

Khảo sát hoạt tính sinh học của chất biến dưỡng từ hệ endophyte cây thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc., *Taxaceae*)

Lê Quang Hạnh Thu¹, Võ Thị Bạch Huệ², Nguyễn Đình Nga²

¹Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Khoa Dược, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh

lequanghanhthu@gmail.com

Tóm tắt

Nghiên cứu nhằm mục đích phân lập, định danh và khảo sát hoạt tính sinh học của hệ endophyte từ các bộ phận của cây Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc., *Taxaceae*) thu hoạch từ tỉnh Lâm Đồng. Pestalotiopsis là hệ endophyte trội được ly trích từ cây Thông đỏ lá dài cho hoạt tính kháng nấm *Candida* và tác động chống oxy hóa tốt. Bên cạnh đó, các chi nấm gồm *Fusarium*, *Acremonium*, *Nigrospora* và *Aspergillus* cũng thể hiện hoạt tính sinh học tốt.

Nhận 12.12.2017

Được duyệt 26.01.2018

Công bố 01.02.2018

Từ khóa

Taxus wallichiana, endophyte, *Pestalotiopsis*, kháng khuẩn, hoạt tính sinh học

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1. Đặt vấn đề

Endophyte là vi sinh vật nội sinh sống trong mô cây thực vật khỏe mạnh có ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của cây và sản xuất các chất biến dưỡng có tính kháng khuẩn, kháng nấm... Các nghiên cứu về endophyte các cây chi *Taxus* cho thấy hệ vi sinh vật nội sinh có khả năng sản xuất các chất biến dưỡng có hoạt tính sinh học tốt, đặc biệt là paclitaxel. Do đó, việc khảo sát mối liên quan giữa endophyte và các chất biến dưỡng từ hệ endophyte cây Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc., *Taxaceae*) ở Việt Nam là hướng phát triển mới trong công cuộc tìm kiếm thuốc điều trị ung thư trong tương lai.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Hệ endophyte được phân lập từ các bộ phận (cành, vỏ thân, rễ, lá) của cây Thông đỏ lá dài *Taxus wallichiana* Zucc., *Taxaceae* ở các độ tuổi 6, 7, và 8 tuổi được thu hái tại Trung tâm nghiên cứu, trồng và chế biến cây thuốc Đà Lạt.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập và định danh endophyte

Được liệu được thu hái theo nhóm tuổi: 6, 7 và 8 tuổi. Chọn cây khỏe mạnh, không còi cọc, không có biểu hiện sâu bệnh. Mẫu sau khi thu hái được rửa sạch dưới vòi nước chảy để loại bỏ đất và tạp bản, để nơi khô ráo sau đó xử lý

ngay hoặc được bảo quản trong túi nilon sạch ở 4⁰C không quá 48h trước khi xử lý.

Quá trình xử lý mẫu được tiến hành trong môi trường vô trùng của tủ cấy. Mẫu được liệu được cắt thô và rửa bằng dung dịch sát trùng lần lượt gồm nước javel 5%, ethanol 70% và nước cất vô trùng với thời gian phù hợp. Sau khi hong khô, sử dụng dụng cụ vô trùng cắt mẫu thành những mảnh nhỏ để thực hiện nuôi cấy endophyte trên môi trường thạch nước. Cây nước rửa cuối cùng lên môi trường SDA, TSA để kiểm tra kết quả vô trùng mẫu.

Các đĩa thạch nước đã đặt các mẫu cây được ủ ở nhiệt độ phòng và theo dõi sự phát triển của endophyte từ mẫu cây trong 3 – 7 ngày. Thời gian theo dõi có thể lâu hơn tùy nếu tốc độ sinh trưởng của endophyte chậm. Thu sợi khuẩn ty mọc xuất phát từ mô cây và cấy chuyển endophyte sang môi trường chứa các chất dinh dưỡng thích hợp như môi trường thạch khoai tây đường (PDA), thạch Czapeck-Dox, thạch Sabouraud (SDA)... Thực hiện cấy chuyển nhiều lần để tinh sạch chủng.

Tên khoa học của endophyte thực vật sẽ được xác định đến chi. Quá trình định danh được thực hiện với các bộ lọc cơ bản gồm nuôi cấy khóm nấm, quan sát khóm nấm, quan sát đặc điểm hiển vi, định danh dựa vào Atlas nấm sợi [4] và khóa phân loại Actinomyces của Bergey's [6].

2.2.2 Khảo sát hoạt tính sinh học

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm theo phương pháp đục lỗ và phương pháp thời thạch [1,2,3,5]. Sinh vật

thử nghiệm gồm *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Streptococcus faecalis* (Sf), *Staphylococcus aureus* (Sa) và MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*. Trước thử nghiệm, vi sinh vật thử nghiệm và endophyte cần được hoạt hóa và nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng trong thời gian phù hợp.

- Vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường TSA trong 24h, sau đó tăng sinh trong canh lỏng TSB trong vòng 4h;

- Vi nấm *Candida* hoạt hóa trên môi trường SDA trong 48h;

- Endophyte được hoạt hóa và nuôi cấy trên môi trường PDA và Czapek-dox trong thời gian phù hợp.

Pha huyền trực vi sinh vật thử nghiệm đạt mật độ tế bào 108 CFU/ml (so độ đục với ống Mc Farland 0,5). Sau khi trải đều vi sinh vật thử nghiệm lên mặt thạch, cắt khoanh thạch PDA chứa endophyte (đường kính 6 mm) và đặt lên mặt môi trường thử nghiệm hoặc tạo giếng, nhỏ 50 µl dịch nuôi Czapek-dox vào giếng. Tiến hành đọc kết quả sau 24h đối với vi khuẩn và sau 48h đối với vi nấm *Candida*.

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp đánh bắt gốc tự do DPPH (1,1 – diphenyl – 2 – picrylhydrazyl hydrat) [1,2,3,5]. Các chất có hoạt tính chống oxy hóa theo cơ chế dập tắt gốc tự do sẽ làm 2,2 – diphenyl – 2 – picrylhydrazyl hydrat (DPPH) có màu tím đậm bị khử thành sản phẩm có màu vàng nhạt. Dùng micropipet chuyển lên bản mỏng silica gel F254 4 µl dịch nuôi endophyte môi trường Czapek-dox và hong khô ở nhiệt độ phòng. Phun thuốc thử DPPH và quan sát màu vàng trên nền tím.

3. Kết quả thực nghiệm

3.1 Phân lập

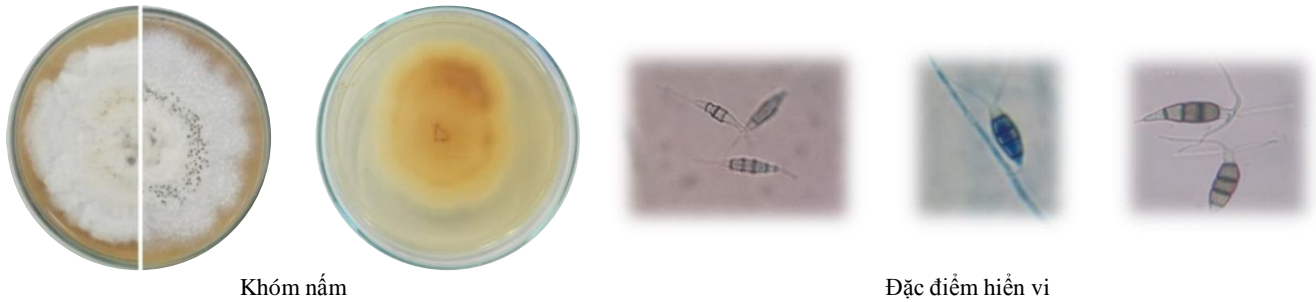
Từ mẫu mô cành, thân, lá và rễ cây Thông đỏ lá dài phân lập được 86 chủng endophyte từ mô cây Thông đỏ lá dài gồm 51 chủng được định danh đến tên chi gồm *Pestalotiopsis* (27 chủng), *Fusarium* (6 chủng), *Colletotrichum* (3 chủng), *Mucor* (3 chủng), *Nigrospora* (2 chủng), *Acremonium* (1 chủng), *Scytlidium* (1 chủng), *Cylindrocarpon* (1 chủng), *Staphylotrichum* (1 chủng) và *Actinomyces* (6 chủng); 2 chủng được định danh đến tên loài gồm *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* và 33 chủng không đủ cơ sở định danh [4,6].

Bảng 1. Sự phân bố endophyte trên các bộ phận của *T.wallichiana* thuộc 3 nhóm tuổi

Bộ phận	Cây 6 tuổi	Cây 7 tuổi	Cây 8 tuổi	Tổng
Cành	<i>Pestalotiopsis</i> (4)	<i>Pestalotiopsis</i> (4)	<i>Pestalotiopsis</i> (7)	15
	<i>Fusarium</i> (1)	-	-	01
	<i>Colletotrichum</i> (2)	-	-	02
	<i>Aspergillus niger</i> (1)	-	-	01
	<i>Aspergillus terreus</i> (1)	-	-	01
-	-	<i>Actinomyces</i> (2)	02	
-	Chưa định danh (1)	Chưa định danh (8)	Chưa định danh (3)	12
Thân	<i>Pestalotiopsis</i> (3)	<i>Pestalotiopsis</i> (5)	<i>Pestalotiopsis</i> (2)	10
	<i>Nigrospora</i> (1)	-	-	01
	<i>Staphylotrichum</i> (1)	-	-	01
	-	<i>Actinomyces</i> (1)	<i>Actinomyces</i> (1)	02
-	Chưa định danh (2)	Chưa định danh (4)	Chưa định danh (1)	07
Rễ	<i>Pestalotiopsis</i> (1)	-	<i>Pestalotiopsis</i> (1)	02
	<i>Fusarium</i> (2)	<i>Fusarium</i> (3)	-	05
	<i>Acremonium</i> (1)	-	-	01
	-	<i>Nigrospora</i> (1)	-	01
	-	-	<i>Mucor</i> (3)	03
	-	-	<i>Actinomyces</i> (1)	01
-	-	<i>Scytlidium</i> (1)	01	
-	Chưa định danh (2)	Chưa định danh (1)	Chưa định danh (3)	06
Lá	<i>Colletotrichum</i> (1)	-	-	01
	<i>Actinomyces</i> (1)	-	<i>Cylindrocarpon</i> (1)	01
	Chưa định danh (1)	Chưa định danh (2)	Chưa định danh (5)	08
Tổng	26	29	31	86

Pestalotiopsis là hệ endophyte chính của cây Thông đỏ lá dài. Từ các mẫu được liệu, phân lập được 27 chủng *Pestalotiopsis*. Endophyte này xuất hiện ở các bộ phận trên các cây có độ tuổi khác nhau. *Pestalotiopsis* tập trung chủ yếu ở cành và vỏ thân, xuất hiện ít ở rễ và không có ở lá (15 chủng từ cành, 10 chủng từ vỏ thân, 2 chủng từ rễ). Sự phân bố *Pestalotiopsis* giữa các cây với các độ tuổi khác nhau tương đối đồng đều (Cây 6 tuổi: 8/29, cây 7 tuổi: 9/29, cây 8 tuổi: 10/34).

Trên môi trường PDA, tốc độ tru7ờng thành của *Pestalotiopsis* chậm nên thời gian quan sát trung bình từ 15 – 21 ngày. Khóm nấm có dạng sợi bông rộp, màu trắng, có thể xuất hiện giọt tiết màu vàng hoặc vàng nâu nằm rải rác trên mặt khóm. Mặt trái có màu vàng nhạt, có các vòng vàng nâu đồng tâm. Sau 15 ngày, xuất hiện các hạt màu nâu đen hoặc đen rải rác trên mặt khóm, xuất phát từ trung tâm và lan dần ra rìa khóm. Sợi nấm gồm sợi nhỏ, không màu, xuất hiện sớm và sợi lớn, có màu, xuất hiện muộn. Sợi nấm non không màu, mảnh, dễ nhầm lẫn với chi *Actinomyces*. Sau 15 ngày, xuất hiện sợi tơ nấm trưởng thành có màu cuộn xoắn tạo “tổ” và xuất hiện bào tử dày đặc nằm trong đám sợi. Bào tử dạng hình thoi, hai đầu nhọn, vách trơn, có vách ngăn, gồm 4 – 5 tế bào, các tế bào giữa có màu nâu đen hoặc đen. Kích thước bào tử 12,5 – 17,5 µm x 5 – 6 µm. Đầu bào tử có mang bộ phận phụ dạng sợi mảnh. Tùy đặc điểm bộ phận phụ, *pestalotiopsis* được phân thành hai nhóm: Nhóm 1- bộ phận phụ không phân nhánh; nhóm 2- bộ phận phụ phân 2 – 4 nhánh (chủ yếu là 2 nhánh).



Hình 1. Đặc điểm của *Pestalotiopsis*

3.2 Hoạt tính sinh học của endophyte

7/86 chủng cho hoạt tính kháng khuẩn gồm *Acremonium*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium* và *Pestalotiopsis* trên *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Streptococcus faecalis* (Sf), *Staphylococcus aureus* (Sa) và MRSA.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm kháng khuẩn

TT	Môi trường	Chủng nấm	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)				
			Ec	Sf	Pa	Sa	MRSA
1	PDA	<i>Aspergillus terreus</i> C62-1(1)	14	19	9	11	11
	Cza		16	18	-	18	14
2	PDA	<i>Fusarium</i> R63-1	-	-	-	-	9
	Cza		-	-	-	-	-
3	PDA	<i>Fusarium</i> R63-2	11	-	-	-	-
	Cza		-	-	-	-	-
4	PDA	<i>Fusarium</i> R73-2	11	-	-	-	-
	Cza		18	-	-	-	-
5	PDA	<i>Fusarium</i> C62-3	-	-	-	-	10
	Cza		-	-	-	-	-
6	PDA	<i>Pestalotiopsis</i> C72-3(2)	-	10	-	-	-
	Cza		-	-	-	-	-
7	PDA	<i>Acremonium</i> R61-1	19	-	-	20	-
	Cza		-	-	-	-	-

12/86 chủng cho hoạt tính kháng *Candida* gồm *Pestalotiopsis*, *Fusarium* và *Nigrospora*.

Đáng chú ý là phổ kháng khuẩn rộng và mạnh trên cả 5 chủng vi khuẩn thử nghiệm của *A.terreus*, hoạt tính kháng khuẩn tốt của *Acremonium* và *Fusarium*, khả năng kháng *C.albicans* và chủng *Candida* kháng thuốc của *Pestalotiopsis*.

59/86 chủng hoạt tính chống oxy hóa thuộc các chi *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Actinomyces*, *Colletotrichum*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Aspergillus niger*, *Staphylotrichum*, *Cylindrocarpon*, *Scytlalidium* và một số chủng chưa đủ điều kiện định danh. Nổi bật là *Cylindrocarpon*, *Actinomyces* C82-2 và các chủng chưa được định danh (R83-2, C71-3 và C72-4).

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm kháng nấm

TT	Chủng nấm	Mẫu	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)		
			<i>C.albicans</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.tropicalis</i>
1	<i>Pestalotiopsis</i>	C62-1	21	-	-
2		C71-2(1)	20	14	11
3		C72-2	15	15	17
4		V71-2	22	15	10
5		V72-2	18	10	11
6		C81-1	11	-	-
7		C81-3	18	-	-
8		C82-3	11	-	-
9		C83-1	16	12	14
10		R81-3	21	13	-
11	<i>Nigrospora</i>	V61-2	16	-	-
12	<i>Fusarium</i>	C62-3	12	-	-

16 chủng endophyte vừa cho hoạt tính kháng khuẩn hoặc kháng nấm vừa cho tác động chống oxy hóa thuộc các chi *Pestalotiopsis*, *Fusarium* và *Nigrospora*.

Như vậy, *Pestalotiopsis* là chi endophyte đặc trưng của cây Thông đỏ lá dài *Taxus wallichiana* Zucc., Taxaceae. Điều này phù hợp với các nghiên cứu về cây Thông đỏ lá dài của các tác giả trong và ngoài nước [2,3]. Tuy nhiên, do điều kiện thổ nhưỡng và khí hậu, hệ endophyte của cây Thông đỏ lá dài ở các vùng miền thể hiện sự khác biệt về chủng loài và hoạt tính sinh học. Đây là nghiên cứu tiền đề nhằm mở rộng tìm hiểu về nguồn lợi từ các đặc tính sinh học tốt của hệ endophyte Thông đỏ lá dài được thu hoạch từ Trung tâm nghiên cứu, trồng và chế biến cây thuốc Đà Lạt.

4. Kết luận và đề xuất

Pestalotiopsis là endophyte trội của Thông đỏ lá dài *Taxus wallichiana* Zucc., Taxaceae. Các chủng endophyte cho hoạt tính sinh học tốt như *Pestalotiopsis*, *Acremonium*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium*, *Nigrospora*... là nguồn cung cấp tiềm năng các hoạt chất cho hoạt tính sinh học tốt. Do đó, nhóm tác giả đề xuất tiếp tục định danh các chủng endophyte bằng phương pháp khác, khảo sát điều kiện nuôi cấy tối ưu các endophyte tiềm năng...

Tài liệu tham khảo

1. Baby Joseph and R.Mini Priya (2011). “Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review”, *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **1**(3), pp. 291 – 309.
2. GA. Strobel et al (1996). “Taxol from fungal endophyte and the issue of biodiversity”, *Journal of industrial microbiology* **17**, pp. 417 – 423.
3. GA. Strobel et al (1996). “Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*”, *Microbiology* **142**, pp.435 – 440.
4. G.S.de Hoog, J.Guarro, J.Gené and M.J.Figueras. *Atlas of clinical fungi*, 2nd edition, pp. 81 – 93, 314 – 322, 489, 509, 613 – 619, 681 – 705, 919 – 927, 930 – 935
5. J.Zhao et al (2010). “Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants”, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp.
6. John G.Holt, Noel R.Krieg, Peter H.A.Sneath, James T.Staley, Stanley T.Williams (1994). “*Bergey’s manual of determinative bacteriology 9th Edition*”, Lippincott William & Wilkins, pp. 625 - 704.

Biological activities of *Taxus wallichiana* Zucc., Taxaceae endophytes

Le Quang Hanh Thu¹, Vo Thi Bach Hue², Nguyen Dinh Nga²

¹Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

²Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

Abstract The purpose of this work to isolate endophytic fungus from different parts of *Taxus wallichiana* collected from Lam Dong province, Vietnam; identify to genus level; and then screen antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of metabolites from their cultures. *Pestalotiopsis* was the major part of *T.wallichiana* endophyte. They could produce metabolites that show high effect against *Candida* and have antioxidant activity. *Pestalotiopsis*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Nigrospora*, and *Aspergillus terreus* exhibited good biological activities

Keywords taxus wallichiana, endophyte, pestalotiopsis, antibacterial, biological activities