kế tiếp.

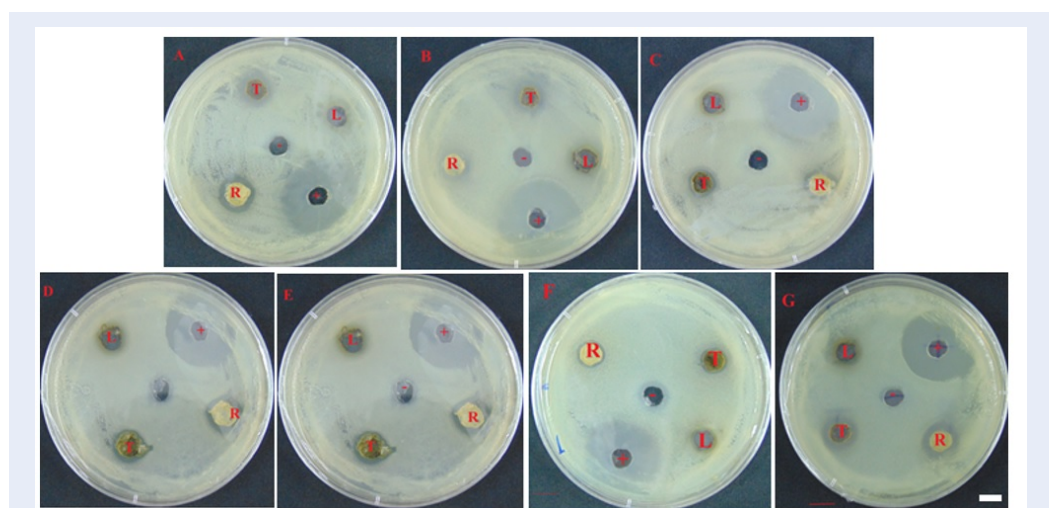
Ảnh hưởng của thời gian ngâm mẫu trong dịch khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 đến hiệu quả tạo rễ tơ

Lá Tía tô được ngâm trong dịch khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 trong các khoảng thời gian khác nhau

Bảng 2: Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết ethanol từ các cơ quan rễ, thân và lá cây Tía tô

Chứng âm	Chứng dương	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)		
		Cao chiết ethanol của rễ	Cao chiết ethanol của thân	Cao chiết ethanol của lá
-	26,83 ± 0,58	7,33 ± 0,29 ^a	6,67 ± 0,29 ^a	5,67 ± 0,76 ^b
-	25,17 ± 1,53	6,17 ± 0,58 ^a	4,83 ± 0,29 ^a	5,50 ± 0,20 ^a
-	22,50 ± 0,87	4,33 ± 1,53 ^a	3,33 ± 1,53 ^a	3,50 ± 0,50 ^a
-	25,33 ± 0,58	7,50 ± 1,00 ^a	5,00 ± 1,32 ^b	5,00 ± 0,87 ^b
-	22,50 ± 1,00	4,83 ± 0,76 ^a	4,00 ± 0,50 ^a	4,83 ± 1,04 ^a
-	21,83 ± 0,76	4,17 ± 1,26 ^a	3,83 ± 1,26 ^a	4,33 ± 1,44 ^a
-	22,67 ± 1,53	3,83 ± 2,36 ^a	4,17 ± 1,61 ^a	4,17 ± 0,58 ^a

Ghi chú: ký hiệu a và b thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các loại cao chiết ethanol trong cùng một nhóm thí nghiệm.



Hình 2: Khả năng kháng khuẩn của cao chiết từ rễ (R), thân (T) và lá (L) Tía tô với các loài vi khuẩn *S. aureus* (A), *B. subtilis* (B), *Acetobacterium* sp. (C), *Streptococcus* sp. (D), *S. typhi* (E), *E. coli* (F) và *P. aeruginosa* (G) khi được khảo sát bằng phương pháp đục lỗ thạch. Chloramphenicol là đối chứng dương (+) và DMSO 10% là đối chứng âm (-). Thuốc đơn vị (thanh ngang màu trắng): 1 cm.

Bảng 3: Một số hợp chất có trong cao chiết ethanol từ các cơ quan rễ, thân và lá cây Tía tô

	Cao chiết ethanol của rễ	Cao chiết ethanol của thân	Cao chiết ethanol của lá
Phenol	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Saponin	+	+	+
Triterpenoid	-	-	+
Alkaloid	+	+	+
Glycoside	+	+	+

Ghi chú: ký hiệu “+” hoặc “-” tương ứng thể hiện phản ứng dương tính hoặc âm tính với thuốc thử

Bảng 4: Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ ở các cơ quan rễ, thân và lá Tía tô khi được cảm ứng bằng *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834

Cơ quan	Rễ	Thân	Lá
Tỉ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	30,33 ± 4,51 ^c	53,33 ± 3,06 ^b	67,67 ± 3,51 ^a

Ghi chú: ký hiệu a, b và c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nghiệm thức trong cùng một nhóm thí nghiệm.



Hình 3: Sự tạo rễ tơ trên các cơ quan lá (A), thân (B) và rễ (C) Tía tô khi được cảm ứng bởi *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834

Bảng 5: Phần trăm số mẫu lá tạo rễ tơ khi được xử lý với vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 ở những khoảng thời gian khác nhau

Thời gian ngâm mẫu (phút)	10	20	30
Tỉ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	6,67 ± 1,15 ^c	68,00 ± 3,00 ^a	22,67 ± 1,53 ^b

Ghi chú: ký hiệu a, b và c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nghiệm thức trong cùng một nhóm thí nghiệm.

(10, 20 và 30 phút) và đồng nuôi cấy 72 giờ. Kết quả (Bảng 5) cho thấy khi ngâm mẫu 20 phút trong dịch khuẩn thì hiệu quả tạo rễ tơ tốt nhất ($68,00 \pm 3,00$ % số mẫu lá tạo rễ tơ). Khi ngâm mẫu vào dịch khuẩn, các tín hiệu giải phóng từ vị trí vết thương trên mẫu lá giúp kích hoạt gen *vir* trong Ri-plasmid của vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834, tạo điều kiện cho sự bám của vi khuẩn lên vết thương ở mẫu lá Tía tô³³. Kết quả nghiên cứu cho thấy 20 phút là thời gian tốt nhất để ngâm mẫu lá Tía tô trong dịch khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834.

Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả tạo rễ tơ

Lá Tía tô sau khi được tạo vết thương, ngâm trong dịch khuẩn 20 phút và đồng nuôi cấy trong các khoảng thời gian khác nhau (24, 48, 72 và 96 giờ). Kết quả (Bảng 6) cho thấy đồng nuôi cấy trong 72 giờ cho hiệu quả tạo rễ tơ tốt nhất ($68,33 \pm 3,51$ % số mẫu lá tạo rễ tơ), còn đồng nuôi cấy trong 24 giờ cho hiệu quả tạo rễ tơ thấp nhất ($6,33 \pm 0,58$ % số mẫu lá tạo rễ tơ). Các kết quả thu được chứng tỏ thời gian đồng nuôi cấy có ảnh hưởng đến hiệu quả tạo rễ tơ. Sự chuyển T-DNA từ Ri-plasmid vào tế bào thực vật sẽ không hiệu quả nếu thời gian đồng nuôi cấy ngắn (24 hoặc 48 giờ),

ngược lại, đồng nuôi cấy quá dài (96 giờ trở lên) gây tác động ngược đến việc tạo rễ tơ do sự phát triển quá mức của vi khuẩn dẫn đến ức chế cạnh tranh^{34,35}.

Chứng minh sự hiện diện của gen chuyển

Khi thực hiện phản ứng PCR cho DNA bộ gen rễ tơ (được cảm ứng từ lá Tía tô) với các primer đặc hiệu, kết quả PCR (Hình 4) cho thấy có sự hiện diện của gen *rolB* (423 bp) nhưng không có sự hiện diện của gen *virG* (1030 bp). Từ kết quả này, có thể kết luận rằng: T-DNA trong Ri-plasmid của *A. rhizogenes* ATCC 15834 đã chèn thành công vào bộ gen rễ tơ Tía tô.

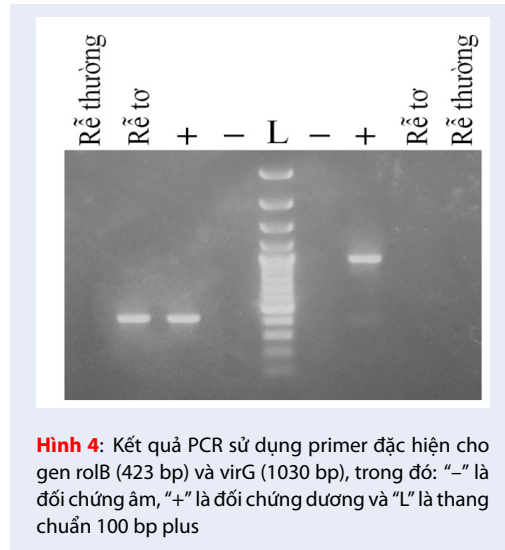
KẾT LUẬN

Từ các kết quả thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy cao chiết ethanol từ các cơ quan cây Tía tô có hoạt tính kháng oxi hóa và hoạt tính kháng khuẩn. Đồng thời, các cao chiết ethanol này đều chứa phenol, flavonoid, glycoside, saponin và alkaloid khi được định tính bằng các phản ứng đặc trưng, nhưng triterpenoid chỉ có ở lá. Bên cạnh đó, các cơ quan rễ, thân và lá Tía tô đều có thể tạo rễ tơ khi được cảm ứng bởi *A. rhizogenes* ATCC 15834, trong đó lá là cơ quan tạo rễ tơ tốt nhất. Ngâm mẫu 20 phút và đồng nuôi cấy 72 giờ

Bảng 6: Phần trăm số mẫu lá rễ tơ khi được đồng nuôi cấy trong những khoảng thời gian khác nhau

Thời gian đồng nuôi cấy (giờ)	24	48	72	96
Tỉ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	6,33 ± 0,58 ^d	17,33 ± 2,31 ^c	68,33 ± 3,51 ^a	50,33 ± 6,81 ^b

Ghi chú: ký hiệu a, b, c và d thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nghiệm thức trong cùng một nhóm thí nghiệm.



cho hiệu quả tạo rễ tơ tốt nhất ở lá. Bằng primer đặc hiệu cho gen *rol B* ở phản ứng PCR, nghiên cứu này đã chứng minh gen *rol B* chèn thành công vào bộ gen rễ tơ Tia tồ. Các kết quả này sẽ làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy rễ tơ nhằm sản xuất hợp chất thứ cấp có giá trị.

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

CTAB : Cetyl trimethylammonium bromide
 DMSO : Dimethyl sulfoxide
 DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate
 LB : Lysogeny broth
 MS : Murashige and Skoog
 PCR : Polemerase chain reaction
 YMB : Yeast mannitol broth

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả tuyên bố rằng họ không có sự xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM trong khuôn khổ đề tài cấp Trường mã số T2017-46.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Trà Đông Phương đóng góp vào việc thu thập số liệu về hoạt tính kháng oxi hóa, kháng khuẩn và viết bản

thảo bài báo. Lê Thị Mộng Vương đóng góp vào việc thu thập số liệu về hoạt tính kháng oxi hóa, kháng khuẩn, định tính hợp chất thứ cấp và cảm ứng tạo rễ tơ. Quách Ngô Diễm Phương đóng góp vào việc thu thập các số liệu cảm ứng tạo rễ tơ và góp ý chỉnh sửa bản thảo bài báo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lee JK, Kim NS. Genetic diversity and relationships of cultivated and weedy types of *Perilla frutescens* collected from East Asia revealed by microsatellite markers. *Korean J. Breed. Sci.* 2007;39(4):491–499.
- Lee JK, Ohnishi O. Geographic differentiation of morphological characters among *Perilla* crops and their weedy types in East Asia. *Breeding science.* 2001;51(4):247–255. Available from: <https://doi.org/10.1270/jsbbs.51.247>.
- Ahmed HM. Ethnomedicinal, Phytochemical and Pharmacological Investigations of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Molecules.* 2019;24(1):102. PMID: 30597896. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules24010102>.
- Thu DK. Tác dụng ức chế enzym xanthin oxidase và hạ acid uric máu của dịch chiết lá tía tồ (*Perilla frutescens* L.). *Tạp chí Dược học.* 2018;57(11):65–67.
- Trinh HN, et al. Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính chống oxy hóa in vitro của các cao chiết từ lá tía tồ thu hái tại các địa điểm khác nhau. *Tạp chí Dược học.* 2019;59(5):47–51.
- Vân HTK, et al. Nghiên cứu thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính sinh học của tinh dầu tía tồ (*Perilla frutescens* (L.) Britt). *Tạp chí Dược học.* 2019;59(9):65–68.
- Basri DF, Fan SH. The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. *Indian journal of Pharmacology.* 2005;37(1):26. Available from: <https://doi.org/10.4103/0253-7613.13851>.
- Brand-Williams W, et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology.* 1995;28(1):25–30. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Hufford CD, et al. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of pharmaceutical sciences.* 1975;64(5):789–792. PMID: 807704. Available from: <https://doi.org/10.1002/jps.2600640512>.
- Phung MKP. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. NXB Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh. 2007;
- Tra PD, et al. Induction of *Platycodon grandiflorum* hairy roots through the mediation of four *Agrobacterium* rhizogenes strains. *Science and Technology Development Journal.* 2016;19(4):64–75. Available from: <https://doi.org/10.32508/stdj.v19i4.624>.
- Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* 1987;19:11–15.
- Chou HJ, et al. Comparative antioxidant properties of water extracts from different parts of Beefsteak plant (*Perilla frutescens*). *Journal of Food & Drug Analysis.* 2009;17(6). Available from: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2581>.
- Lin E, Chou H, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts of *Perilla frutescens*. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2010;4(6):477–483.

15. Meng L, et al. Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. *Molecules*. 2009;14(1):133–140. PMID: 19127243. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules14010133>.
16. Gong J, et al. Phytochemicals, nutritional analysis and in vitro antioxidant activities of pickled *Perilla frutescens* ethanolic leaf extract. *European Journal of Medicinal Plants*. 2014;p. 303–314. Available from: <https://doi.org/10.9734/EJMP/2014/7453>.
17. Lin E, Chou H, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts of *Perilla frutescens*. *Journal of Medicinal Plants Research*. , 4(6), -. 2010;4(6):477–483.
18. Kim MH, et al. Antimicrobial activity of aqueous ethanol extracts of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf. *Journal of the Korean Society of Food Culture*. 2007;22(2):266–273.
19. Dao LA, et al. Screening and comparative study of in vitro antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic extracts of selected Vietnamese plants. *International Journal of Food Properties*. 2020;23(1):481–496. Available from: <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1737541>.
20. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12:564–582. PMID: 10515903. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>.
21. Dahanukar SA, Kulkarni RA, Rege NN. Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products. *Indian Journal of Pharmacology*. 2000;32:581–5118.
22. Afanas'ev IB, et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*. 1989;38(11):1763–1769. Available from: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90410-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90410-3).
23. Bi L, et al. New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of *Aralia taibaiensis*. *Fitoterapia*. 2012;83(1):234–240. PMID: 22088497. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.11.002>.
24. Tapondjou LA, et al. Cytotoxic and antioxidant triterpene saponins from *Butyrospermum parkii* (Sapotaceae). *Carbohydrate research*. 2011;346(17):2699–2704. PMID: 21996603. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.09.014>.
25. Arabski M, Węgierek-Ciuk A, Czerwonka G, Lankoff A, Kaca W. Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *BioMed Research International*. 2012;PMID: 22500084. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/286216>.
26. Bordes C, et al. Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:829. PMID: 31057527. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00829>.
27. Saboor A, et al. Antibacterial activity of different composition of aglycone and glycosidic saponins from tuber of *Cyclamen coum* Miller. *Industrial Crops and Products*. 2019;140:111662. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111662>.
28. Kim YJ, et al. Growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid- and gas-phase reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002;80(4):454–464. PMID: 12325154. Available from: <https://doi.org/10.1002/bit.10389>.
29. Kim Y, et al. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*. 2002;38:1–10. Available from: <https://doi.org/10.1079/IVP2001243>.
30. Chandran RP, Potty VP. Different inducer molecules and strains of *Agrobacterium rhizogenes* on enhancing transformation frequency in host plants. *Biotechnology*. 2011;10(2):203–208. Available from: <https://doi.org/10.3923/biotech.2011.203.208>.
31. Pawar PK, Maheshwari VL. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae. 2004;.
32. Pirian K, et al. Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to noradrenaline's production. *Intl. Res. J. Appl. Basic. Sci*. 2012;3:642–649.
33. Minh HTT, et al. Nghiên cứu quy trình chuyển gen tạo rễ tơ in vitro cây đậu phộng (*Arachis hypogaea* L.) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* nhằm thu nhận Resveratrol. *Tạp chí Công nghệ sinh học*. 2011;9(4A):665–672.
34. Sivanesan I, Jeong BR. Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. *African Journal of Biotechnology*. 2009;8:20.
35. Tao J, Li L. Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African journal of botany*. 2006;72(2):211–216. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.07.010>.

Antioxidant, anti-bacterial activity of *Perilla frutescens* ethanol extract and induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*

Tra Dong Phuong^{1,2}, Le Thi Mong Vuong², Quach Ngo Diem Phuong^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Perilla frutescens, a plant of the Lamiaceae family, is commonly used for traditional medicine to treat diseases (cold, headache, cough, tympanites, poisoning, ...) because it contains many secondary compounds with bioactivities. Roots, stems and leaves of *P. frutescens* were extracted with ethanol. These extracts have also been investigated antioxidant by DPPH method and antibacterial by agar well diffusion method. The results showed that these extracts possess antioxidant and antibacterial activity. By specific reactions, we found that phenols, flavonoids, saponins, alkaloids and glycosides were contained in all extracts of *P. frutescens*, but triterpenoids were only found in leaf extract. These secondary compounds are involved in the antioxidant and antibacterial activity of *P. frutescens*. Hairy roots of *P. frutescens* were induced by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. The results suggested that leaves were the best materials for hairy root inducing (67.67 ± 3.51 % of samples produced hairy roots). 20 minutes of immersion and 72 hours of co-culture are optimal for the induction of hairy roots. These results are a pre-requisition for further studies related to hairy root cultures aimed production of bioactive compounds.

Key words: Antibacterial, antioxidant, hairy roots, *Perilla frutescens*, secondary compound

¹Molecular Biotechnology Laboratory, University of Science, VNU-HCM.

²Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM.

Correspondence

Quach Ngo Diem Phuong, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM.

Molecular Biotechnology Laboratory, University of Science, VNU-HCM.

Email: qndphuong@hcmus.edu.vn

History

- Received: 2020-05-28
- Accepted: 2020-12-21
- Published: 2021-1-28

DOI :10.32508/stdjns.v5i1.917



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Phuong T D, Vuong L T M, Phuong Q N D. **Antioxidant, anti-bacterial activity of *Perilla frutescens* ethanol extract and induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 5(1):975-983.