

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG IN VITRO VÀ KHẢO SÁT HỢP CHẤT ALKALOID ROTUNDINE TỪ CÂY BÌNH VÔI (*STEPHANIA ROTUNDA* LOUR)

Trịnh Ngọc Nam, Nguyễn Văn Vinh

Đại học Công nghiệp TP. Hồ Chí Minh

Đến Tòa soạn ngày: 20/7/2010

1. GIỚI THIỆU

Cây Bình Vôi thuộc họ Tiết dê (*Menispermaceae*), là loài cây chứa nhiều hoạt chất có giá trị về dược liệu. Ngoài tác dụng thanh nhiệt, mát máu, giải độc, tan ứ máu, chữa dạ dày và hành tá tràng, viêm loét, viêm ruột cấp tính, lỵ khuẩn, viêm họng, đau răng, khó ngủ, cây Bình vôi còn có tác dụng đặc biệt trong điều trị các bệnh trầm cảm, bệnh hay quên, bệnh ung thư da và bệnh tiểu đường tít 2.

Năm 1940, Bùi Đình Sang đã chiết từ củ Bình vôi (*Stephania rotunda* Lour.) một alkaloid với tỉ lệ 1,2 – 1,5%, đặt tên là rotundine. Rotundine còn được gọi là hyndarine, là alkaloid có cấu trúc L-tetrahydropalmatine. Alkaloid rotundine chiết xuất từ củ cây Bình vôi được sử dụng rất phổ biến để điều chế các loại thuốc, đặc biệt là thuốc an thần.

Nguồn cây Bình vôi làm dược liệu hiện nay, chủ yếu được khai thác từ tự nhiên. Tốc độ khai thác ngày càng gia tăng, cách thức khai thác chủ yếu là khai thác hủy diệt và hầu như không có kế hoạch tái sinh, do đó, sự phân bố và số lượng cây Bình vôi trong tự nhiên ngày càng bị thu hẹp và khan hiếm. Trong sách Đỏ Việt Nam, cây Bình vôi được xếp vào danh mục các loại thực vật có mức độ cực kì nguy cấp (CR) (Sách Đỏ Việt Nam – 1996).

Với mục đích nhân giống, bảo tồn, duy trì, phát triển và sản xuất hợp chất thứ cấp quý trong điều kiện *in vitro* từ cây Bình vôi (*Stephania rotunda* Lour.), chúng tôi tiến hành:

(1) Khảo sát quá trình phát sinh hình thái và tiến hành nhân giống cây Bình Vôi (*Stephania rotunda* Lour.) trong điều kiện *in vitro*.

(2) Bước đầu chiết tách và định tính hoạt chất rotundine được sử dụng để điều chế thuốc an thần từ các bộ phận cây tự nhiên và mô nuôi cấy ở cây Bình vôi (*Stephania rotunda* Lour.) trong điều kiện *in vitro*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Củ cây Bình vôi *Stephania Rotunda* Lour., thu thập từ Phân viện Sinh học Tây Nguyên và Vườn quốc gia Tà Cú, tỉnh Bình Thuận, được trồng tại vườn Thực nghiệm Công nghệ sinh học, Trường Đại học Công nghiệp TP. Hồ Chí Minh nhằm mục đích lấy các chồi ngủ từ lóng thân

làm mẫu nuôi cấy. Mẫu thí nghiệm là những khúc cắt đoạn thân leo mang chồi ngủ, được rửa bằng dung dịch xà phòng 10% (v/v). Mẫu vật tiếp tục được rửa trong cồn 70° (1 phút), khử trùng trong 10% Ca-hypoclorit (w/v), 15 phút. Sau đó chúng được rửa 4 lần bằng nước cất khử trùng. Mẫu sau khi khử trùng, được cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), bổ sung 0,7% agar (w/v), 3% sucrose (w/v), 0,05% than hoạt tính (w/v), pH môi trường điều chỉnh đến 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, ánh sáng 2500 ± 500 lux, ẩm độ $55 \pm 5\%$, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Chồi tăng trưởng từ mẫu nuôi cấy được cắt và sử dụng cho những thí nghiệm tạo mô sẹo và thí nghiệm nhân chồi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng tạo mô sẹo từ khúc cắt thân

Mẫu nghiên cứu được cắt từ lóng thân 3 tuần tuổi được vô trùng, kích thước khoảng $2,0 \pm 0,1$ cm, được cấy lên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), có 0,7% agar (w/v), 3% sucrose (w/v), pH 5,8 được bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật theo bảng 1 để khảo sát khả năng tạo mô sẹo. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, ánh sáng 2500 ± 500 lux, ẩm độ $55 \pm 5\%$. Sau 3 tuần nuôi cấy, ghi nhận nghiệm thức có các chất điều hòa sinh trưởng với nồng độ chất điều hòa sinh trưởng khác nhau có phản ứng khác nhau về khả năng tạo mô sẹo.

2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ khoáng lên khả năng tạo mô sẹo

Khúc cắt thân vô trùng 3 tuần tuổi kích thước $2,0 \pm 0,1$ cm được cấy lên các môi trường có nồng độ khoáng khác nhau lần lượt là: môi trường MS (NK1), môi trường MS có hàm lượng các chất khoáng giảm $\frac{1}{2}$ (NK2), môi trường White (NK3). Tất cả các môi trường có 0,7% agar (w/v), 3% sucrose (w/v), Ph 5,8 được bổ sung 2,4-D 5 mg/l, BA 0,2 mg/l.

Bảng 1. Các nghiệm thức môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo từ khúc cắt thân

Nghiệm thức	Thành phần môi trường
M0	MS+ BA 0,2 mg/l
MD1	MS+ 2,4-D 1 mg/l, BA 0,2 mg/l
MD2	MS+ 2,4-D 3 mg/l, BA 0,2 mg/l
MD3	MS+ 2,4-D 4 mg/l, BA 0,2 mg/l
MD4	MS+ 2,4-D 5 mg/l, BA 0,2 mg/l
MD5	MS+ 2,4-D 10 mg/l, BA 0,2 mg/l
MN1	MS+ NAA 1 mg/l, BA 0,2 mg/l
MN2	MS+ NAA 3 mg/l, BA 0,2 mg/l
MN3	MS+ NAA 5 mg/l, BA 0,2 mg/l
MN4	MS+ NAA 7 mg/l, BA 0,2 mg/l
MN5	MS+ NAA 10 mg/l, BA 0,2 mg/l

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình nhân chồi từ chồi ngủ

Khúc cắt chồi ngủ vô trùng trong môi trường MS được cấy chuyển sang môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có 0,7% agar (w/v), 3% sucrose (w/v), pH 5,8 bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng theo bảng 2. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ánh sáng 2500 ± 500 lux, ẩm độ $55 \pm 5\%$, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

Bảng 2. Các nghiệm thức môi trường nhân chồi từ khúc cắt mang chồi ngủ

Nghiem thức	Thành phần môi trường
C1	MS+ NAA 0,1 mg/l
C2	MS+ NAA 0,1 mg/l, BA 1 mg/l
C3	MS+ NAA 0,1 mg/l, BA 2 mg/l
C4	MS+ NAA 0,1 mg/l, BA 3 mg/l
C5	MS+ NAA 0,2 mg/l
C6	MS+ NAA 0,2 mg/l, BA 1 mg/l
C7	MS+ NAA 0,2 mg/l, BA 2 mg/l
C8	MS+ NAA 0,2 mg/l, BA 3 mg/l

2.4. Tách chiết và định tính hợp chất alkaloid rotundine

Củ, thân từ cây tự nhiên và mô sẹo được thái nhỏ, sấy khô ở 40°C đến trọng lượng không đổi, xay nhuyễn thành bột. Cân chính xác 10 (g) mẫu cho vào cốc 250 ml + 100 ml dung dịch H_2SO_4 10%, lắng lạnh trong 2 ngày. Lọc lấy dịch trong, bã còn lại cho tiếp 100 ml H_2SO_4 10% vào tiếp tục làm lạnh trong 2 ngày. Lọc, lấy dịch trong, gộp dịch chiết 2 lần lại, chỉnh đến pH = 9 bằng NH_4OH 25%.

Thử các dịch chiết với các thuốc thử alkaloid chung. Mỗi dịch chiết lấy 4 ống nghiệm cho vào 5 ml dịch chiết mỗi ống. Lần lượt cho 1 ml thuốc thử vào 3 ống nghiệm có dán nhãn, ống còn lại không có thuốc thử. Quan sát sự thay đổi của các ống nghiệm có thuốc thử: lượng kết tủa, sự thay đổi màu sắc dung dịch thử.

Chiết với CH_2Cl_2 ở các thể tích khác nhau: 30, 20, 10, 5 ml (nhiều lần), thử với các thuốc thử xem trong dịch acid còn alkaloid hay không để chiết kiệt alkaloid. Dung môi có chứa alkaloid làm khan với muối Na_2SO_4 . Thu được alkaloid thô. Thử với các thuốc thử Dragendoff, Mayer và Wagner định tính alkaloid toàn phần. Chạy sắc kí cột, rửa giải với dung môi Ethyl acetate thu dung dịch. Thử với thuốc thử Marquis để định tính Rotundin.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện ba lần lặp lại. Số liệu thu được từ các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS phiên bản 10.0 dùng cho Window.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

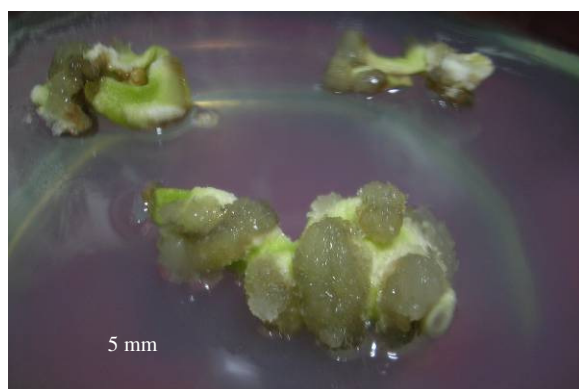
3.1. Sự tạo mô sẹo từ khúc cắt thân cây Bình vôi

Sau 1 tuần nuôi cấy, ở hầu hết các nghiệm thức, mẫu nuôi cấy đều xuất hiện mô sẹo tại những vết cắt ngang lóng thân (bảng 3). Trên các môi trường có NAA, mô sẹo hình thành ở dạng xốp có màu trắng đục rồi chuyển sang màu nâu sau 10 ngày (hình 1). Trên môi trường có 2,4-D, khối mô sẹo hình thành có trọng lượng tươi lớn, có màu xanh nhạt, không hoá nâu. Sự hình thành mô sẹo xảy ra rõ nhất trên nghiệm thức MD4 với nồng độ nồng độ BA 0,2 mg/l và 2,4-D 5 mg/l.

Bảng 3. Biểu hiện của mô sẹo sau 3 tuần nuôi cấy trên các nghiệm thức

STT	Nghiệm thức	Trọng lượng tươi (mg)	Màu sắc	% mẫu cho rễ	Độ cứng
	M0	101,9 ^a ± 34,4	Trắng	10	Đặc, chắc
	MD1	525,4 ^b ± 74,8	Trắng	30	Mềm, mảnh
1	MD2	758,6 ^c ± 211,7	Trắng	80	Bở
2	MD3	1357,7 ^f ± 146,8	Vàng	40	Đặc
3	MD4	1557,3^e ± 51,9	Xanh nhạt	0	Đặc, chắc
4	MD5	1248,5 ^f ± 174,4	Trắng	0	Hơi bờ
5	MN1	473,3 ^a ± 31,4	Trắng	100	Bơi bờ
6	MN2	744,1 ^e ± 97,6	Trắng	30	Bở
7	MN3	670,5 ^d ± 35,6	Trắng	60	Bở
8	MN4	552,0 ^b ± 71,7	Hóa nâu	0	Bở
	MN5	588,3 ^b ± 23,6	Vàng nhạt	0	Bở

Các chữ đi kèm theo sau các số khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ở $p \leq 0,05$.



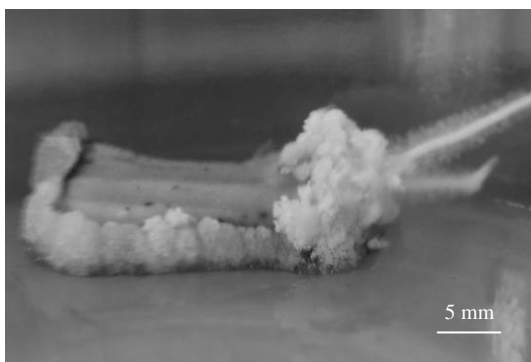
Hình 1. Mô sẹo hoá nâu trên MS + NAA 7 mg/l, BA 0,2 mg/l sau 3 tuần



Hình 2. Mô sẹo trên MS + 2,4-D 5 mg/l, BA 0,2 mg/l sau 3 tuần cấy

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ khoáng lên khả năng tạo mô sẹo

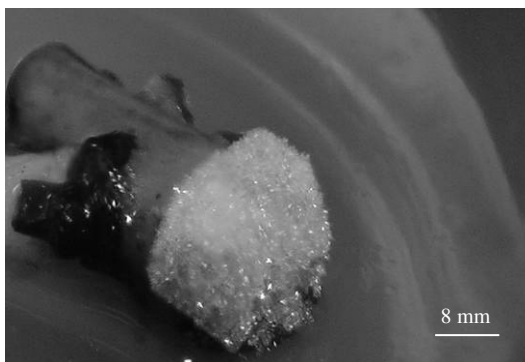
Sau 1 tuần nuôi cấy, hầu hết các mẫu cấy đều có phản ứng tạo sẹo. Ở nghiệm thức NK1 các mẫu tạo mô sẹo trắng, chắc có thể do hàm lượng khoáng thích hợp cho quá trình trao đổi chất ở tế bào, mô. Ở nghiệm thức NK2 sẹo bị hóa nâu sau 2 tuần nuôi cấy, có thể do nồng độ khoáng của môi trường thấp dẫn đến ức chế quá trình trao đổi chất. Ở nghiệm thức NK3 chỉ có 39% mẫu tạo sẹo, sẹo tạo ít, xốp, có thể là do hàm lượng khoáng quá thấp, không thích hợp cho quá trình tạo sẹo.



Hình 3. Mô sẹo trên nghiệm thức NK1 (môi trường MS + 2,4-D 5 mg/l, BA 0,2 mg/l) sau 3 tuần cấy



Hình 4. Mô sẹo trên nghiệm thức NK2 (môi trường MS1/2 + 2,4-D 5 mg/l, BA 0,2 mg/l) sau 3 tuần cấy



Hình 5. Mô sẹo trên nghiệm thức NK3 (môi trường White + 2,4-D 5 mg/l, BA 0,2 mg/l) sau 3 tuần cấy

3.3. Quá trình nhân chồi từ chồi ngủ

Sau 3 tuần nuôi cấy, ở nghiệm thức C6 (1 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA) cho thấy chồi tạo thành nhiều nhất trong các nghiệm thức (3,3 chồi), có thể là do nồng độ auxin, cytokinin và tỉ lệ auxin/cytokinin thích hợp giúp kích thích sự tăng chồi non, tạo mới mô phân sinh chồi ngọn. Ở các nghiệm thức khác như C4 và C8 (3 mg/l BA) các chồi hình thành có hiện tượng hóa vàng và rụng lá sau 4 tuần. Điều này có thể do nồng độ hormon cao dẫn đến sự ức chế quá trình trao đổi chất của mô, tế bào làm mô chết.

Bảng 4. Số lượng và đặc điểm chồi phát sinh từ chồi ngủ trên khúc cắt thân

Tên nghiệm thức	Số lượng chồi	Tình trạng mẫu cây
C1	$1,1^b \pm 0,2$	Chồi ít, phát triển chậm, thân mảnh, cao.
C2	$1,6^c \pm 0,1$	Chồi ít, phát triển bình thường, thân mảnh, vươn dài.
C3	$1,0^b \pm 0,2$	Chồi ít, thân to ngắn, màu trắng xanh.
C4	$0,0^a \pm 0,3$	Không tạo chồi, mẫu trương lớn.
C5	$1,1^b \pm 0,1$	Chồi ít, thân vươn dài, lá nhiều, màu xanh đậm, 1 phần úa vàng.
C6	$3,3^d \pm 0,3$	Chồi phát triển đều, thân to, lá xanh đậm.
C7	$0,5^a \pm 0,1$	Chồi ít, lá rụng dần, thân mảnh, sức sống yếu.
C8	$0,0^a \pm 0,2$	Không tạo chồi, mẫu trương lên rồi chết.



Hình 6. Chồi phát sinh từ chồi ngủ trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA sau 3 tuần nuôi cấy

3.4. Tách chiết và định tính alkaloid rotundine

3.4.1. Tách chiết và định tính alkaloid toàn phần



Hình 7. Dịch chiết acid từ thân, củ và mô sẹo Bình vôi. (A) Dịch chiết acid từ thân. (B) Dịch chiết acid từ củ. (C) Dịch chiết acid từ mô sẹo

Ghi chú: Từ trái qua phải

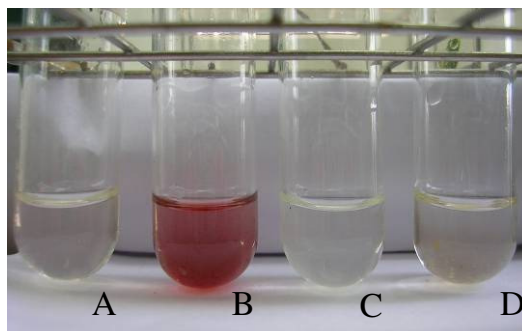
- Dung dịch mẫu.
- Dung dịch mẫu + thuốc thử Dragendoff.
- Dung dịch mẫu + thuốc thử Mayer.
- Dung dịch mẫu + thuốc thử Wagner.

Thuốc thử alkaloid cho phép định tính và định lượng alkaloid có trong mẫu, biểu hiện qua lượng tủa và qua màu đặc trưng của từng loại thuốc thử.

Với thuốc thử Dragendoff, cho tủa màu đỏ cam. Kết tủa này sinh ra do sự kết hợp của cation lớn là alkaloid với một anion lớn thường là anion phức hợp của thuốc thử. Tương tự đối với thuốc thử Mayer, cho tủa màu trắng đục; với thuốc thử Wagner cho tủa màu nâu đỏ. So sánh kết quả của các phản ứng từ mô sẹo, thân và củ cho thấy lượng tủa ở dịch chiết từ thân và mô sẹo rất ít, chỉ làm đục màu dung dịch, còn dịch chiết từ củ cho lượng tủa nhiều và có màu đặc trưng. Điều này cho thấy, trong thân và mô sẹo của Bình vôi có chứa alkaloid nhưng hàm lượng không nhiều, trong củ Bình Vôi có hàm lượng alkaloid cao nhất.

3.4.2. Sắc kí cột với dung môi là Ethyl acetate và định tính rotundine

Mẫu thân, củ và mô sẹo sau khi chiết tách, chạy sắc kí cột, thu được dung dịch có chứa alkaloid. Ở tất cả các mẫu, khi thử với thuốc thử Marquis đều tạo dung dịch màu đỏ tía. Điều này cho thấy trong dung dịch alkaloid thu được ở tất cả các mẫu thân, củ và mô sẹo đều có chứa alkaloid rotundine.



Hình 7. Mẫu chứa Rotundin sau khi sắc kí cột. (A) Dung dịch mẫu không có thuốc thử. (B) Dung dịch mẫu + thuốc thử Marquis. (C) Nước + thuốc thử Marquis. (D) Dung môi + thuốc thử Marquis

4. KẾT LUẬN

Khả năng tạo mô sẹo từ khúc cắt thân đạt hiệu quả cao trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 5 mg/l, BA 0,2 mg/l.

Môi trường có hàm lượng khoáng cao thích hợp cho quá trình tạo mô sẹo từ khúc cắt thân.

Trên môi trường MS bổ sung BA 1,0 mg/l, NAA 0,2 mg/l, quá trình hình thành chồi từ chồi ngủ xảy ra thuận lợi.

Ở tất cả các mẫu thí nghiệm (thân, củ và mô sẹo) đều có alkaloid rotundine. Trong đó mẫu củ chứa rotundin cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Vinh và cộng sự - Nhân giống Cẩm chương nhập nội bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật, Tạp chí Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm, 12- 1997.
2. Nguyễn Văn Vinh và cộng sự - Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh chồi và rễ phong lan giả hạt *Dendrobium Anosmum*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ **47** (5) (2009).
3. Nguyễn Văn Vinh - Khảo sát hợp chất Alkaloid có hoạt tính sinh học ở cây dừa cạn *Catharanthus Roseus* L trong điều kiện nuôi cấy in vitro, Tạp chí Khoa học và Công nghệ **48** (1) (2010).
4. Jeffrey W. Pollard and Jonh M. Walker - Method in Molecular Biology, Plant Cell and Tissue Culture **6** (1990).
5. Kumar P. P., Lakshamanan and Thorpe T. A. - Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene, In vitro cellular and developmental Biology – Plant **34** (1998) 94-103.
6. Murashige T., Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures, Plant Physiology **15** (1962) 473–497.
7. Steven B. Karch, Inc NetLibrary, Steven B. Karch - Pathology, Toxicogenetics, and Criminalistics of Drug Abuse, 2007.
8. Thomas Anderson Henry D. Sc. (Lond) - The Plant Alkaloids, 1949 by The Blakiston Company, Philadelphia. Toronto.
9. Nguyen van Vinh - Conservation of wild orchid germplasms in Viet nam using plant tissue culture and other techniques. 2010 Green Biotechnology International Symposium. MU, Taiwan .Oct. 2010.

SUMMARY

RESEARCH THE MICROPROPAGATION IN VITRO AND DETECTION ROTUNDINE OF *STEPHANIA ROTUNDA* LOUR.

Bình voi (Vietnamese name), *Stephannia Rotunda* Lour is a wild herbal species often found in jungles of Binh Thuan, Ninh Thuan, Lam Dong and Dong Nai. This is a valuable medicinal herb that can treat some diseases, such as: enteritis, stomachache, especially depression. Recently, because of the exploitation and destruction of jungles, the Binh Voi will be extinct in near future is undeniable. Therefore, using preservation and restoration techniques is necessary and in vitro is a efficient one. Media have 3 - 10 mg/l of 2,4-D formed callus from cuttings of the *Stephania rotunda* Lour. The medium having higher concentration of minerals had a higher ability of forming callus. Having 1 mg/l BA and 0,2 mg/l of NAA in the medium stimulated the forming of shoots from buds on cuttings. The substance alkaloid rotundine, which can cure the depression, appeared on the stem, bulb (natural) and callus (in vitro) samples. And the highest concentration of alkaloid rotundine is from bulb samples.

Key words: callus, plant growth regulators, *Stephania rotunda* Lour.