

THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ NHÂN GIỐNG *IN VITRO* NAM TINH PIERRE

ĐÀO QUỐC HƯNG*, PHẠM THỊ NHẬT TUYỀN, NGUYỄN THỊ NGÀN

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên hệ: daoquochung2022@gmail.com

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v65i05.4967>

Tóm tắt: Nam tinh pierre (*Arisaema pierreanum* Engl.) thuộc chi Nam tinh (*Arisaema*), là loài hiếm và mới chỉ được phát hiện núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh. Nhiều loài trong chi này đã được nghiên cứu xác định thành phần hóa học và hoạt tính sinh học, có giá trị dược liệu. Đến nay các nghiên cứu về loài Nam tinh pierre chỉ dừng lại ở việc phân loại. Nghiên cứu này được thực hiện để kiểm tra thành phần hóa học và nhân giống *in vitro* loài cây này.

Mẫu củ khô Nam tinh pierre được chiết bằng dung môi ethanol, cô quay và phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS). Kết quả thu được 176 hợp chất và nhận dạng được 11 hợp chất có khối lượng phân tử tương ứng với các hợp chất đã được tìm thấy trong chi Nam tinh (*Arisaema*): (2*R**,3*S**,5*S**)-*N*,2-dimethyl-3-hydroxy-5(10-phenyldecyl)pyrrolidine; germacrene D; campesterol; emodin; coniferin; methylconiferin; 6-deacetylnimbin; 28-deoxonimbolide; aurantiamide acetate (N-benzoyl-1-phenylalanyl-1-phenylalaninol acetate); luteolin; colchicine.

Lần đầu tiên nhân giống *in vitro* thành công Nam tinh pierre. Thời gian vô trùng mẫu củ bằng NaClO 5% thích hợp là 30 phút. Môi trường MS bổ sung 2 mg/L 2,4-D thích hợp cho sinh trưởng mô sẹo. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA thích hợp với cảm ứng tạo chồi từ mô sẹo. Môi trường ½ MS với 1 mg/L NAA và 0,2 mg/L BA thích hợp cho cảm ứng tạo rễ từ chồi *in vitro*.

Từ khóa: Nam tinh pierre, *Arisaema pierreanum* Engl., nhân giống *in vitro*, thành phần hóa học

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nam tinh pierre (*Arisaema pierreanum* Engl.) thuộc chi Nam tinh (*Arisaema*) của họ Ráy (Araceae). Đây là một loài hiếm, chỉ mới được phát hiện tại núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh. Engler mô tả Nam tinh pierre lần đầu tiên vào năm 1920 dựa trên mẫu vật của Pierre thu thập [1].

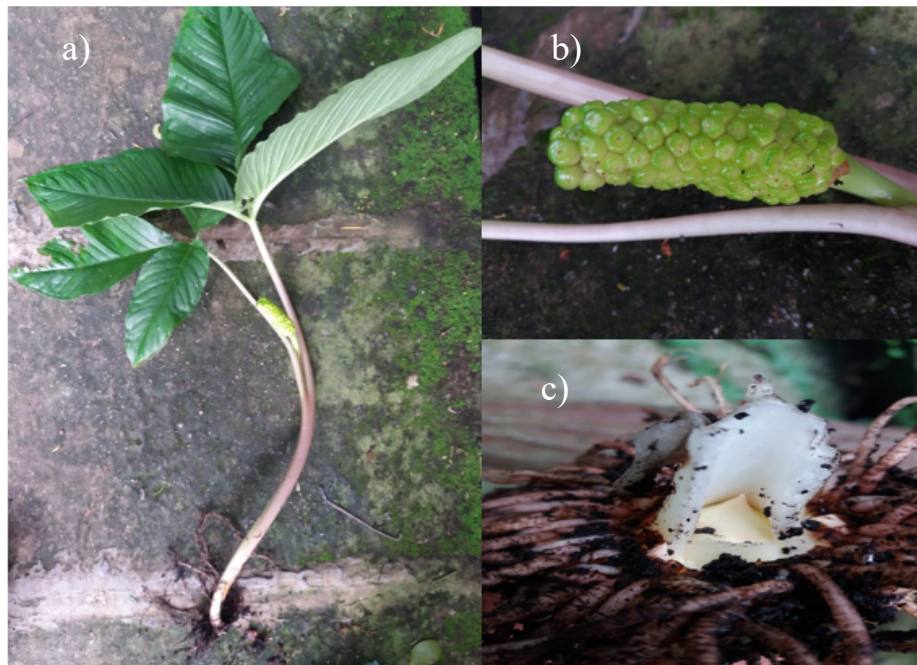
Một số loài thuộc chi Nam tinh đã được nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học. Agglutinin phân lập từ *Arisaema heterophyllum* Blume, có thành phần hoạt tính chống ung thư [2]. Chiết xuất hữu cơ *Arisaema tortuosum* có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, độc tính thực vật, chống oxy hóa [3] và chống ung thư [4]. Thành phần tinh dầu *Arisaema anurans* gồm asarone (11,08%), cubenol (8,43%), guaiaol (4,37%), eugenol (3,46%), linalool (3,41%) và α -bisabolol (3,29%) [5]. Rutin, schaftoside và apigenin-6,8-di-C- β -D-galactoside của khoảng 60 hóa chất thực vật ở các loài khác nhau thuộc chi *Arisaema* có khả năng kháng virus gây bệnh hô hấp ở người [6]. Dịch chiết của *Arisaema jacquemontii* có khả năng chống oxy hóa và điều hòa miễn dịch [7], hoạt tính kháng khuẩn của các chất methanol, n-hexan, ethyl acetate, các phân đoạn hòa tan n-butanol [8]. Đã có các nghiên cứu phân loại đối với loài Nam tinh pierre [9, 10] nhưng chưa có công bố nào về thành phần hóa học cũng như nhân giống *in vitro* về loài này.

Nam tinh pierre là một loài có nơi phân bố hạn chế [1, 9, 10]. Nam tinh pierre sinh trưởng phát triển mạnh vào mùa mưa (khoảng tháng 6 đến tháng 10), thời gian còn lại trong năm cuống và lá rụng đi, củ nằm dưới đất [1]. Do đó, rất khó phát hiện chúng, gây cản trở trong việc thu thập mẫu. Việc lưu giữ mẫu thí nghiệm, đặc biệt với cuống lá, lá tươi trong thời gian dài cũng rất khó khăn. Phân tích thành phần hóa học Nam tinh pierre giúp cho việc đánh giá giá trị dược liệu của chúng. Nhân giống *in vitro* loài cây giúp cung cấp vật liệu khởi đầu cho nhiều nghiên cứu khác, khắc phục được những khó khăn trong thu thập mẫu trong tự nhiên, tách chiết được lượng lớn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu cây Nam tinh Pierre (*Arisaema pierreanum* Engl.) được thu thập từ núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh (Hình 2.1).



Hình 2.1: Cây Nam tinh Pierre được thu thập trên núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh: a) thân cây Nam tinh Pierre; b) quả Nam tinh Pierre; c) củ và rễ Nam tinh Pierre

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân tích thành phần hóa học

Củ cây Nam tinh Pierre được rửa sạch, thái thành lát mỏng, phơi khô, nghiền vỡ. Sau đó, ngâm trong dung môi ethanol 96% trong 5 ngày, siêu âm trong 15 phút và lọc. Cô quay dịch chiết được bằng máy cô quay hút chân không cho đến khi còn khoảng 5 mL, chuyển vào lọ thủy tinh mở nắp để bay hơi còn hoàn toàn. Thành phần hóa học trong cao còn được phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-ESI-MS), hệ dung môi rửa giải bằng methanol và nước trong thời gian 30 phút trên thiết bị Agilent microOTOP-Q.

2.2.2. Vô trùng mẫu cấy

Mẫu lá, cuống lá, mẫu củ được rửa với nước xà phòng để giảm bớt bụi bám và một sinh vật, rồi rửa sạch với nước máy. Cắt mẫu với kích thước phù hợp: lá 1 x 1 cm, cuống lá 1 cm, củ 1 x 1 x 1 cm. Củ được gọt vỏ trước khi cắt thành mẫu cấy. Cho mẫu cấy vào bình, ngâm trong cồn 70% 1 phút, rửa với nước cất vô trùng 3 lần. Vô trùng mẫu bằng dung dịch NaClO 5% (Javel 100%) với 3 giọt Tween 80 với thời gian khử trùng 10, 20 và 30 phút. Rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 4 lần, loại bỏ phần mô bị hoại tử, rồi đặt vào môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) [11].

2.2.3. Tạo mô sẹo

Sử dụng phytohormone 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) để cảm ứng tạo mô sẹo mẫu cấy ở các mức nồng độ 0,5, 1, 2, 4 mg/L trên nền môi trường MS. Các bình thí nghiệm này được đặt nuôi trong tối, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Thí nghiệm được lặp lại 8 lần. Sau 10 tuần thu mẫu cấy, quan sát hình thái, rồi xác định khối lượng tươi, khối lượng khô (sấy ở nhiệt độ 80°C trong 10 giờ).

2.2.4. Cảm ứng phát sinh chồi từ mô sẹo

Mô sẹo có kích thước khoảng 0,3x0,3x0,3 mm (khoảng 0,1g) được cấy vào môi trường MS bổ sung BA ở các mức nồng độ 1, 1,5 và 2 mg/L. Thí nghiệm được lặp lại 6 lần. Các bình mẫu này được đặt nuôi trong điều kiện ánh sáng 3000 lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Quan sát đặc điểm chồi xuất hiện sau 7 tuần nuôi cấy.

2.2.5. Tái sinh tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi đơn *in vitro* có chiều cao từ 2 - 3 cm được cấy vào môi trường $\frac{1}{2}$ MS [42] bổ sung NAA (0,5; 1; 1,5 mg/L) và 0,2 mg/L BA. Thí nghiệm được lặp lại 6 lần. Đếm số rễ/mẫu và quan sát đặc điểm rễ sau 7 tuần nuôi cấy.

2.2.6. Phân tích thống kê

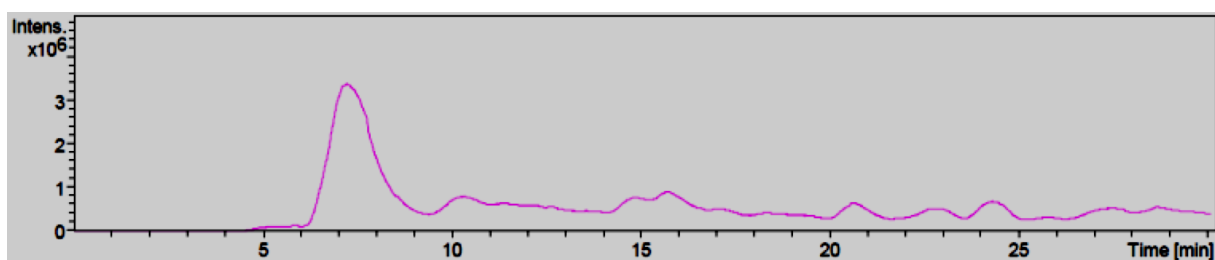
Thí nghiệm một yếu tố như chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy hoặc thời gian khử trùng được thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD). Dữ liệu thu thập được phân tích phương sai (ANOVA) sử dụng kiểm định sai khác có ý nghĩa nhỏ nhất (LSD), $\alpha = 0.05$. ANOVA được thực hiện bằng phần mềm Statgraphics XV.I (Statgraphics Technologies, Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thành phần hóa học phát hiện được trong Nam tinh pierre

Kết quả phân tích mẫu cao cồn chiết từ củ Nam tinh pierre bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS) cho thấy có 176 hợp chất (Hình 3.1). Trong đó, có 11 hợp chất (Bảng 3.1) có khối lượng phân tử tương đương với các hợp chất đã được tìm thấy trong các loài cùng chi *Arisaema*: (2*R**,3*S**,5*S**)-*N*,2-dimethyl-3-hydroxy-5(10-phenyldecyl)pyrrolidine (**1**) (*A. franchetianum*); germacrene D (**2**) (*A. anurans*); campesterol (**3**) (*A. tortuosum*); emodin (**4**) (*A. franchetianum*); coniferin (**5**) (*A. franchetianum*); methylconiferin (**6**) (*A. franchetianum*); 6-deacetylnimbin (**7**) (*A. decipiens*); 28-deoxonimbolide (**8**) (*A. decipiens*); aurantiamide acetate (N-benzoyl-1-phenylalanyl-1 phenylalaninol acetate) (**9**) (*A. erubescens*); luteolin (**10**) (*A. tortuosum*); colchicine (**11**) (*A. tortuosum*).

Những hợp chất này đã được chứng minh có hoạt tính dược liệu cao. Chẳng hạn, campesterol là tiền chất quan trọng đối với nhiều loại thuốc sterol, dùng làm thuốc cân bằng nội tiết tố trong ngành dược phẩm [13]. Emodin là một dẫn xuất anthraquinone tự nhiên, có thể đảo ngược tính trạng đa kháng bạch cầu [14]. Aurantiamide acetate đã được nghiên cứu có thể ngăn chặn sự phát triển của u thần kinh ác tính [15]. Luteolin là một flavonoid phổ biến tồn tại trong nhiều loại thực vật bao gồm trái cây, rau và dược liệu. Luteolin có nhiều tác dụng sinh học như chống viêm, chống dị ứng và chống ung thư, có chức năng như một chất chống oxy hóa hoặc pro-oxi hóa [16]. Colchicine đã được sử dụng để điều trị các bệnh khác nhau. Colchicine được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh gút cấp tính, điều trị dự phòng chống lại bệnh gút và điều trị các bệnh về tinh thể và sốt Địa Trung Hải [17]. Như vậy, Nam tinh pierre là loài có giá trị dược liệu cần được nghiên cứu và ứng dụng trong đời sống.



Hình 3.1. Sắc ký đồ mẫu cao ethanol chiết từ củ Nam tinh pierre bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS)

Bảng 3.1: Mass-to-charge ratio (*m/z*) của các hợp chất hóa học trong cao cồn chiết xuất từ củ Nam tinh pierre phân tích bằng phương pháp LC-MS

Thời gian lưu (phút)	Peak <i>m/z</i> [M+H] ⁺	Dự đoán peak <i>m/z</i> [M+H] ⁺	Công thức phân tử	Hợp chất tìm thấy trong Chi <i>Arisaema</i>	Tài liệu tham khảo
6,9	331.2883	332.2979	C ₂₂ H ₃₇ NO	(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>S</i> *)- <i>N</i> ,2-dimethyl-3-hydroxy-5(10-phenyldecyl)pyrrolidine	[23]
4.8	205.0603	206.0598	C ₁₅ H ₂₄	Germacrene D	[6, 48]

10.7	401.3586	402.3748	C ₂₈ H ₄₈ O	Campesterol	[5,49]
22.2	271.2533	272.2605	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Emodin	[23,50]
17.8	343.1491	344.1564	C ₁₆ H ₂₂ O ₈	Coniferin	[23,51]
11.6	356.2742	357.2785	C ₁₇ H ₂₄ O ₈	Methylconiferin	[23,52]
8.4	449.3479	450.3583	C ₂₈ H ₃₄ O ₈	6-Deacetylnimbin	[22]
19.7	452.3056	453.3153	C ₂₇ H ₃₂ O ₆	28-Deoxonimbolide	[22]
14.2	444.3051	445.2858	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₄	Aurantiamide acetate (N-benzoyl-1-phenylalanyl-1-phenylalaninol acetate)	[19]
8.7	287.3025	288.3116	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Luteolin	[23,53]
10.7	400.3642	401.3715	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	Colchicine	[23,54]

3.2. Vô trùng mẫu cấy Nam tinh pierre

Các bộ phận như cuống lá, lá, củ cây Nam tinh pierre được vô trùng bằng NaClO 5% với thời gian khác nhau. Kết quả vô trùng mẫu cấy được thể hiện ở bảng 3.2. Sau 1 tuần, các mẫu cuống lá và lá đều bị nhiễm vi sinh vật 100% ở tất cả các mức thời gian khử trùng. Với mẫu củ, khi tăng thời gian vô trùng mẫu từ 10 lên 30 phút thì mẫu củ có tỷ lệ nhiễm vi sinh vật giảm đáng kể, từ 100% xuống 20%. Như vậy, thời gian vô trùng đối với mẫu củ Nam tinh pierre bằng NaClO 5% khoảng 30 phút là phù hợp. Nhiều tác nhân vô trùng được sử dụng như thủy ngân clorua, hypochloride của Na⁺, K⁺ và aldehyde v.v. Trong số đó, NaClO được chứng minh không chỉ có khả năng khử trùng hiệu quả mà còn an toàn và kinh tế [18]. Naqvi và cộng sự (2002) [19] cũng sử dụng NaClO 5% để vô trùng mẫu hạt ngô và kết quả cho thấy thời gian vô trùng mẫu 30 phút tốt hơn, với tỷ lệ mẫu nhiễm 14%.

Bảng 3.2: Ảnh hưởng của thời gian vô trùng mẫu bằng NaClO 5% đến tỷ lệ mẫu củ vô trùng cây Nam tinh pierre sau một tuần nuôi cấy

Thời gian vô trùng (phút)	Số mẫu/bình	Số bình khảo sát	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)
10	1	5	100 ^a	0 ^a
20	1	5	80 ^b	20 ^b
30	1	5	20 ^c	80 ^c

Các ký tự (a, b, c) trong cùng cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

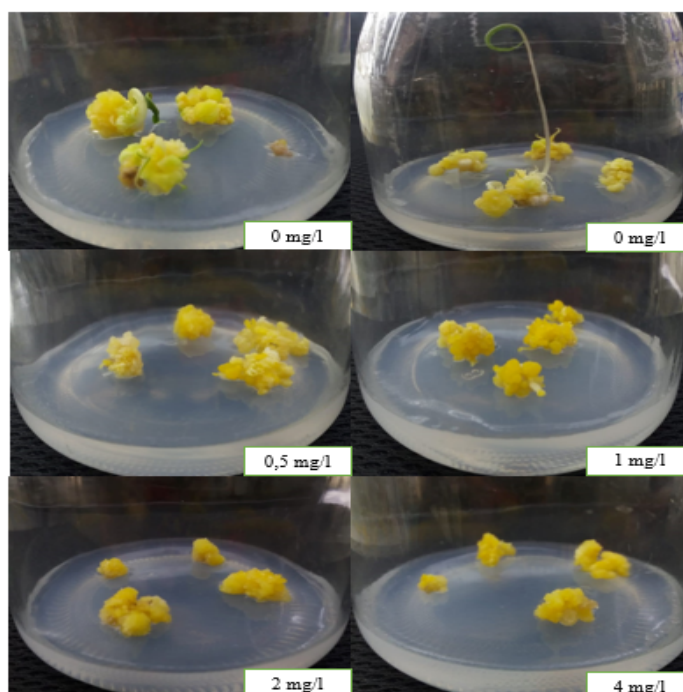
3.3. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến sinh trưởng mô sẹo *in vitro* Nam tinh pierre

Sau 10 tuần nuôi cấy mẫu Nam tinh pierre, tất cả mẫu cấy đều cho mô sẹo xốp. Trong đó, mẫu nuôi ở môi trường không bổ sung 2,4-D cho mô sẹo màu vàng xanh, xuất hiện chồi và rễ; ở nồng độ 0,5 và 1 mg/L 2,4-D cho mô sẹo màu vàng trắng, xuất hiện rễ; ở nồng độ 2 và 4 mg/L 2,4-D cho mô sẹo màu vàng (Bảng 3.3 và Hình 3.3). Về khối lượng mô sẹo bình quân mỗi mẫu cấy ở nồng độ 2,4-D 2 mg/L hay 4 mg/L khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Do đó, nồng độ 2,4-D 2 mg/L thích hợp cho sinh trưởng mô sẹo mẫu cấy Nam tinh pierre. Hợp chất 2,4-D là loại auxin tổng hợp và được sử dụng phổ biến nhất trong nuôi cấy mô, với tác dụng cảm ứng tạo mô sẹo [19, 20]. Kết quả nghiên cứu của Libin và cộng sự (2012) [21] về cảm ứng tạo sẹo ở hạt lúa Biris cho thấy ở nồng độ 2,4-D tối ưu là 2 mg/L, với 97% số hạt tạo sẹo.

Bảng 3.3: Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến sinh trưởng mô sẹo *in vitro* Nam tinh pierre sau 10 tuần nuôi cấy

Nồng độ 2,4 D (mg/L)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Hình thái mẫu cấy
0	$1,31 \pm 0,339^b$	$0,114 \pm 0,025^b$	Mô sẹo xốp, màu vàng xanh, xuất hiện chồi và rễ
0,5	$0,901 \pm 0,072^{ab}$	$0,061 \pm 0,004^a$	Mô sẹo xốp, có màu vàng trắng, xuất hiện rễ nhỏ
1	$0,796 \pm 0,184^{ab}$	$0,066 \pm 0,015^a$	Mô sẹo xốp, có màu vàng và trắng, xuất hiện rễ mập, có nhiều lông hút
2	$0,72 \pm 0,108^a$	$0,058 \pm 0,007^a$	Mô sẹo xốp, có màu vàng.
4	$0,529 \pm 0,086^a$	$0,043 \pm 0,006^a$	Mô sẹo xốp, có màu vàng.

Các ký tự (a, b) trong cùng cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

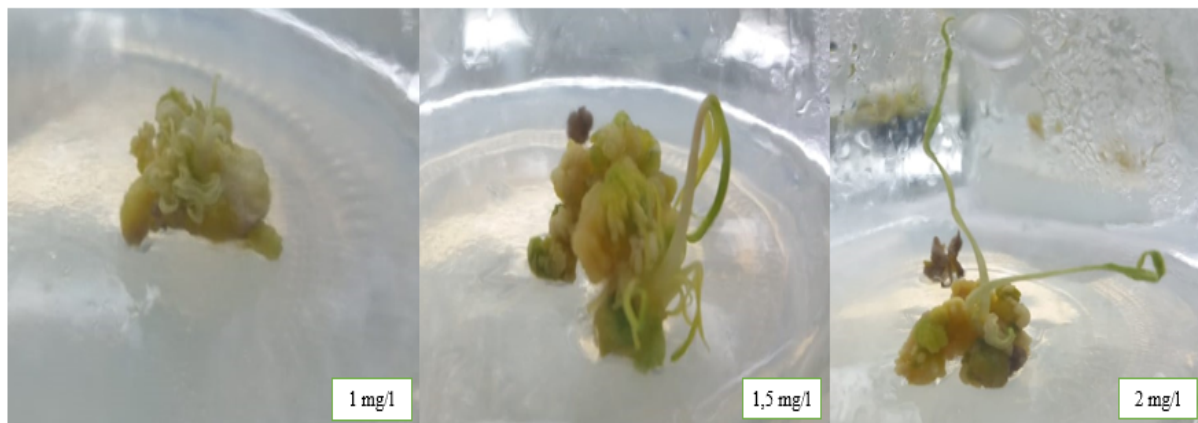


Hình 3.3: Mô sẹo *in vitro* Nam tinh pierre trên môi trường MS bổ sung 2,4-D ở các mức 0, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 mg/L

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến phát sinh chồi từ mô sẹo *in vitro* Nam tinh pierre

Dựa theo quan sát hình thái, sau 7 tuần nuôi cấy mô sẹo trên môi trường MS bổ sung BA, ở nồng độ 1,0 mg/L BA phát sinh cụm chồi nhỏ, màu trắng, ở nồng độ 1,5 mg/L BA phát sinh cụm chồi, chồi mập, lá xanh, cuống lá dài, còn ở nồng độ 2 mg/L BA phát sinh chồi đơn, chồi dài, lá xanh nhưng bị xoắn và cuống lá nhỏ hơn rất nhiều so với ở nồng độ 1,5 mg/L BA (Hình 3.4). Đối với cây Nam tinh pierre ở nồng độ 2 mg/L BA có biểu hiện ức chế sự hình thành chồi mới. Như vậy, 1,5 mg/L BA thích hợp để phát sinh chồi từ mô sẹo *in vitro* Nam tinh pierre. Giữa các chất điều hòa sinh trưởng thì BA là cytokine thường được sử dụng nhất để biệt hóa và tái sinh cây *in vitro* [22, 23, 24]. Nó đóng vai trò quan trọng trong nhân chồi. Khi nồng độ BA tăng thì khả năng tạo chồi và nhân nhanh chồi gia tăng nhưng nếu nồng độ BA cao cũng hạn chế sự hình thành và nhân chồi [25]. Kết quả nghiên cứu của Chukwujeku và cộng sự (2002) [26] về nhân giống *in vitro* loài

có nguy cơ tuyệt chủng cao *Aloe polyphylla* cũng cho thấy môi trường MS bổ sung BA 1,5 mg/L cho số chồi phát sinh nhiều nhất.



Hình 3.4: Phát sinh chồi từ mô sẹo *in vitro* Nam tinh pierre sau 7 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA: 1,0 mg/L phát sinh cụm chồi, chồi nhỏ, màu trắng; 1,5 mg/L phát sinh cụm chồi, chồi mập, lá xanh, cuống lá dài; 2,0 mg/L phát sinh chồi đơn, chồi dài, lá xanh, cuống lá rất nhỏ.

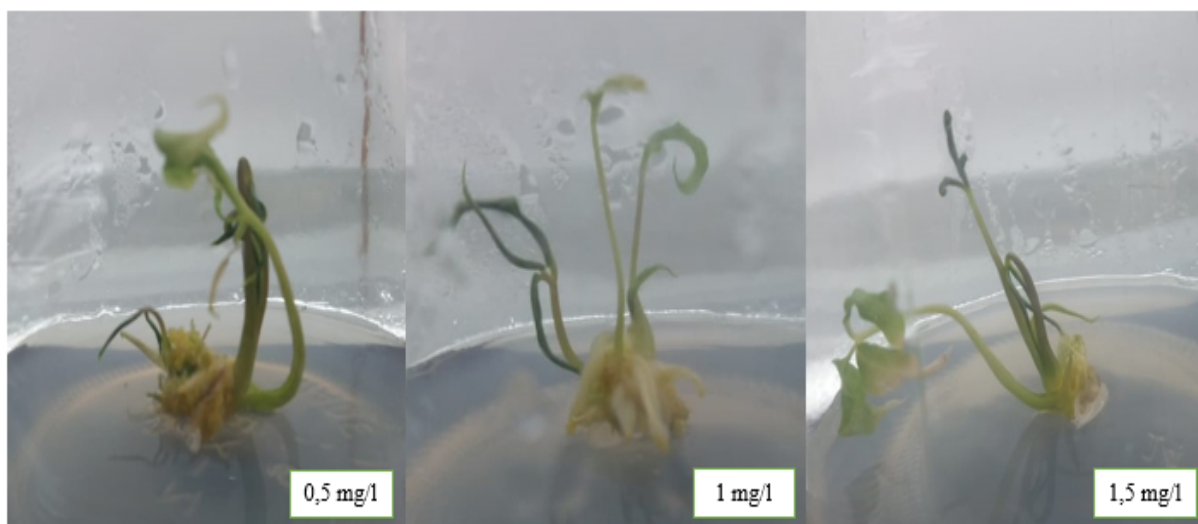
3.5. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến sự phát sinh rễ từ chồi *in vitro* Nam tinh pierre

Mẫu chồi *in vitro* Nam tinh pierre có chiều cao từ 2 – 3 cm được cấy vào môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA (0,5; 1; 1,5 mg/L) và 0,2 mg/L BA. Sau 7 tuần nuôi cấy, số rễ phát sinh từ chồi ở nồng độ 1 mg/L NAA cao nhất, bình quân 10,8 rễ/chồi, cao hơn đáng kể so với ở nồng độ 0,5 mg/L NAA (5,3 rễ/chồi) (Bảng 3.5). Hình thái rễ có sự khác nhau ở các nồng độ NAA khảo sát: ở nồng độ 0,5 mg/L cho rễ nhỏ, rễ ngắn, sùi mô sẹo ở gốc; ở nồng độ 1 mg/L NAA cho rễ mập, rễ nhiều lông hút; còn ở nồng độ 1,5 mg/L NAA cho rễ rất ngắn và không có lông hút (Hình 3.5). Do đó, nồng độ 1 mg/L NAA thích hợp hơn để phát sinh rễ từ chồi *in vitro* Nam tinh pierre. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thảo và cộng sự (2016) [27] cũng cho thấy nồng độ NAA 1 mg/L là thích hợp nhất cho phát sinh rễ bất định *in vitro* ở cây ba kích (*Morinda officinalis* How). Naz và cộng sự (2012) [28] khuyến cáo môi trường MS bổ sung NAA 1 mg/L cho tỷ lệ chồi *in vitro* phát sinh rễ cao nhất ở cây hoa huệ trắng *in vitro* (*Polianthes tuberosa*). Tương tự, kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* trên cây bách bộ (*Stemona curtisii*) của Palee và cộng sự (2012) [29] cho thấy môi trường MS rắn bổ sung NAA 1 mg/L cho số rễ bình quân trên chồi đạt cao nhất.

Bảng 3.5: Số rễ phát sinh từ chồi *in vitro* Nam tinh pierre (*Arisaema pierreanum* Engl.) sau 7 tuần nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA và BA

Nồng độ NAA (mg/L)	Nồng độ BA (mg/L)	Số rễ/mẫu	Hình thái rễ
0,5	0,2	$5,3 \pm 0,66^a$	Rễ mỏng, ngắn, sùi mô sẹo ở gốc
1	0,2	$10,8 \pm 2,39^b$	Rễ mập, nhiều lông hút
1,5	0,2	$8,0 \pm 0,62^{ab}$	Rễ rất ngắn, không có lông hút

Các chữ cái (a, b) trong cùng cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê $\alpha=0,05$.



Hình 3.5: Phát sinh rễ từ chồi *in vitro* cây Nam tinh pierre (*Arisaema pierreanum* Engl.) sau 4 tuần nuôi cấy ở môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L, 1,0 mg/L và 1,5 mg/L kết hợp với BA 0,2 mg/L.

4. KẾT LUẬN

Cây Nam tinh pierre (*A. pierreanum* Engl.) là loài hiếm mới chỉ được phát hiện núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh. Thành phần hóa học trong cao cồn được phân tích có 176 hợp chất và nhận dạng được 11 hợp chất có khối lượng phân tử tương ứng với các hợp chất đã được tìm thấy trong chi Nam tinh (*Arisaema*): (2*R**,3*S**,5*S**)-*N*,2-dimethyl-3-hydroxy-5(10-phenyldecyl)pyrrolidine; germacrene D; campesterol; emodin; coniferin; methylconiferin; 6-Deacetylnimbin; 28-Deoxonimbolide; aurantiamide acetate (N-benzoyl-1-phenylalanyl-1-phenylalaninol acetate); luteolin; colchicine.

Lần đầu tiên nhân giống thành công *in vitro* cây Nam tinh pierre (*A. pierreanum* Engl.). Thời gian vô trùng mẫu củ bằng NaClO 5% thích hợp là 30 phút. Nồng độ 2,4-D 2 mg/L thích hợp cho sinh trưởng mô sẹo. Nồng độ BA 1,5 mg/L thích hợp cho cảm ứng phát sinh chồi từ mô sẹo. Bổ sung NAA 1,0 mg/L với BA 0,2 mg/L là thích hợp để tái sinh cây hoàn chỉnh từ chồi *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V. H.Thiện, “*Xây dựng cây phả hệ cho họ Ráy (Araceae) ở khu vực phía nam Việt Nam dựa trên hình thái và marker phân tử*”, Luận án tiến sĩ, Học Viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Thành phố Hồ Chí Minh, 2017.
- [2] Feng L.X., Sun P., Mi T., Liu M., Liu W., Yao W., Cao Y.M., Yu X.L., Wu W.Y., Jiang B.H., Yang M., Guo D.A., & Liu X., “Agglutinin isolated from *Arisema heterophyllum* Blume induces apoptosis and autophagy in A549 cells through inhibiting PI3K/Akt pathway and inducing ER stress”. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(11), 856-864, 2016. DOI: 10.1016/S1875-5364(16)30102-9.
- [3] Azam S., Saqib M.S., Zar F., Admad B., Khan Ib., Zeb Z., & Khan Im. “Antibacterial, antifungal, phytotoxic, antioxidant and hemagglutination activities of organic fractions of *Arisaema tortuosum*”. *Pakistan Journal of Pharmaceuticaul Sciences*, 29(3), 991-997, 2016.
- [4] Kant K., Lal U.R., & Ghosh M, “In silico Prediction and Wet Lab Validation of *Arisaema tortuosum* (Wall.) Schott Extracts as Antioxidant and Anti-breast Cancer Source: A Comparative Study”. *Pharmacognosy Magazine*, 13(4), 786-790, 2017. DOI: 10.4103/pm.pm_69_17.
- [5] Jia M., He Q., Wang W., Dai J., & Zhu L, “Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus*”. *Veterinary Parasitology*, 261, 59-66, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.08.006>.
- [6] Kant K., Lal. U.R., & Ghosh M, “Computational Breakthrough of Natural Lead Hits from the Genus of *Arisaema* against Human Respiratory Syncytial Virus”. *Pharmacognosy Magazine*, 13(4) 780-785, 2018. DOI: 10.4103/pm.pm_459_16.
- [7] Sudan R., Bhagat M., Gupta S., Singh J., & Koul A, “Iron (FeII) chelation, ferric reducing antioxidant power, and immune modulating potential of *Arisaema jacquemontii* (Himalayan Cobra Lily)” *Biomed Research Intenational*, 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/179865.

- [8] Iqbal M., Bakht J., & Shafi M., “Phytochemical screening and antibacterial activity of different solvent extracted samples of *Arisaema jacquemontii*”. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(1), 75-81, 2018.
- [9] Nguyen V.D., Tran V.T., & Nguyen T.A.D., “Rediscovery of *Arisaema pierreanum* Engl. after 145 Years, and its Current Status”. *Aroideana*, 37E, 88-93, 2014.
- [10] Van H.T., Nguyen P.N., & Luu H.T., “On the taxonomic identity of *Arisaema pierreanum* Engl. (*Araceae*) in Vietnam”, *Science & Technology Development*, 19(3), 52-56, 2016. DOI: <https://doi.org/10.32508/stdj.v19i3.476>.
- [11] Murashige T. & Skoog F., “A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures” *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- [12] V.Q. Nam, B.V. Thắng và N.T. Thợ, “Nhân giống cây xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.) bằng phương pháp nuôi cấy mô”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, Số 2, tr. 11-16, 2013.
- [13] Du H.X., Xiao W.H., Zhou X., Zhang Y., Liu D., & Yuan Y.J., “Engineering *Yarrowia lipolytica* for Campesterol Overproduction”. *Plos One*, 11(1), e0146773, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146773>.
- [14] Guo S., Feng B., Zhu R., Ma J., & Wang W., “Preparative Isolation of Three Anthraquinones from *Rumex japonicus* by High – Speed Counter Chromatography”. *Molecules (Basel Switzerland)*, 16(2), 1201-1210, 2011. DOI: 10.3390/molecules16021201.
- [15] Yang Y., Zhang L.H., Yang B.X., Tian J.K., & Zhang L., “Aurantiamide acetate suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo by inhibiting autophagic flux”. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(5), 1055-1064, 2015. DOI: 10.1111/jcmm.12498.
- [16] Lin Y., Shi R., Wang X., & Shen H.M., “Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy”. *Current Cancer Drug Targets*, 8(7), 634-646, 2008. DOI: 10.2174/156800908786241050.
- [17] Slobodnick A., Shah B., Krasnokutsky S., & Pillinger M., “Update on colchicine, 2017”. *Rheumatology (Oxford, England)*, 57(1), 4-11, 2018. DOI: 10.1093/rheumatology/kex453.
- [18] Russell, A.D., Hugo W.B., & G.A.J. Ayliffe, *Principles and practice of disinfection, Preservation and Sterilization*, 2nd ed. Black Well Scientific publications, Oxford, 1992.
- [19] Naqvi, S.M.S., Yasmin T., Rashid H., Chaudary Z., & Quarashi A. “Callus induction from seeds of *Zea mays* var. EV-2097”. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(9), 956-958, 2002. DOI: 10.3923/pjbs.2002.956.958.
- [20] Bregitzer P., Somers D.A., & Rines H.W., “Development and characterization of friable, embryogenic oat callus”. *Cell Biology & Molecular Genetics*, 29(3), 798-803, 1989. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900030052x>.
- [21] Libin, A., King P.J.H., Ong K.H., Chubo J.K., & Sipe P., “Callus induction and plant regeneration of Sarawak rice (*Oryza sativa* L.) variety Biris”. *African Journal of Agricultural Research*, 7(30), 4260-4265, 2012. DOI: 10.5897/AJAR12. 587.
- [22] Giatti L., Pace G., & Lima P., “BAP (6-benzylaminopurine) in the regeneration *in vitro* of Blc Owen Holmes Ponkan x *Brassavola digbiana* n degrees 2”. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(5), 1279-1285, 2007. DOI:10.1590/S1413-70542007000500001.
- [23] George E.F., Hall M.A., & Klerk G.J., “Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists”. In book: *Plant Propagation by Tissue Culture*, 205-226, 2007. DOI:10.1007/978-1-4020-5005-3_6.
- [24] Phillips G.C & Garda M, “Plant tissue culture media and practices: an overview”. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55, 242-257, 2019.
- [25] N.T.Q. Cơ, T.V. Tiên, V.T.B. Mai, T.T. Tuấn và N.H. Sơn, “Quá trình phát sinh hình thái mô sẹo và chồi của cây long não (*Cinnamomum camphora* (L.) Sieb.) nuôi cấy in vitro”, *Tạp chí Khoa học và Phát Triển*, Tập12, Số 7, tr. 1034-1041, 2014.
- [26] Chukwujekwu J.C., Fennell C.W., & van Staden J., “Optimisation of the tissue culture protocol for the endangered *Aloe polyphylla*”. *South African Journal of Botany*, 68, 424-429, 2002.
- [27] N.T. Thảo, N.T.P. Thảo, N.T.T. Linh, N.T. Minh, N.Q. Chi và T.T.A. Đào, “Nghiên cứu cảm ứng và nuôi cấy rễ bất định cây ba kích (*Marinda officinalis* How)”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, Tập 14, Số 6, tr 921-930, 2016.
- [28] Naz S., Aslam F., Ilyas S., Shahzadi K., & Tariq A., “*In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa*)”. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(24), 4107-4112, 2012. DOI: 10.5897/JMPR12.647.
- [29] Palee J., Dheeranupattana S., Jatisatienr A., & Wangkarn S. (2013). “Effects of BA and NAA on micropropagation and *Stemona* alkaloids production of *Stemona curtisii* Hook.f.”. *Chiang Mai journal of Science*, 40(3), 356-363, 2013.

CHEMICAL COMPOSITION AND IN VITRO PROPAGATION OF NAM TINH PIERRE

DAO QUOC HUNG, PHAM THI NHAT TUYEN, NGUYEN THI NGAN

Institute for Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City
daoquochung2022@gmail.com

Abstract: Nam tinh pierre (*A. pierreanum* Engl.) belongs to genus *Arisaema*, is a rare species. It has just only discovered in Ba Den mountain, Tay Ninh province. Many species in this genus were investigated about chemical composition and biological activities, with medicinal properties. Up to present, studies on Nam tinh pierre were only about classification. This current study aimed to implement chemical composition analysis and *in vitro* propagation of the species.

Chemical composition in tuber of Nam tinh pierre was determined by alcohol extraction method, and then analyzed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The result of analysis showed 176 compounds and identified 11 compounds that have molecular weight similar to the compounds founded in genus *Arisaema*, including (2*R**,3*S**,5*S**)-*N*,2-dimethyl-3-hydroxy-5-(10-phenyldecyl)pyrrolidine; germacrene D; campesterol; emodin; coniferin; methylconiferin; 6-deacetylnimbin; 28-deoxonimbolide; aurantiamide acetate (N-benzoyl-1-phenylalanyl-1-phenylalaninol acetate); luteolin; colchicine.

This is the first time *in vitro* propagation of Nam tinh pierre has been successful. Suitable time of sterilization of the fresh tuber using NaClO 5% was about 30 minutes. MS medium supplemented 2 mg/L 2,4-D was suitable for callus proliferation. MS medium supplemented with 1,5 mg/L BA was suitable for shoot formation from the callus. The ½ MS medium supplemented with 1,5 mg/L NAA and 0,2 mg/L BA was suitable for root formation from the *in vitro* shoot.

Key words: Nam tinh pierre, *Arisaema pierreanum* Engl., *in vitro* propagation, chemical composition

Ngày gửi bài: 06/02/2023

Ngày chấp nhận đăng: 15/03/2023