

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ KHẢ NĂNG NUÔI CÂY *IN VITRO* CỦA GAI CÂY XƯƠNG RỒNG (*OPUNTIA DILLENII* (KER GAWL.) HAW)

Vũ Thị Bạch Phượng[✉], Trần Thị Tạ Oanh, Quách Ngô Diễm Phương

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: vtbphuong@hcmus.edu.vn

Ngày nhận bài: 24.3.2016

Ngày nhận đăng: 23.10.2017

TÓM TẮT

Xương rồng *Opuntia dillenii* (Ker Gawl.) Haw là loài thực vật được sử dụng trong dân gian để chữa một số bệnh như mụn nhọt, bông, viêm da dày, rần cấn...; nhưng đến nay vẫn còn rất ít những nghiên cứu về hoạt tính sinh học của xương rồng, đặc biệt là bộ phận gai. Do đó, việc khảo sát hoạt tính sinh học của gai và nghiên cứu khả năng nuôi cấy *in vitro* gai xương rồng là một nghiên cứu đáng được quan tâm. Trong nghiên cứu này, cao ethanol của ba bộ phận ruột, vỏ, gai được đem đi khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp Yen, Duh, 1993, hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp đo đường kính vòng vô khuẩn, sau đó tiến hành định tính các nhóm chức có trong cả 3 bộ phận trên bằng các phản ứng định tính đặc trưng. Kết quả cho thấy, gai xương rồng là bộ phận có hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn cao hơn hẳn so với bộ phận ruột và vỏ. Cả ba bộ phận ruột, vỏ, gai đều chứa các hợp chất phenol, quinon, coumarin, flavanon, isoflavon, isoflavanon, auron, steroid, ngoài ra gai còn chứa flavon, chalcon, leucoantocyanidin. Đồng thời, nghiên cứu này cũng đã có được các kết quả khá quan trọng các thí nghiệm tạo chồi, rễ và gai của cây xương rồng: môi trường thích hợp cho việc tạo cụm chồi xương rồng là Murashige, Skoog, 1962 (MS) chứa 1 mg/l benzylaminopurine (BA) và 0,1 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA); cho việc tạo rễ là MS chứa 0,5 mg/l IBA với điều kiện không có ánh sáng; GA3 có tác dụng đến việc phát triển về chiều dài cũng như số lượng gai trong môi trường rần lẫn môi trường lỏng.

Từ khóa: Kháng khuẩn, kháng oxy hóa, gai xương rồng *in vitro*, xương rồng, *Opuntia dillenii*

MỞ ĐẦU

Opuntia dillenii (Ker Gawl.) Haw là loài xương rồng khá phổ biến ở các vùng sa mạc và cát khô hạn như Ấn Độ, Trung Quốc và một số nước khác trên thế giới, chủ yếu được sử dụng để chữa một số bệnh như: ho gà, ho co thắt và khạc ra đờm (quả đem nướng hoặc làm si rô); giảm nhiệt và kháng viêm (nước dịch chiết của quả); đắp mụn nhọt và rần cấn (dịch chiết của toàn cây) (Sharma *et al.*, 2015). Hiện tại trên thế giới đã có một số nghiên cứu về xương rồng *O. dillenii*, chủ yếu là về lĩnh vực dược như: hoạt tính kháng viêm (Ahmed *et al.*, 2005), kháng oxy hóa (Kumar *et al.*, 2014), kháng vi khuẩn, kháng nấm (Kumaar *et al.*, 2013), chống bệnh tiểu đường, hạ đường huyết (Abdallah, 2008)... và các nghiên cứu xác định các hợp chất hóa học có trong *O. dillenii* như flavonoid, tanin, alkaloid, steroid, phenol và một số chất khác (Kumar *et al.*, 2014). Tuy nhiên, các nghiên cứu về vi nhân giống xương rồng *O. dillenii* còn khá hạn chế, hầu như chỉ có một vài nghiên cứu sơ bộ về nhân chồi và tạo rễ (Lie, Ying, 2003), trong khi

các nghiên cứu vi nhân giống các loài khác cùng chi *Opuntia* thì có khá nhiều như *O. ficus-indica*, *O. robusta*, *O. lanigera* Salm-Dyck và hầu hết các nghiên cứu này đều không chú ý đến bộ phận gai của cây xương rồng. Do đó, nghiên cứu này đã tiến hành khảo sát hoạt tính sinh học của 3 bộ phận (gai, vỏ và ruột) để chứng minh gai là bộ phận có giá trị tiềm năng so với vỏ và ruột ở xương rồng, đồng thời khảo sát khả năng nuôi cấy *in vitro* gai xương rồng *O. dillenii* nhằm hướng đến mục tiêu góp phần cung cấp nguồn nguyên liệu có hoạt tính cho ngành dược trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hạt từ các quả xương rồng *O. dillenii* chín đỏ và các tầng xương rồng *O. dillenii* ở các cây mẹ đang phát triển khỏe mạnh thu hái ở xã Tây Phú, huyện Tây Sơn, tỉnh Bình Định.

Các chủng vi khuẩn gây bệnh được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Vi Sinh, khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp

Khảo sát hoạt tính sinh học của xương rồng ngoài tự nhiên

Điều chế cao ethanol của 3 bộ phận (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007)

3 bộ phận vỏ, ruột, gai từ các tầng của xương rồng thu hái ngoài tự nhiên đem phơi khô đến khối lượng không đổi, nghiền thành bột, ngâm trong ethanol bằng phương pháp ngâm dầm, sau 48 giờ thu dịch ngâm đem cô quay chân không ở 40°C để có cao chiết.

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết đã điều chế từ 3 bộ phận khác nhau bằng phương pháp thử năng lực khử của Yen và Duh (Yen, Duh, 1993)

Cho vào ống nghiệm 1 ml chất thử nghiệm; 2,5 ml dung dịch đệm sodium phosphat 0,2 M pH 6,6; 2,5 ml dung dịch potassium ferricyanide 1%. Hỗn hợp được ổn định ở nhiệt độ 50°C trong 20 phút. Sau đó, thêm vào hỗn hợp 2,5 ml acid trichloroacetic 10

%, lắc đều, ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ kết tủa. Lấy 1 ml dịch nổi, thêm 2 ml nước cất, 0,5 ml dung dịch FeCl₃ 1 %, lắc đều, để yên trong 5 phút. Sau cùng, đo độ hấp thụ ở bước sóng 700 nm, độ hấp thụ càng cao thể hiện năng lực khử của dung dịch thử nghiệm càng cao.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết đã điều chế từ 3 bộ phận khác nhau bằng phương pháp đo đường kính vòng vô khuẩn (Trần Linh Thuộc, 2001; Ủy ban bình thư tiếp vận, 1973)

Nuôi cấy huyền dịch vi khuẩn thử nghiệm; điều chỉnh huyền dịch vi khuẩn đạt độ đục chuẩn BaSO₄ 0,5 McFarland (OD 625 nm) bằng môi trường Luria-Bertani (LB) lỏng; trải 100µl dịch khuẩn đã chuẩn độ đục lên đĩa petri chứa môi trường thạch LB, làm khô bề mặt đĩa; tiến hành đục lỗ thạch với đường kính 6 mm; nạp hợp chất thử nghiệm với một lượng phù hợp nhất định vào lỗ thạch; ủ trong 24 giờ ở 37°C, sau đó đo đường kính vòng kháng khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn của hợp chất càng mạnh, đường kính vòng kháng khuẩn xung quanh lỗ thạch càng lớn, dựa trên một số chất có khả năng kháng khuẩn mạnh đã biết (ampicillin, chloramphenicol...), người ta đã đưa ra một chuẩn mực thông thường để đánh giá sơ bộ khả năng kháng khuẩn của một hợp chất bất kỳ (Bảng 1).

Bảng 1. Tiêu chuẩn đánh giá khả năng kháng khuẩn của hợp chất theo đường kính vòng kháng khuẩn (Ủy ban bình thư tiếp vận, 1973).

Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Đánh giá khả năng kháng khuẩn của hợp chất thử nghiệm
15-25	Kháng khuẩn mạnh
11-15	Kháng khuẩn yếu
<10	Vi khuẩn kháng lại hợp chất

Định tính sự hiện diện của một số nhóm chức có trong cao chiết đã điều chế từ 3 bộ phận khác nhau của xương rồng bằng các phản ứng định tính hóa học đặc trưng (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007)

Mẫu thử nghiệm được pha trong ethanol tuyệt đối với nồng độ 1 mg/ml.

Định tính phenol bằng FeCl₃: cho 1 ml dung dịch FeCl₃ 5% vào 1 ml dung dịch chất cần thử. Phản ứng dương tính khi có màu xanh dương đen.

Định tính quinon, 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 quinon, 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 1 ml hỗn hợp gồm 1 ml dung dịch thử nghiệm và 1 ml acid sulfuric 1% vào ống nghiệm để tiến hành định tính alkaloid

* Bảng thuốc thử Mayer: hòa tan 1,36 g HgCl₂ trong 60 ml nước cất và hòa tan 5 g KI trong 10 ml nước cất; trộn 2 hỗn hợp 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 trắng hoặc màu vàng nhạt.

* Bằng thuốc thử Wagner: hòa tan 1,27 g iod I_2 và 2 g KI trong 20 ml nước cất; hòa trộn 2 dung dịch, thêm nước cất cho đủ 100 ml; nhỏ 0,2 ml thuốc thử vào dung dịch acid loãng; mẫu có alcaloid 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; flavon và flavanol cho màu vàng đậm đến màu cam và có phát huỳnh quang; chalcon, auron 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 NaOH1% vào 1 ml dung dịch thử nghiệm, mẫu là flavon, isoflavon, isoflavanon, flavanol, chalcon, 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 1ml 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.

Phản ứng Cyanidin của Wilstatter: pha hỗn hợp phản ứng gồm 1 ml dung dịch thử nghiệm, 1 ml alcol tert-butyl hoặc alcol isoamyl, 0,5 ml HCl đậm đặc, 5 hạt Mg kim loại; đun nhẹ trong 5 phút; mẫu chứa flavon, flavanon, flavonol, flavanovol, xanthon sẽ có màu cam, đỏ hoặc tím; mẫu chứa isoflavon, isoflavanon, auron không đổi màu. Nếu Zn thay thế cho Mg, mẫu có flavanovol cho màu đỏ nhạt, flavonol và flavanon cho màu hồng nhạt hoặc không màu.

Định tính terpenoid- steroid:

Phản ứng Liebermann- Burchard để phát hiện steroid-triterpenoid: pha hỗn hợp gồm 1 ml dung dịch thử nghiệm, 1 ml anhidrid acetic, 1 ml chloroform; làm lạnh ống nghiệm rồi thêm 0,1 ml H_2SO_4 đậm đặc; phản ứng dương tính khi dung dịch đổi thành màu xanh dương, lục, cam hoặc đỏ bền không đổi.

Phản ứng Rosenheim để phát hiện steroid - triterpenoid: pha hỗn hợp gồm 1 ml dung dịch mẫu thử, 0,2 ml acid tricloacetic; phản ứng dương tính khi dung dịch đổi thành màu xanh dương, có saponin triterpen sau 20 phút.

Phản ứng Salkowski để phát hiện steroid: pha hỗn hợp gồm 1 ml dung dịch mẫu thử, 1 ml

chloroform, 1 ml H_2SO_4 đậm đặc; phản ứng dương tính khi dung dịch đổi thành màu đỏ đậm, xanh, xanh tím.

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.

Nuôi cấy nguồn nguyên liệu in vitro

Khử trùng tạo nguồn nguyên liệu in vitro

Khử trùng hạt và chồi ngủ từ tầng xương rồng (cladodes) thu hái ngoài tự nhiên. Hạt được lấy ra từ quả đem rửa sạch và ngâm với GA3 0,3 mg/l, rửa xà phòng, lắc còn 70° trong 5 phút, lắc với dung dịch javel (1 javel : 2 nước) trong 20 phút, rửa và cấy vào môi trường MS bổ sung 2mg/l BA. Các tầng xương rồng được cắt gai, rửa xà phòng, cắt thành các mẫu chứa 2-4 nướm, ngâm acid citric 0,25 % trong 60 phút, sau đó ngâm acid benzoic 0,25 % trong 2 giờ, lắc còn 70° trong 5 phút, lắc với dung dịch Javel (1 javel: 2 nước) trong thời gian 25 phút, rửa và cắt thành các mẫu có diện tích khoảng 1 cm² chứa 1 nướm rồi cấy vào môi trường MS.

Khảo sát nồng độ BA và NAA thích hợp để tạo cụm chồi

Thân xương rồng phát triển trên môi trường MS sau 36 ngày tuổi được cắt thành các đoạn nhỏ có chiều dài 5-7 mm, sau đó cấy vào môi trường MS bổ sung BA (0,1; 0,5; 1; 2; 3 mg/ml) và NAA (0,1 mg/ml). Sau 36 ngày, quan sát và ghi nhận số mẫu tạo chồi và số chồi hình thành trên một mẫu.

Khảo sát ảnh hưởng của IBA và ánh sáng lên sự tạo rễ của xương rồng

Thân xương rồng 36 ngày tuổi chưa có rễ hoàn chỉnh sau khi cắt thành các đoạn có chiều dài 5-7 mm được cấy vào môi trường MS bổ sung IBA (0,5; 1 mg/ml) và để trong điều kiện nuôi cấy có và không có ánh sáng. Sau 31 ngày, quan sát và ghi nhận số mẫu tạo rễ và số rễ trên một mẫu.

Thử nghiệm khả năng tăng sinh gai xương rồng in vitro

Khảo sát ảnh hưởng của GA3 lên sự phát triển của gai cây xương rồng

Thân xương rồng 36 ngày tuổi sau khi cắt thành các đoạn có chiều dài 5-7mm được cấy vào môi trường MS rắn bổ sung GA3 (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/ml). Sau 17 ngày, quan sát và ghi nhận số mẫu cảm ứng kéo dài gai, hình thái mẫu.

Khảo sát khả năng phát triển của gai trong môi trường lỏng

Thân xương rồng 36 ngày tuổi sau khi cắt thành các đoạn có chiều dài 5-7 mm được cấy vào môi trường MS lỏng bổ sung GA3 thích hợp cho sự phát triển của gai đã được khảo sát. Sau 23 ngày, quan sát và ghi nhận số mẫu cảm ứng kéo dài gai và hình thái mẫu.

Phân tích và xử lý số liệu

Kết quả được xử lý thống kê bằng chương trình SPSS 16.0 (Copyright SPSS Inc.) với độ tin cậy là 95%.

Bảng 2. Hiệu suất thu cao từ các bộ phận vỏ, gai, ruột..

Chỉ tiêu	Ruột	Vỏ	Gai
Trọng lượng tươi (g)	5230,55	259,19	211,79
Trọng lượng khô(g)	269,97	138,65	202,10
Cao (g)	129,15	6,32	8,97
Hiệu suất thu cao (%)	47,84	4,55	4,43

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết đã điều chế từ 3 bộ phận khác nhau bằng phương pháp thử năng lực khử của Yen và Duh

Một lượng bằng nhau của mỗi loại cao chiết (5 mg) được hòa trong 10 ml ethanol và tiến hành thí nghiệm. Kết quả trình bày trong bảng 3 cho thấy gai là bộ phận có hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất trong 3 bộ phận của xương rồng. Cho đến nay, trên thế giới cũng đã có vài nghiên cứu về hoạt tính kháng oxy hóa của xương rồng *O. dillenii* với nhiều phương pháp khác nhau, và đều khẳng định cả 3 bộ

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát hoạt tính sinh học của xương rồng ngoài tự nhiên

Điều chế cao ethanol của 3 bộ phận

Kết quả điều chế cao ethanol trong bảng 2 cho thấy hiệu suất cao thu được từ ruột cao nhất, vỏ và gai có hiệu suất thu cao thấp tương tự nhau. Tuy nhiên, đối với xương rồng, để thu hái ruột và vỏ, chúng ta phải thu nguyên tảng thực vật, mất nhiều thời gian để có thể tái sinh tảng mới; trong khi thu hái gai sẽ dễ dàng hơn, tảng thực vật vẫn nguyên vẹn và có thể tái sinh gai trong thời gian ngắn hơn nhiều. Do vậy, mặc dù hiệu suất thu cao của gai thấp hơn ruột, nhưng xét trên thực tế, việc thu hái gai vẫn có giá trị kinh tế hơn so với thu hái ruột.

phận hoa (Kumar *et al.*, 2014), quả (Loganayaki, Manian, 2010; Chang *et al.*, 2008) và thân xương rồng (trong đó có cả gai, ruột và vỏ) (Akter *et al.*, 2009) đều có hoạt tính kháng oxy hóa cao. Ngoài những nghiên cứu này, hiện tại vẫn chưa có nghiên cứu nào khác về hoạt tính kháng oxy hóa các thành phần của xương rồng có thể giúp chúng ta so sánh hoạt tính của riêng gai xương rồng. Do đó, việc tiếp tục mở rộng những nghiên cứu về gai xương rồng là một hướng nghiên cứu cần thiết để có thể khai thác được toàn bộ các tiềm năng của xương rồng *O. dillenii* trong tương lai.

Bảng 3. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết đã điều chế từ 3 bộ phận khác nhau của xương rồng.

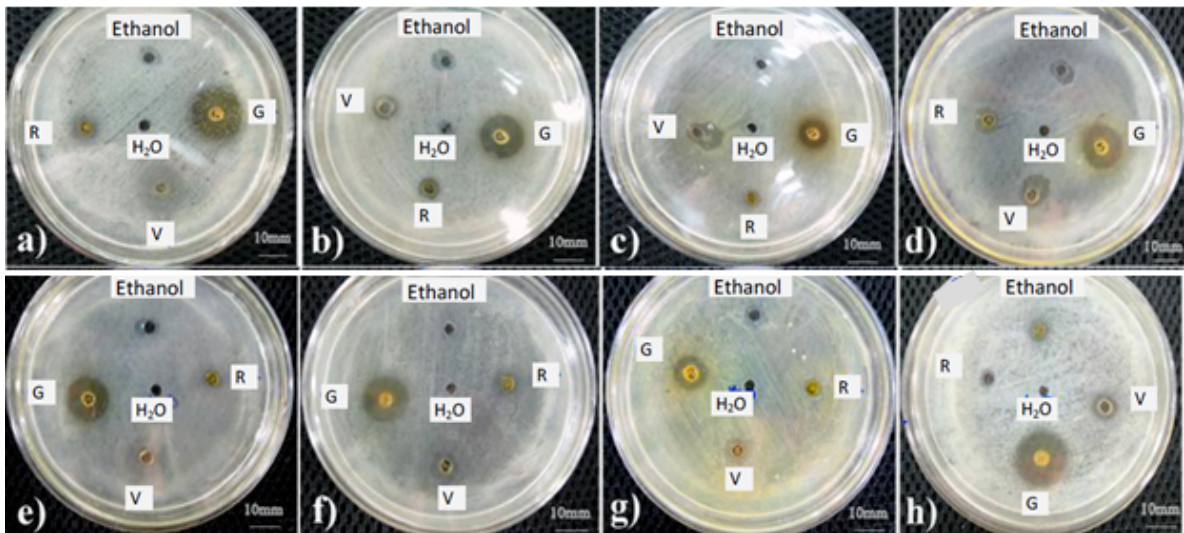
Chất thử nghiệm	Kết quả đo OD (OD700nm±SE)
Cao ruột	0,087 ^d ± 0,001
Cao vỏ	0,130 ^c ± 0,011
Cao gai	0,449^b ± 0,021
Vitamin E (chứng dương)	2,500 ^a ± 0,000
Ethanol (chứng âm)	0,000 ± 0,000

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

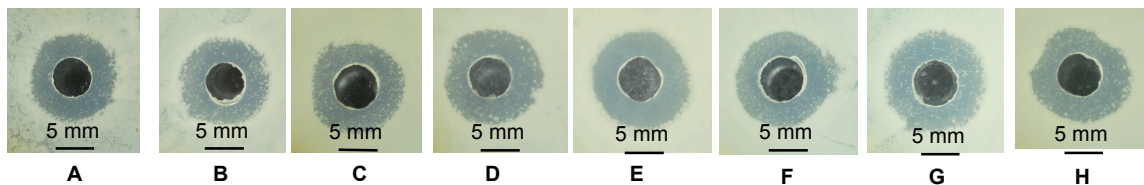
Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết đã điều chế từ ba bộ phận khác nhau bằng phương pháp đo đường kính vòng vô khuẩn

Mỗi lỗ thạch (đường kính 6 mm) sẽ được nạp 50 µg cao chiết. Cao chiết được hòa tan trong ethanol tuyệt đối. Hai loại mẫu đối chứng âm được chọn là nước cất vô trùng và ethanol, chứng dương là kanamycin, mỗi mẫu có thể tích tương ứng với thể tích đã sử dụng để nạp cao chiết trên mỗi nghiệm thức. Kết quả đo đường kính vòng kháng khuẩn được tính trừ đi đường kính của đối chứng ethanol (vì ethanol được đánh giá là chất có khả năng tiêu diệt vi khuẩn) và được xác định bằng giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, trình bày ở bảng 4 và hình 1 và 2. Kết quả rõ ràng gai có tính kháng khuẩn mạnh hơn so với vỏ và ruột. Trong đó, theo tiêu chuẩn đánh giá khả năng kháng khuẩn dựa trên

đường kính vòng kháng khuẩn như trình bày ở bảng 1, cao chiết của gai được đánh giá là có khả năng kháng khuẩn mạnh với hầu hết các chủng khuẩn (6/8 chủng) với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 15-17 mm, kháng yếu với 2 chủng còn lại (đường kính đạt 10-15 mm); cao chiết của ruột được đánh giá không có hoạt tính kháng khuẩn trên cả 8 chủng (<10mm); và vỏ gần như không có tính kháng khuẩn (5/8 chủng). Hiện tại, chúng tôi thấy chỉ có vài nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn của xương rồng, vài nghiên cứu này lại chỉ chứng minh hoạt tính kháng khuẩn mạnh của quả mà chưa thấy khảo sát trên các bộ phận khác (Kumaar *et al.*, 2013). Do đó, với kết quả này, hy vọng gai xương rồng *O. dillenii* sẽ được quan tâm nhiều hơn để có thể có được nhiều dữ liệu nâng hoạt tính kháng khuẩn của xương rồng ở các bộ phận khác, không chỉ có quả.



Hình 1. Đường kính vòng kháng khuẩn của các bộ phận gai (G), vỏ (V), ruột (R) và chứng âm (ethanol) tương ứng với các chủng khuẩn khác nhau. a): *S. aureus*; b): *S.aureus K*; c): *E. coli*; d): *E. coli K*; e) *Pseudomonas sp.*; f) *Salmonella s.p.*; g): *B. subtilis*; h): *Shigella.flexneri*.



Hình 2. Đường kính vòng kháng khuẩn của kháng sinh kanamycin tương ứng với các chủng khuẩn khác nhau. A: *S. aureus*; B: *S.aureus K*; C: *E. coli*; D: *E. coli K*; E *Pseudomonas*; F: *Salmonella*; G: *B.subtilis*; H: *Shigella.flexneri*.

Bảng 4. Đường kính vòng kháng khuẩn của các bộ phận của cây *O. dillenii* ứng với các chủng vi khuẩn khác nhau.

Các chủng khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm ± SE)				
	Kanamycin	Ethanol	Ruột	Vỏ	Gai
<i>S. aureus</i>	17,33 ^b ± 0,67	6,67 ^c ± 1,15	8,00 ^c ± 2,00	12,67 ^b ± 4,04	17,67^a ± 0,58
<i>S. aureus K</i>	17,50 ^{ab} ± 0,76	8,00 ^a ± 1,73	7,67 ^a ± 0,58	8,33 ^a ± 1,15	16,00^b ± 0,00
<i>E. coli</i>	17,33 ^{ab} ± 0,33	5,66 ^c ± 1,53	6,00 ^c ± 0,00	9,00 ^b ± 0,87	10,00^a ± 0,00
<i>E. coli K</i>	17,67 ^{ab} ± 0,67	7,33 ^c ± 1,54	6,83 ^c ± 0,76	10,33 ^b ± 0,58	19,33^b ± 0,58
<i>Pseudomonas sp.</i>	17,33 ^{ab} ± 0,67	6,50 ^c ± 0,50	6,33 ^c ± 0,29	10,83 ^b ± 1,04	15,00^a ± 1,00
<i>Salmonella sp.</i>	16,83 ^{ab} ± 0,44	6,33 ^c ± 1,53	6,67 ^c ± 0,58	9,67 ^b ± 0,58	15,67^a ± 0,00
<i>B. subtilis</i>	18,16 ^{ab} ± 0,76	6,00 ^b ± 0,00	6,00 ^b ± 1,00	6,83 ^b ± 0,28	11,33^a ± 0,29
<i>Shigella flexneri</i>	15,67 ^a ± 0,67	6,67 ^c ± 1,15	6,67 ^c ± 0,58	9,33 ^b ± 0,58	18,50^a ± 1,32

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

Định tính sự hiện diện của một số nhóm chức có trong cao chiết đã điều chế từ ba bộ phận khác nhau của xương rồng bằng các phản ứng định tính hóa học đặc trưng

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, cả ba bộ phận ruột, vỏ, gai đều có chứa hợp chất phenol, quinon,

coumarin, flavanon, steroid. Trong các phản ứng định tính flavonoid, chỉ có gai cho phản ứng dương tính với NaOH 1%, chứng tỏ trong gai có chứa flavon, isoflavon, isoflavanon, flavanon, chalcon, leucoantocyanidin mà vỏ và ruột không có. Có lẽ chính sự khác biệt này đã khiến cho hoạt tính của gai cao hơn hẳn so với vỏ và ruột.

Bảng 5. Định tính một số nhóm chức có trong gai so với ruột và vỏ.

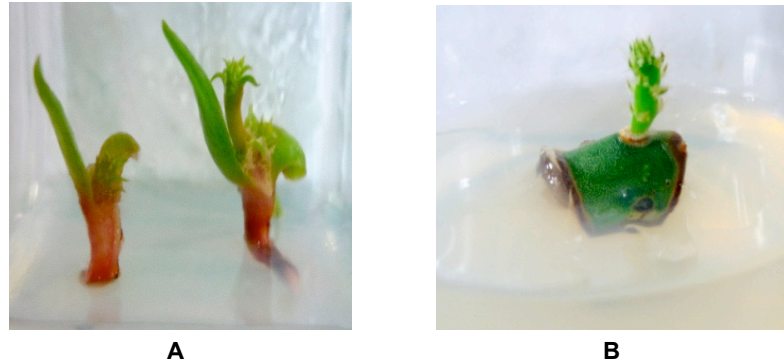
Nhóm chức	Thuốc thử	Ruột	Vỏ	Gai
Phenol	FeCl ₃	+ (xanh nhạt)	+ (xanh dương)	+ (xanh dương)
Quinon, coumarin	Bortrager với KOH/ methanol	+ (xanh lục)	+ (xanh lục)	+ (cam đỏ)
Tannin	Gelatin mặn	-	-	-
Alcaloid	Mayer	+ (kết tủa trắng)	-	+ (kết tủa vàng)
	Wagner	+	-	+
Flavonoid	H ₂ SO ₄	+ (cam)	+ (cam đỏ)	+ (cam đỏ)
	NaOH 1%	-	-	+ (vàng cam)
	AlCl ₃ 1%	-	+ (xanh lục)	+ (xanh lục)
	Cyanidin	Bột Mg: - Bột Zn: -	Bột Mg: - Bột Zn: -	Bột Mg: - Bột Zn: +(hồng)
Lacton vòng 5	Kedde	-	-	-
Terpenoid-steroid.	Liebermann-Burchard	+ (xanh lục)	-	-
	Rosenheim	-	-	-
	Salkowski	+ (cam đỏ)	+ (cam đỏ)	+ (cam đỏ)
Saponin	Tính tạo bọt	-	-	-

Nuôi cấy nguồn nguyên liệu *in vitro*

Khử trùng tạo nguồn vật liệu *in vitro*

Hạt và chồi ngủ sau ba tuần khử trùng thu được các chồi cây con *in vitro* (Hình 3), các chồi

cây con này đều phát triển như nhau. Tuy nhiên, để đồng nhất các điều kiện thí nghiệm trong nghiên cứu này thì mẫu chồi ngủ sau khi khử trùng được dùng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.



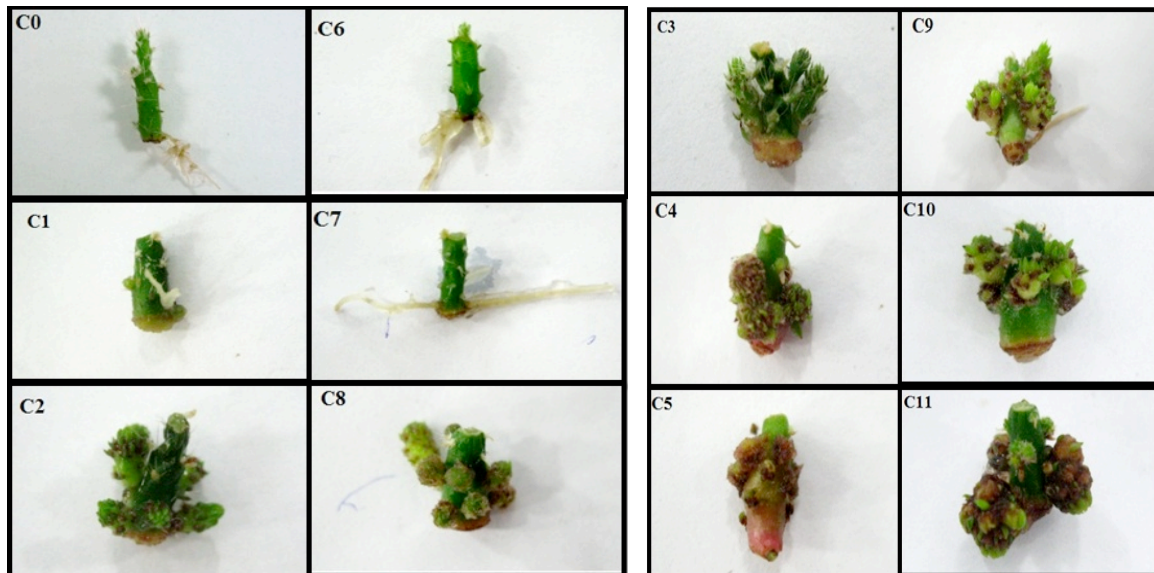
Hình 3. Các chồi cây xương rồng in vitro. A: cây con được mọc ra từ hạt; B: chồi con được khử trùng từ chồi ngủ.

Khảo sát nồng độ BA và NAA thích hợp để tạo cụm chồi

Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến tạo cụm chồi được thể hiện trong bảng 6 và hình 4.

Trong loạt nghiệm thức thiết kế, nồng độ BA càng tăng, khả năng tạo cụm chồi của mẫu càng cao. Bên cạnh đó, khả năng tạo cụm chồi khi sử dụng BA kết hợp với NAA tốt hơn khi chỉ sử dụng BA. Dựa vào hình thái của chồi (Hình 4), có thể thấy môi trường thích hợp cho việc tạo cụm chồi trong loạt nghiệm thức này là môi trường chứa 1

mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA (nghiệm thức C9). Kết quả của nghiên cứu này tương tự như kết quả của Lie, Ying (2003) khi chứng minh vai trò của BA kết hợp với auxin trong việc tạo chồi *O. dillenii* là khi sử dụng 0,5 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l IBA sẽ cho kết quả tạo chồi tốt (Lie, Ying, 2003). Tuy nhiên, kết quả giúp chúng tôi có thể đánh giá được khả năng nhân chồi của xương rồng khá thấp (số chồi/mẫu thấp đều ở các nghiệm thức). Với hệ số nhân thấp, việc nhân giống để tạo nguyên liệu sẽ ít có hiệu quả kinh tế. Do vậy, nghiên cứu nuôi cấy gai để tạo nguyên liệu sẽ trở nên có tiềm năng hơn hẳn đối với loài thực vật này.



Hình 4. Ảnh hưởng của NAA và BA đến khả năng tạo cụm chồi.

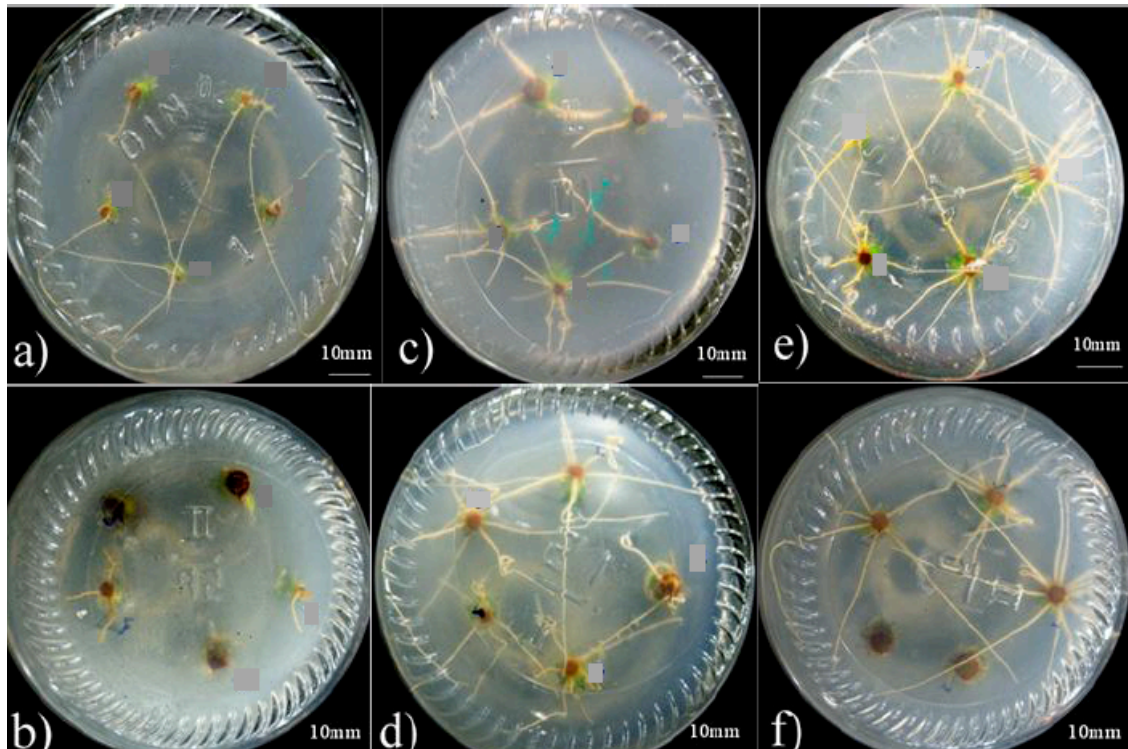
Bảng 6. Tỷ lệ (%) mẫu tạo chồi sau 36 ngày nuôi cấy.

Nghiệm thức	Môi trường MS bổ sung BA	Tỷ lệ (%) mẫu tạo chồi	Nghiệm thức	Môi trường MS bổ sung 0,1mg/ml NAA và BA	Tỷ lệ (%) mẫu tạo chồi
C0	0 mg/ml BA	80,67 ± 2,08	C6	0 mg/ml BA	79,67 ± 1,53
C1	0,1 mg/ml BA	20,33 ± 2,52	C7	0,1 mg/ml BA	59,00 ± 1,73
C2	0,5 mg/ml BA	100,00 ± 0,00	C8	0,5 mg/ml BA	100,00 ± 0,00
C3	1 mg/ml BA	100,00 ± 0,00	C9	1 mg/ml BA	100,00 ± 0,00
C4	2 mg/ml BA	100,00 ± 0,00	C10	2 mg/ml BA	100,00 ± 0,00
C5	3 mg/ml BA	100,00 ± 0,00	C11	3 mg/ml BA	100,00 ± 0,00

Khảo sát ảnh hưởng của IBA và ánh sáng lên sự tạo rễ của xương rồng

Kết quả thu được sau 31 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 7 và hình 5. Mẫu sẽ cảm ứng tạo rễ sau 9 ngày nuôi cấy. Ở tất cả các môi trường đều có sự kích thích tạo rễ. Trong đó, môi trường thích hợp nhất cho việc tạo rễ là môi trường IBA 0,5 mg/l đặt trong điều kiện không có ánh sáng. Phân tích từng

yếu tố tác động, chúng tôi nhận thấy số rễ/mẫu trong môi trường có IBA đặt ở điều kiện tối thường cao hơn ở điều kiện sáng có lẽ do IBA dưới ngoài sáng sẽ mất một phần hoạt tính. Bên cạnh đó, số rễ/ mẫu tăng khi nồng độ của IBA tăng. Do vậy, rõ ràng IBA có thể tác động tăng khả năng tạo rễ xương rồng, và muốn khai thác hiệu quả tác động của IBA, cần loại bỏ điều kiện ánh sáng đến IBA để có thể phát huy hết hoạt tính của chúng.



Hình 5. Sự phát triển của rễ sau 31 ngày nuôi cấy. a) IBA: 0 mg/l, có ánh sáng. b) IBA: 0 mg/l, không có ánh sáng c) IBA: 0,5 mg/l, có ánh sáng. d) IBA: 0,5 mg/l, không ánh sáng. e) IBA: 1 mg/l, có ánh sáng. f) IBA: 0 mg/l, không ánh sáng.

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA và ánh sáng lên sự tạo rễ cây *O. dilleni*.

Chỉ tiêu Nồng độ IBA (mg/l)	Tỷ lệ (%) mẫu tạo rễ		Số rễ trên mẫu	
	Có ánh sáng	Không ánh sáng	Có ánh sáng	Không ánh sáng
0	93,33 ^a ±11,55	60 ^a ± 34,64	1,33 ^b ±0,58	1,33 ^b ±0,58
0,5	100^a±0,00	93,33^a±11,55	4,67 ^{ab} ±1,15	6,00^a±0,00
1	93,33 ^a ±11,55	80 ^a ±20,00	5,67^a±1,15	6,00 ^a ±1,00

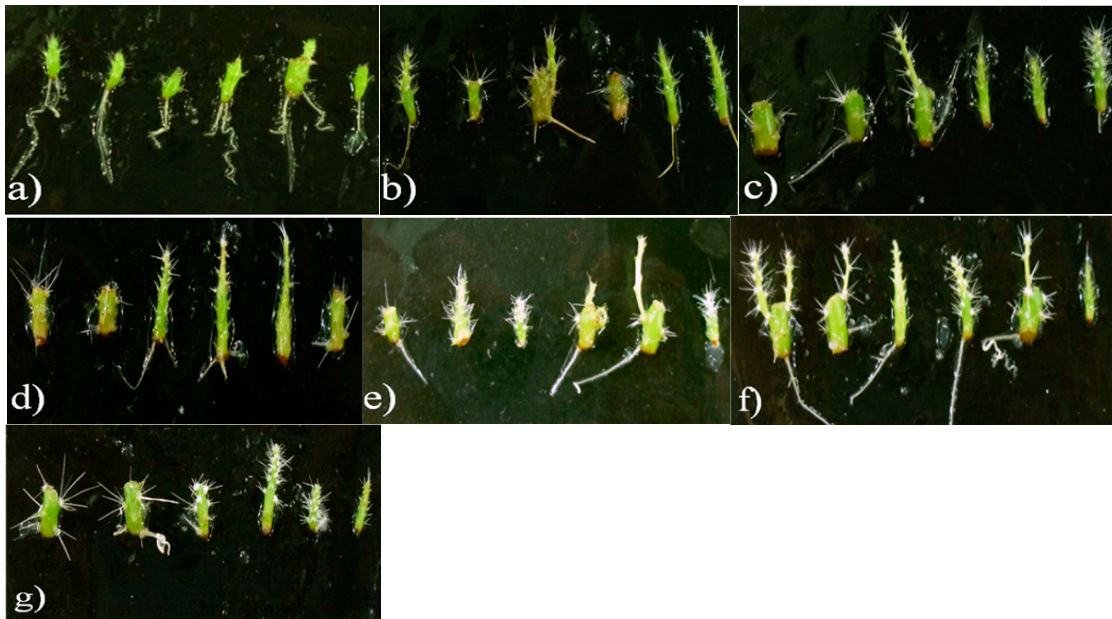
Ghi chú: Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Thử nghiệm khả năng tăng sinh gai xương rồng *in vitro*

Khảo sát ảnh hưởng của GA3 lên sự phát triển của gai cây xương rồng

Sau 17 ngày nuôi cấy trên môi trường có chứa GA3 với các nồng độ khác nhau, kết quả từ hình 6 cho thấy so với đối chứng không bổ sung,

tất cả các mẫu khi cấy vào môi trường có GA3 đều cảm ứng phát triển gai, đối với các mẫu thân giữa, gai phát triển dài ra; còn đối với các mẫu thân mang chồi ngọn, có sự kéo dài lông kèm theo tăng số lượng và chiều dài của gai. Trong đó, môi trường có 0,4 mg/l GA3 và 0,5 mg/l GA3 có sự cảm ứng tạo gai tốt nhất trong loạt nghiệm thức đã thiết kế.

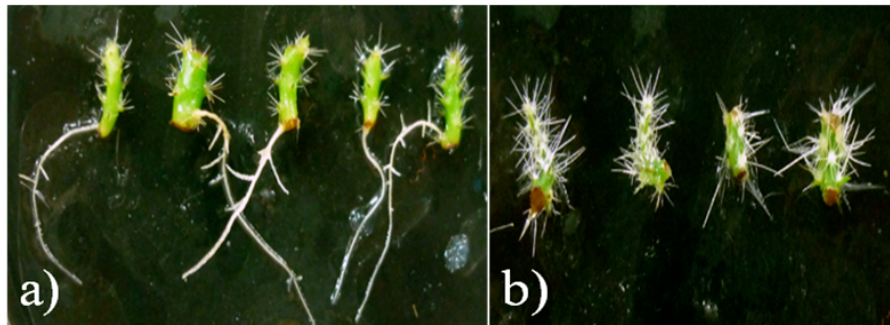


Hình 6. Kết quả cảm ứng phát triển gai ở các môi trường có bổ sung GA3. a) GA3 0mg/l. b) GA3 0,05mg/l. c) GA3 0,1mg/l. d) GA3 0,2mg/l. e) GA3 0,3mg/l. f) GA3 0,4mg/l. g) GA3 0,5mg/l.

Khảo sát khả năng phát triển của gai trong môi trường lỏng

Tiến hành nuôi cấy các mẫu xương rồng trong môi trường lỏng chứa 0,5 mg/l GA3. Sau 23 ngày, kết quả cho thấy có sự phát triển về số lượng cũng như chiều dài của gai trên các mẫu nuôi cấy (Hình 7), điều này cho thấy các mẫu xương rồng có thể

sống được trong môi trường lỏng, và tác dụng của GA3 trong sự phát triển của gai vẫn hiệu quả trong môi trường lỏng. Gai là bộ phận có hoạt tính cao hơn so với vỏ và ruột. Kết quả thử nghiệm này cho thấy khả năng nuôi cấy gai bằng môi trường lỏng để thu hoạt chất có hoạt tính, hứa hẹn nhiều tiềm năng trong tương lai khi phát triển tăng sinh gai theo mô hình công nghiệp hóa.



Hình 7. Sự phát triển của gai nuôi trong môi trường lỏng; a) Môi trường MS. b) Môi trường GA3 0.5 mg/l.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được gai của cây xương rồng (*Opuntia dillenii*) là bộ phận có hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn cao hơn so với vỏ và ruột. Cả ba bộ phận ruột, vỏ, gai đều chứa các hợp chất phenol, quinon, coumarin, flavanon, isoflavon, isoflavanon, auron, steroid, ngoài ra gai còn chứa flavon, chalcon, leucoantocyanidin. Đồng thời, nghiên cứu cũng đã đưa ra được một số điều kiện nhằm tạo chồi và rễ xương rồng (*Opuntia dillenii*); đặc biệt, GA3 có khả năng kích thích tạo gai và giúp cho gai phát triển cả trong môi trường rắn lẫn môi trường lỏng.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn quý nghiên cứu khoa học của Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ nghiên cứu này trong khuôn khổ đề tài T2015-13.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdallah Inas ZA (2008) Evaluation of hypoglycemic activity of *Opuntia dillenii* Haw fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Egypt J Hosp Med* 33: 544–558.

Ahmed MS, El Tanbouly ND, Islam WT, Sleem AA, El Senousy AS (2005) Antiinflammatory flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. flowers growing in Egypt. *Phytother Res* 19(9): 807–809.

Chang EF, Hsieh CL, Yen GC (2008) The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. *Food*

Chem 106: 569–575.

Kumaar APS, Vanitha J, Venkateshwaran K, Reddy KS, Karthikeyan D (2013) Antibacterial and Antifungal Activity of *Opuntia dillenii* (Cactaceae) Fruit Extract. *J Environ Nanotechnol* 2(1): 16–19.

Kumar AS, Ganesh M, Peng MM, Tae JH (2014) Phytochemical, antioxidant, antiviral and cytotoxic evaluation of *Opuntia dillenii* flowers. *Bangladesh J Pharmacol* 9: 351–355

Lei C, Ying HS (2003) Micropropagation of *Opuntia dillenii* (Ker Gawl.) Haw. *Guihaia* 3: 259–263.

Loganayaki N, Manian S (2010) *In vitro* antioxidant properties of indigenous underutilized fruits. *Food Sci Biotechnol* 19(3): 725–734.

Nguyễn Kim Phi Phụng (2007) *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Sharma C, Rani S, Kumar B, Kumar A, Raj V (2015) Plant *Opuntia dillenii*: A Review on It's Traditional Uses, Phytochemical and Pharmacological Properties. *EC Pharmaceutical Science* 1.1: 29–34

Trần Linh Thuớc, Nguyễn Đức Hoàng, Phan Thị Phương Trang, Phạm Thị Hồng Tươi (2001) *Thực tập vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Ủy ban binh thư tiếp vận (1973). *Kỹ thuật thí nghiệm*. Viện thí nghiệm trung ương, Cục quân y: 437–758.

Võ Văn Chí (2012) *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản y học Hà Nội 2: 1230–1231.

Yen GC, Duh PD (1993) Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. *J Am Oil Chem Soc* 70(4): 383–386.

BIOLOGICAL ACTIVITY AND *IN VITRO* SPINE CULTURE OF *OPUNTIA DILLENII* (KER GAWL.) HAW

Vu Thi Bach Phuong, Tran Thi Ta Oanh, Quach Ngo Diem Phuong

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

SUMMARY

Opuntia dillenii (Ker Gawl.) Haw is used as a traditional medical herb to cure a number of diseases such as boils, burns, gastritis, snake bites ... but so far there have been few studies on biological activities, especially those of spine of cactus. Thus, the bioactive survey of spine and initial study of *in vitro* culture of cactus is necessary. In this study, ethanol extracts of three parts, pul, brak and spine, were examined with antioxidant activity by Yen and Duh method, and antibacterial activity by determination of zone of inhibition method. After that, these extracts were subjected to preliminary phytochemical testing to detect for the presence of different chemical groups of compounds. Results showed that antibacterial and anti-oxidant activities of spine is higher than those of pulp and bark of *Opuntia dillenii*. All three parts, pul, bark, and spine, contain phenols, quinones, coumarin, flavanon, isoflavones, isoflavanon, auron, steroids, besides spine contains flavones, chalcon, leucoantocyanidin. In addition, this study also had positive results in experiments on the induction of buds, roots and spines of cactus (*Opuntia dillenii*). The proliferation of the shoots achieved in MS medium supplemented with 1mg/l benzylaminopurine (BA) and 0,1mg/l naphthaleneacetic acid (NAA). Root formation was influenced by the combination of light and indolebutyric acid (IBA), so the optimal medium is 0,5mg/l IBA set in the absence of light bright. With materials from *in vitro* micro-propagation process, *in vitro* spine proliferation experiment was conducted using gibberellic acid (GA3).

Keywords: *Antibacterial active, anti-oxidant, Cactus Opuntia dillenii, spine of cactus in vitro*