

Nghiên cứu hoạt tính sinh học và nhân sinh khối một số loài thực vật không mạch ở Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng

- Quách Ngô Diễm Phương
- Đỗ Ngọc Bảo Trân
- Trà Đông Phương
- Lương Thiện Tâm
- Trần Nguyễn Anh Thư
- Trần Linh Thuộc

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 01 tháng 06 năm 2016, nhận đăng ngày 10 tháng 04 năm 2017)

TÓM TẮT

Hiện nay, việc nghiên cứu về thực vật không mạch (đài thực vật) còn khá mới mẻ, chưa được quan tâm nhiều, đặc biệt là ở Việt Nam. Do đó, bài báo tập trung vào nuôi cấy và nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của vài loài đài thực vật ở Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà như hoạt tính kháng oxy hóa, hoạt tính ức chế acetylcholinesterase, hoạt tính kháng khuẩn và định tính sự hiện diện của các nhóm hợp chất thứ cấp chính của các loài thực vật này. Ngoài ra, một trong số các loài đài thực vật tiềm năng (rêu bạc) đã được nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* để có nguồn nguyên liệu chủ động. Chúng tôi đã thu hái, phân loại và định danh được 6 loài thực vật không mạch bao gồm 3 loài rêu (*Pyrrhobryum spiniforme*,

Bryum argenteum, *Campylopus umbellatus*) và 3 loài địa tiễn (*Lepidozia fauriana*, *Plagiochila trabeculata*, *Schistochila blumei*) từ Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà. Kết quả nghiên cứu hoạt tính của 6 loài thực vật không mạch này cho thấy cao chiết từ *L. fauriana* có khả năng kháng oxy hóa cao nhất cũng như ức chế acetylcholinesterase cao nhất ($IC_{50} = 6,617 \pm 0,080$ mg/mL), cao chiết từ *S. blumei* có tiềm năng kháng khuẩn. Kết quả nuôi cấy *in vitro* cho thấy chúng ta hoàn toàn có khả năng nhân sinh khối *in vitro* rêu bạc từ bào tử với môi trường tốt nhất cho sự phát triển là môi trường MS bổ sung 2,4-D 1 mg/L và kinetin 2 mg/L.

Từ khóa: acetylcholinesterase, đài thực vật, *in vitro*, kháng khuẩn, kháng oxy hóa, thực vật không mạch.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, thực vật không mạch (đài thực vật) được chia thành 3 ngành lớn: Địa tiễn (Rêu Tân)-Marchantiophyta, Giác Tiễn (Rêu Sừng)-Anthocerotophyta và Rêu-Bryophyta. Những loài thuộc nhóm thực vật này thường nhỏ, không có lignin, không có mạch, lá chỉ gồm một lớp tế bào. Do không có nhiều cơ chế bảo vệ cơ học như thực vật có

mạch, đài thực vật có thể chứa những thành phần hóa học đặc biệt để giúp chúng sinh tồn.

Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà chiếm vị trí phần lớn trên địa bàn hành chính huyện Lạc Dương và một phần huyện Đam Rông, tỉnh Lâm Đồng, có địa hình đồi núi với độ cao trên 1400 m. Khí hậu, độ ẩm, điều kiện tự nhiên nơi đây rất thích hợp cho sự phát triển

của đài thực vật nên khu vực này có sự phong phú, đa dạng về đài thực vật.

Trên thực tế, một số ít loài đài thực vật đã được sử dụng trong các bài thuốc dân gian ở một số nơi như Trung Quốc, Ấn Độ. Thêm vào đó, đài thực vật còn là nguồn cung cấp một số hợp chất có hoạt tính sinh học [2]. Vì sự phong phú trong ứng dụng mà hiện nay, ở một số nước trên thế giới, đài thực vật đang bắt đầu được quan tâm và nghiên cứu, chủ yếu là nuôi cấy *in vitro* các loài rêu đồng thời khảo sát hoạt tính sinh học của chúng. Tuy nhiên, tại Việt Nam, nhóm thực vật này vẫn chưa được chú ý nghiên cứu nhiều về mảng sinh hóa và vi nhân giống. Do đó, việc định danh, khảo sát hoạt tính sinh học như năng lực khử, hoạt tính kháng khuẩn, kháng acetylcholinesterase cũng như thăm dò khả năng nuôi cấy *in vitro* một số loài đài thực vật là cần thiết để mở đầu cho sự quan tâm đối với nhóm thực vật này ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các loài rêu *Pyrrhobryum spiniforme*, *Campylopus umbellatus*, *Bryum argenteum* và các loài địa tiền *Lepidozia fauriana*, *Plagiochila trabeculata*, *Schistochila blumei* được thu hái tại khu vực Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng với toàn bộ cây sử dụng cho các thí nghiệm sinh hóa, riêng túi bào tử Rêu Bạc (*Bryum argenteum*) sử dụng để tạo nguồn mẫu *in vitro*.

Mẫu rêu được phân loại dựa trên hệ thống phân loại của Goffinet và cộng sự [11], mẫu địa tiền được phân loại dựa trên hệ thống phân loại của Crandall-Stotler và cộng sự [8, 9].

Phương pháp khử trùng mẫu và nuôi cấy Rêu Bạc in vitro

Túi bào tử Rêu Bạc *Bryum argenteum* được tách khỏi thể giao tử và được rửa sơ với nước cất. Sau đó, trong tủ cấy, các túi bào tử được lắc nhẹ nhàng với javel (5% sodium hypochloride) ở các nồng độ khảo sát là 5 %, 15 %, 30 % trong 5 phút và rửa lại 3 lần

với nước hấp vô trùng. Tiếp theo, túi bào tử được gỡ nắp và đâm thủng rồi trải bào tử lên môi trường nuôi cấy để theo dõi phát sinh hình thái. Môi trường sử dụng trong thí nghiệm là môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung fructose 18 g/L (0,1 M), NAA (1-naphthalene acetic acid) 1 mg/L và BA (benzylaminopurine) 2 mg/L, 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 1 mg/L và kinetin 2 mg/L, IBA (indole-3-butyric acid) 0,203 mg/L (1 μ M) và BA 0,0225 mg/L (0,1 μ M).

Điều chế cao

Phương pháp điều chế cao được thực hiện theo kỹ thuật chiết ngâm dầm (Maceration) [20]. Mẫu sau khi thu hái được nhật tách khỏi những loài đài thực vật khác. Tiếp theo, các mẫu được rửa sạch bằng nước rồi phơi khô đến khối lượng không đổi rồi xay nhuyễn thành bột khô. Ngâm bột trong ethanol tuyệt đối. Giữ yên ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Sau đó, dung dịch được chiết lọc ngang qua giấy lọc, thu dịch lọc. Tiếp theo, rót dung môi mới vào bình bột mẫu và tiếp tục quá trình chiết thêm 2 lần nữa chiết kiệt mẫu. Phần dịch lọc được cô quay chân không đuổi dung môi để có được cao chiết.

Khảo sát năng lực khử

Năng lực khử của cao chiết các mẫu được thực hiện theo phương pháp Yen & Duh (1993). Cho 2,5 mL dung dịch đệm sodium phosphate 0,2 M pH 6,6 vào 1 mL cao chiết được pha loãng trong ethanol tuyệt đối thành nồng độ 5 mg/mL. Lắc đều rồi bổ sung 2,5 mL dung dịch potassium ferricyanide 1 %. Hỗn hợp phản ứng được ổn định ở nhiệt độ 50 °C trong thời gian 20 phút. Sau đó, thêm vào hỗn hợp phản ứng 2,5 mL trichloroacetic acid (TCA) 10 %. Lắc đều các hỗn hợp phản ứng, sau đó ly tâm 2000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ kết tủa, thu lấy dịch nổi. Hút 1 mL dịch nổi cho vào ống nghiệm khác, thêm 2 mL nước cất và 0,5 mL dung dịch FeCl₃ 10 %. Lắc đều hỗn hợp trên rồi để yên trong thời gian 5 phút. Sau cùng, dịch phản ứng được đo độ hấp thụ ở bước sóng 700 nm.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của các loại cao chiết được thực hiện trên 7 chủng vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Samonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholera*. Vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường LB (Luria-Bertani) lỏng và nuôi cấy dịch huyền phù vi khuẩn cho đến khi đạt OD₆₂₅ bằng 0,5 hoặc hơn, sau đó điều chỉnh dịch huyền phù vi khuẩn đến OD₆₂₅ bằng 0,5. 100 µL dịch khuẩn được trải đều trên mỗi đĩa petri. Sau đó, hút 50 µL dung dịch pha loãng các cao khác nhau ở nồng độ 10 mg/mL, kanamycin 0,6 mg/mL, ethanol tuyệt đối cho vào từng lỗ đã đục. Các đĩa này được ủ trong 24 giờ ở 37 °C, và chỉ tiêu theo dõi là đường kính vòng kháng khuẩn.

Khảo sát hoạt tính ức chế acetylcholinesterase

Hoạt tính ức chế acetylcholinesterase của các loại cao chiết được thực hiện dựa trên thí nghiệm của Ellman (1961). Thí nghiệm được tiến hành với đĩa microtiter 96 giếng, trong mỗi giếng có 25 µL dung dịch cao chiết (nồng độ 5 mg/mL) hòa tan trong đệm A (50 mM Tris HCl pH 8 trong nước khử ion) và DMSO (dimethyl sulfoxide) 10 %, 25 µL dung dịch cơ chất ATCI (acetylthiocholine iodide) (15 mM), 125 µL dung dịch DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) (3 mM) pha trong đệm C (50 mM Tris HCl pH 8; 0,1 M NaCl; 0,02 M MgCl₂), 50 µL dung dịch đệm B (50 mM Tris HCl pH 8, 0,1 % BSA (bovine serum albumin); 25 µL dung dịch enzyme acetylcholinesterase (0,22 U/mL pha trong dung dịch đệm B). Ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau đó đem đo OD ở bước sóng 405 nm. Galantamine được sử dụng làm chứng dương. Mẫu blank là mẫu không chứa enzyme. Mẫu chứng âm là mẫu không chứa cao chiết. Phần trăm ức chế acetylcholinesterase là chỉ

tiêu theo dõi của thí nghiệm, được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế acetylcholinesterase} = (\text{OD đối chứng} - \text{OD mẫu thử}) / (\text{OD đối chứng}) \times 100 \%$$

Sau đó, dựa vào kết quả, thí nghiệm xác định IC₅₀ (Half maximal inhibitory concentration) của cao ethanol loài có hoạt tính cao nhất sẽ được tiến hành.

Định tính một số nhóm hợp chất thứ cấp chính có trong cao chiết

Xác định nhanh một số nhóm chất thường gặp trong nguyên liệu thực vật, thường qua các phản ứng hóa học đặc trưng như phản ứng kết tủa, phản ứng tạo màu,... bao gồm các thí nghiệm: định tính phenol bằng thuốc thử Bortrager với KOH để phát hiện quinone và coumarin với màu đỏ, tím hoặc xanh lục, bằng gelatin để phát hiện tannin với kết tủa vàng nhạt; định tính alkaloid bằng thuốc thử Wagner cho kết tủa màu nâu; định tính flavonoid bằng H₂SO₄ đậm đặc cho màu đỏ đậm đến xanh dương (chalcone, aurone) hoặc màu cam đến đỏ (flavonoid), bằng NaOH/ethanol cho màu vàng đến đỏ với flavonoid; định tính terpenoid-steroid bằng phản ứng Rosenheim cho màu xanh dương với saponin triterpen, bằng phản ứng Salkowski để phát hiện steroid với màu đỏ đậm, xanh, tím, và phản ứng tạo bọt với saponin bằng HCl và NaOH; định tính các hợp chất glycoside bằng thuốc thử Molisch cho một lớp màu tím hoặc đỏ.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**Thu hái, phân loại và định danh**

Chúng tôi đã thu hái, phân loại và định danh được 6 loài thực vật không mạch bao gồm 3 loài rêu (*Pyrrhobryum spiniforme*, *Bryum argenteum*, *Campylopus umbellatus*) và 3 loài địa tiền (*Lepidozia fauriana*, *Plagiochila trabeculata*, *Schistochila blumei*) từ Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà, cụ thể:

Pyrrhobryum spiniforme

Giới: Plantae

Ngành: Bryophyta

Lớp: Bryopsida

Bộ: Rhizogoniales

Họ: Rhizogoniaceae

Chi: *Pyrrhobryum*Loài: *Pyrrhobryum spiniforme* (Hedw.) Mitt.

Tên tiếng Việt: Rêu Tháp bút hình gai

Tên tiếng Anh: pyrrhobryum moss

Pyrrhobryum spiniforme được rất ít người nghiên cứu và có rất ít báo cáo liên quan đến thành phần hóa học được công bố. Người ta tìm thấy pyrronin ở *P. spiniforme*. Theo Xiaowei (2007), các flavonoid, carotenoid và các thành phần acid béo của loài rêu này đã được nghiên cứu [21].

Bryum argenteum

Giới: Plantae

Ngành: Bryophyta

Lớp: Bryopsida

Bộ: Bryales

Họ: Bryaceae

Chi: *Bryum*Loài: *Bryum argenteum* Hedw.

Tên thông thường: Rêu Bạc

Tên tiếng Anh: silver moss, silver thread moss

Theo Sabovljevic và cộng sự (2001), *Bryum* spp. chứa các flavonoid, flavonol, biflavone, aurone, isoflavone, 3-desoxyanthocyanin và carotenoid [18]. *Bryum argenteum* chứa bioflavone, flavone glycoside, flavone diglycoside [7, 14]. Theo Alam và cộng sự (2015), hoạt tính kháng khuẩn của *Bryum argenteum* cùng 3 loài đài thực vật khác đã được Singh và cộng sự nghiên cứu để tìm phương pháp điều trị nhiễm trùng phồng. Những loài rêu như

Bryum argenteum có hoạt tính hạ sốt, kháng viêm màng nhầy ở mũi, giải độc và được dùng cho các bệnh nhiễm khuẩn ở Ấn Độ [1]. Bằng chứng về việc sử dụng *B. argenteum* trong bài thuốc dân gian chưa được tìm ra.

Campylopus umbellatus

Giới: Plantae

Ngành: Bryophyta

Lớp: Bryopsida

Bộ: Dicranales

Họ: Leucobryaceae

Chi: *Campylopus*Loài: *Campylopus umbellatus* (Schwägr. & Gaudich. ex Arn.) Paris

Đối với *C. umbellatus*, hiện nay chỉ mới có những nghiên cứu về thành phần kim loại của loài rêu này, còn lại chưa có những nghiên cứu khác về thành phần hóa học [15].

Lepidozia fauriana

Giới: Plantae

Ngành: Marchantiophyta

Lớp: Jungermanniopsida

Bộ: Jungermanniales

Họ: Lepidoziaceae

Chi: *Lepidozia*Loài: *Lepidozia fauriana* Stephani

Lepidozia fauriana sinh tổng hợp các sesquiterpenoid loại chiloscyphane gồm 11,12-dihydrochiloscyphone và dihydrochiloscypholone. Loài này cũng sản sinh eudesm-3-en-7 α -o, một sesquiterpenoid loại eudesmane [13]. Ngoài ra, loài này cũng tổng hợp sesquiterpenoid loại amorphane [4]. Người ta cũng đã tìm thấy rất nhiều loại sesquiterpenoid và hợp chất thơm khác nhau trong *L. fauriana* [3]. Lepidozenolide từ *Lepidozia fauriana* có đáp ứng tích cực với *Staphylococcus aureus* kháng methicillin ở nồng độ

100 µg/mL. Hợp chất này cũng cho thấy tác dụng ức chế *Candida albicans* và *Trichomonas fetus* ở nồng độ 100 µg/mL [5]. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Hsiang-Ru Lin (2015), lepidozenolide từ *L. fauriana* cũng hoạt động như một farnesoid X receptor [12].

Plagiochila trabeculata

Giới: Plantae

Ngành: Marchantiophyta

Lớp: Jungermanniopsida

Bộ: Jungermanniales

Họ: Plagiochilaceae

Chi: *Plagiochila*

Loài: *Plagiochila trabeculata* Steph

Các loài thuộc chi *Plagiochila* là nguồn giàu các sesquiterpenoid loại ent-2,3-secoaromadendrane, là những hợp chất có tác dụng ức chế sự phát triển của thực vật và kháng côn trùng rất mạnh. Hợp chất này chỉ được tìm thấy ở các loài thuộc chi *Plagiochila* mà chưa tìm thấy ở bất kì loài nào khác. Các loài thuộc chi *Plagiochila* được chia thành 2 nhóm về mặt hóa học, một loại có một chất rất đậm mùi đặc trưng là plagiochiline A (type A), còn lại là những loài không có hợp chất này (type B), trong đó có *Plagiochila trabeculata*. *P. trabeculata* cũng có các sesquiterpene loại ent-2,3-secoaromadendrane giống như các loài thuộc type A. Theo Asakawa và cộng sự (1980), type B là những loài chủ yếu sản sinh các hợp chất thơm và các sesquiterpenoid, diterpenoid thuộc nhiều loại khác nhau [6].

Schistochila blumei

Giới: Plantae

Ngành: Marchantiophyta

Lớp: Jungermanniopsida

Bộ: Jungermanniales

Họ: Schistochilaceae

Chi: *Schistochila*

Loài: *Schistochila blumei* (Nees) Trevis.

Đối với *Schistochila blumei*, hiện nay vẫn chưa có công bố nào về thành phần hóa học cũng như báo cáo về việc sử dụng loài địa tiền này.

Khử trùng và nuôi cấy Rêu Bạc *in vitro*

Trong số 6 loài địa thực vật thu hái được, chúng tôi chỉ nuôi cấy thành công 1 loài có khả năng sản sinh bào tử là *Bryum argenteum* (Rêu Bạc). Túi bào tử rêu bạc được khử ở nồng độ javel 30 % cho tỷ lệ 100 % mẫu sống và vô trùng. Với nồng độ Javel tăng dần, tỷ lệ mẫu sống và vô trùng tăng dần. Điều này có thể do túi bào tử đã bảo vệ bào tử vô trùng ở bên trong.

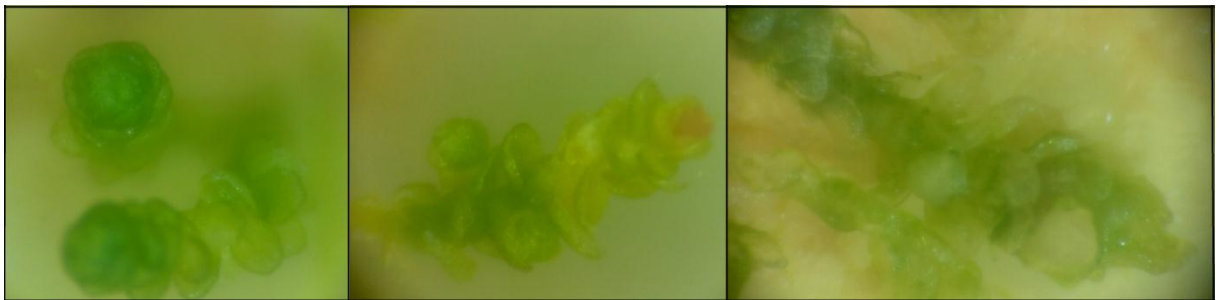
Trên môi trường MS bổ sung fructose 18 g/L cùng với 1 mg/L 2,4-D và 2 mg/L kinetin, có sự xuất hiện của nguyên tản sợi (protonema) và tạo chồi rêu; và mẫu rêu trên môi trường bổ sung 1 mg/L 2,4-D và 2 mg/L kinetin phát triển tốt hơn mẫu trên môi trường không bổ sung hormone cũng như môi trường bổ sung IBA và BA (Hình 3, 4). Điều này phù hợp với nghiên cứu của M. Sabovljevic và cộng sự (2002), trong đó, môi trường nuôi cấy *in vitro* *Bryum argenteum* là môi trường MS cơ bản với sucrose 30 g/l, bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 2 mg/L kinetin. Sự nảy mầm của bào tử có thể được quan sát sau 7 ngày nuôi cấy và sự hình thành protonema có thể thấy được trong vòng 8 ngày kế tiếp [19].

Sự phát triển của cây rêu ở môi trường bổ sung IBA 0,203 mg/L và BA 0,0025 mg/L với môi trường không bổ sung hormone không có sự khác biệt lớn (Hình 3). Trong khi đó, theo M. Sabovljevic và cộng sự (2009), thêm IBA 0,0203–0,203 mg/L (0,1–1 µM) và BA 6,75 µg/L–0,0225 mg/L (0,03–0,1 µM) giúp rêu cảm ứng tạo chồi [16].

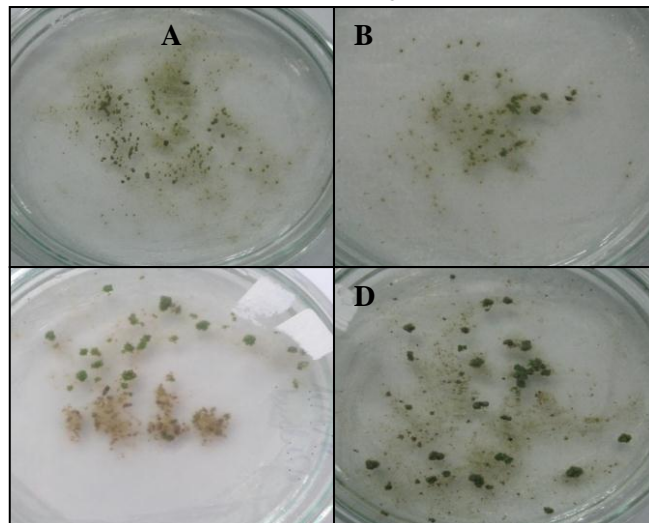
Khi sử dụng môi trường bổ sung NAA 1 mg/L và BA 2 mg/L, sự phát triển của rêu không tốt như ở các môi trường còn lại. Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường này, bắt đầu có sự xuất hiện của mô sẹo (Hình 3 và Hình 4).



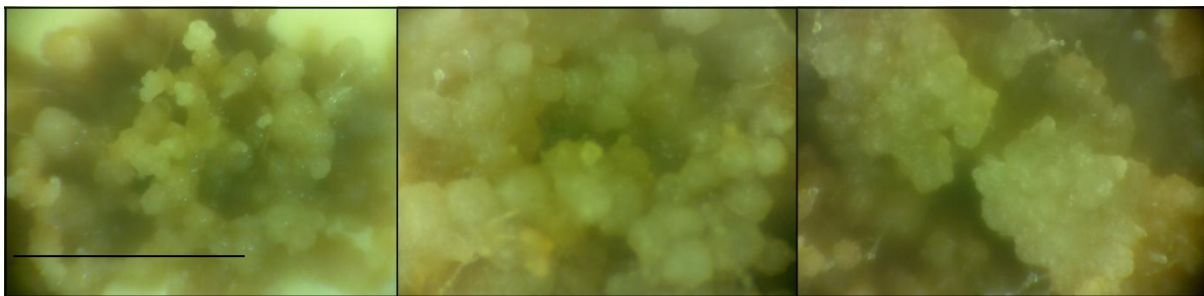
Hình 1. *Bryum argenteum* ở ngày thứ 28 trong nuôi cấy *in vitro*. A: môi trường không bổ sung hormone. B: môi trường bổ sung 2,4-D 1 mg/L, kinetin 2 mg/L. C: môi trường bổ sung IBA 0,203 mg/L; BA 0,0225 mg/L



Hình 2. Hình chụp dưới kính lúp chồi *Bryum argenteum* nuôi cấy *in vitro* trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 1 mg/l; kinetin 2 mg/l



Hình 3. *Bryum argenteum* trên môi trường bổ sung NAA 1 mg/L, BA 2 mg/L. A-B: 8 tuần sau khi đưa vào môi trường. C-D: 10 tuần sau khi đưa vào môi trường. Mũi tên chỉ mô sẹo được hình thành

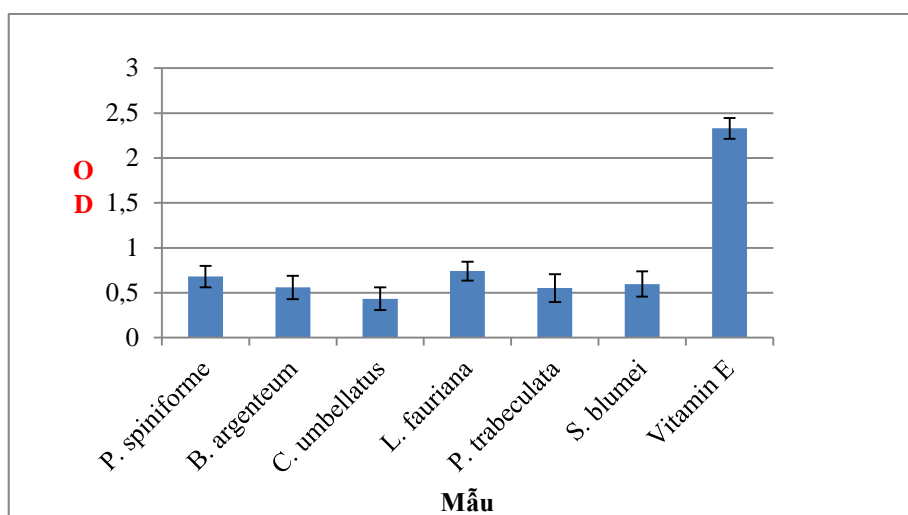


Hình 4. Hình chụp dưới kính lúp mô sẹo *Bryum argenteum* trên môi trường MS bổ sung NAA 1 mg/L, BA 2 mg/L

Khảo sát năng lực khử của cao chiết các loài đài thực vật

Nhìn chung, các loài đài thực vật thu được có khả năng kháng oxy hóa thể hiện qua năng lực khử thấp. So sánh năng lực khử giữa các mẫu với nhau, có thể thấy kết quả từ cao đến thấp là *L. fauriana* ($0,741^b \pm 0,105$) > *P. spiniforme* ($0,681^{bc} \pm 0,118$) > *S. blumei* ($0,598^{cd} \pm 0,140$) > *B. argenteum* ($0,560^d \pm 0,130$) > *P. trabeculata* ($0,552d \pm 0,154$) > *C. umbellatus*

($0,433^e \pm 0,126$), trong đó, không có sự khác biệt về phân hạng giữa *B. argenteum* và *P. trabeculata*. Thêm vào đó, so sánh với chứng dương (vitamin E) ($2,330^a \pm 0,117$), giá trị OD của những loài được thử nghiệm chưa bằng 1/2 giá trị OD của chứng dương, với nồng độ của các mẫu thử nghiệm là 5 mg/mL và của vitamin E là 0,5 mg/mL (Hình 3). Như vậy, có thể nói rằng 6 loài đài thực vật này, trong tự nhiên, không có tiềm năng cao về khả năng kháng oxy hóa.



Hình 5. Biểu đồ thể hiện khả năng kháng oxy hóa của các mẫu đài thực vật và vitamin E

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Trong 6 loài đài thực vật được khảo sát ở nồng độ cao chiết 10 mg/mL, *Schistochila blumei* kháng *E. faecalis* ($3,00 \pm 0,00$ mm), *B. cereus* ($7,67 \pm 2,89$ mm), *P. aeruginosa* ($2,00 \pm 0,50$ mm) mạnh nhất.

Hầu hết các mẫu đều không kháng 1 trong số 7 chủng vi khuẩn trong khảo sát, tuy nhiên, chỉ có *S. blumei* kháng được cả 7 chủng vi khuẩn và cho tính kháng với 3 chủng vi khuẩn kể trên mạnh nhất so với 5 loài đài thực vật còn lại. Như vậy, có thể nói, *S. blumei* có

tiềm năng kháng khuẩn cao nhất trong khảo sát này (Bảng 1). Theo báo cáo của Aneta Sabovljevic và cộng sự (2006), nồng độ ức chế nhỏ nhất (MIC) của *Bryum argenteum* trong tự nhiên đối với *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* lần lượt là 0,19 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,10 mg/mL, 0,09 mg/mL [17]. Song trong bài nghiên cứu này, hoạt tính kháng khuẩn của *Bryum argenteum* chưa thật sự nổi bật. Đối với *Lepidozia fauriana*, hợp chất lepidozenolide của loài này đã được nghiên cứu và cho kết quả kháng chủng *Staphylococcus aureus* kháng methicillin, kháng nấm *Candida albicans* và kháng kí sinh trùng

Trichomonas fetus [5]. Trong bài nghiên cứu này, *Lepidozia fauriana* kháng mạnh nhất đối với *B. cereus* và *P. aeruginosa*. Theo nghiên cứu của Võ Thị Phi Giao và cộng sự (2011), trong cấu tạo giải phẫu, lá địa tiền có chứa các thể dầu, là những hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học đặc biệt. Do đó, địa tiền được cho là có khả năng kháng khuẩn cao hơn rêu [10]. Thực tế, qua khảo sát này, không có sự phân biệt rõ ràng về hoạt tính kháng khuẩn của 6 loài được khảo sát với các chủng khuẩn Gram âm và Gram dương được sử dụng trong thí nghiệm.

Bảng 1. Kết quả kháng khuẩn của các mẫu địa thực vật và kanamycin

Mẫu	Kết quả kháng khuẩn (mm)						
	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. cholera</i>
Ps	0,83 ^b ± 0,29	0,17 ^b ± 0,29	0,33 ^{bc} ± 0,58	0,67 ^b ± 0,76	3,00 ^{cd} ± 1,73	-	0,67 ^c ± 0,58
Ba	1,17 ^b ± 0,29	0,67 ^b ± 0,58	0,83 ^{bc} ± 0,58	1,67 ^b ± 1,61	2,67 ^{cd} ± 0,58	-	0,33 ^c ± 0,29
Cu	0,83 ^b ± 1,04	0,33 ^b ± 0,58	1,17 ^{bc} ± 0,29	1,00 ^b ± 1,32	2,17 ^{de} ± 1,26	0,83 ^{bc} ± 1,04	-
Lf	0,33 ^b ± 0,58	1,00 ^b ± 1,73	-	2,33 ^b ± 2,31	5,00 ^c ± 3,46	1,33 ^{ab} ± 0,29	2,33 ^{bc} ± 2,08
Pt	0,67 ^b ± 1,16	0,67 ^b ± 0,58	-	2,00 ^b ± 1,00	5,00 ^c ± 3,46	0,50 ^{bc} ± 0,50	2,67 ^{bc} ± 2,52
Sb	0,67 ^b ± 0,58	3,00 ^a ± 0,00	0,83 ^{bc} ± 0,76	1,00 ^b ± 1,73	7,67 ^b ± 2,89	2,00 ^a ± 0,50	4,00 ^b ± 4,00
Kan	6,00 ^a ± 1,00	-	6,50 ^a ± 1,32	9,00 ^a ± 3,46	12,33 ^a ± 2,52	-	9,00 ^a ± 1,73
Chứng âm (nước)	0,33 ^b ± 0,58	-	1,50 ^b ± 1,32	0,05 ^b ± 0,05	-	0,50 ^{bc} ± 0,86	0,67 ^c ± 0,58

Chú thích: Ps: *P. spiniforme*, Ba: *B. argenteum*, Cu: *C. umbellatus*, Lf: *L. fauriana*, Pt: *P. trabeculata*, Sb: *S. blumei*, Kan: Kanamycin (chứng dương), - : không kháng khuẩn. Kết quả kháng khuẩn = đường kính vòng kháng khuẩn - chứng âm - dung môi dùng

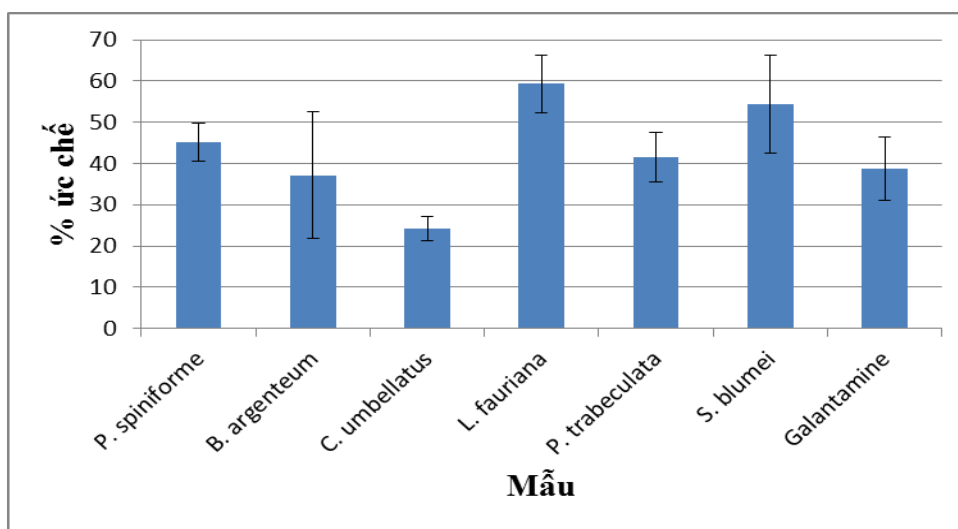
để hòa tan cao chiết. Kết quả được so sánh theo cột. Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05.

Khảo sát hoạt tính ức chế acetylcholinesterase

Nhìn chung, ở nồng độ 5 mg/mL, các loài đài thực vật được khảo sát đều có khả năng ức chế acetylcholinesterase. Trong đó, *Lepidozia fauriana* có hoạt tính ức chế cao nhất là $59,285 \pm 7,044$ (%) (Hình 6). Tiếp theo, thí nghiệm xác định IC₅₀ ức chế acetylcholinesterase của *L. fauriana* được thực hiện, và kết quả thí nghiệm cho thấy giá trị IC₅₀ của *L. fauriana* ức chế acetylcholinesterase là $6,617 \pm 0,080$ mg/mL.

Trước đây, hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của *Lepidozia fauriana* đã được nghiên cứu. Ngoài ra, loài này còn chứa các hợp chất có liên quan đến tác dụng kháng tiểu cầu, làm giảm áp lực mạch máu [5]. Theo nghiên cứu của Hsiang-RuLin (2015), *L.*

fauriana cũng chứa một loại hợp chất hoạt động như một hoạt chất farnesoid X receptor, một trong những nhân tố điều hòa phiên mã những gene mục tiêu có vai trò quan trọng, được cho là có liên quan đến sự hình thành nhiều bệnh, bao gồm ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, tiểu đường [12]. Có thể nói, đây là loài có tiềm năng về dược tính. Tuy nhiên, hiện nay, chưa tìm thấy nghiên cứu nào liên quan đến khả năng ức chế acetylcholinesterase của đài thực vật. Do đó, kết quả này có thể gợi ý một nguồn thu nhận hợp chất tự nhiên mới có khả năng ức chế acetylcholinesterase, hỗ trợ điều trị Alzheimer thay thế cho các hợp chất đang được sử dụng nhưng có những phản ứng phụ không mong muốn.



Hình 6. Biểu đồ thể hiện % ức chế acetylcholinesterase của các mẫu đài thực vật và galantamine Định tính một số nhóm hợp chất thứ cấp chính có trong cao chiết

Bảng 2. Kết quả định tính một số nhóm hợp chất thứ cấp chính có trong cao chiết

Nhóm chức	Thuốc thử	<i>P. spiniforme</i>	<i>B. argenteum</i>	<i>C. umbellatus</i>	<i>L. fauriana</i>	<i>P. trabeculata</i>	<i>S. blumei</i>
Quinone, coumarin	Thuốc thử Bortrager với KOH/ methanol	+	-	-	-	-	-
Tannin	Gelatin mặn	-	+	+	-	+	+
Alkaloid	Thuốc thử Wagner	-	-	-	-	-	-

Flavonoid	H ₂ SO ₄ đậm đặc	+	+	+	+	+	+
	1 % NaOH trong ethanol	+	+	+	+	+	+
Terpenoid – Steroid	Phản ứng Rosenheim	-	-	-	-	-	-
	Phản ứng Salkowski	+	+	+	-	-	+
Saponin	NaOH và HCl, thử tính tạo bọt	-	+	-	-	+	+
Glycoside – Lacton vòng 5	Thuốc thử Molisch	+	+	+	+	+	+

Cả 6 loài đài thực vật được khảo sát đều có flavonoid và đường aldose, ketose. Ở phản ứng Rosenheim và với thuốc thử Wagner, cả 6 loài khảo sát đều cho kết quả âm tính, chứng tỏ không có saponin triterpenoid và alkaloid. Ở phản ứng Salkowski, cả 3 loài rêu khảo sát đều cho kết quả dương tính, riêng địa tiễn thì chỉ có *S. blumei* cho kết quả dương tính. Điều này cho thấy rằng các loài rêu có khả năng chứa steroid. Trong số những nhóm hợp chất đã được định tính, *L. fauriana* không cho kết quả dương tính với phản ứng nào trừ các phản ứng xác định sự hiện diện của flavonoid và đường aldose, ketose. Vậy hoạt tính ức chế acetylcholinesterase của loài này cao hơn của những loài còn lại là do một hay một nhóm hợp chất khác chưa xác định, hoặc do thành phần flavonoid của loài này có điểm khác với những loài còn lại. Trong số các loài được khảo sát, ở phản ứng xác định quinon, coumarin, chỉ có *P. spiniforme* cho kết quả dương tính. Nhưng đối với những thí nghiệm khảo sát hoạt tính đã thực hiện trước đó (kháng khuẩn, kháng oxy hóa, ức chế acetylcholinesterase), *P. spiniforme* không cho thấy hoạt tính nổi bật. Điều này cho thấy quinon, coumarin không đóng vai trò quyết định đối với những thí nghiệm khảo sát hoạt tính đã thực hiện (Bảng 2).

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã khử trùng thành công túi bào tử rêu bạc *Bryum argenteum* với nồng độ javel 30 %. Trong số những môi trường được khảo sát, môi trường MS bổ sung 2,4-D 1 mg/L và kinetin 2 mg/L tốt nhất cho sự phát triển của Rêu Bạc.

Thông qua các thí nghiệm khảo sát hoạt tính, chúng tôi đã chứng minh *Lepidozia fauriana* có khả năng kháng oxy hóa cao nhất trong 6 loài được khảo sát. Bên cạnh đó, *Schistochila blumei* có hoạt tính kháng *E. faecalis*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* mạnh nhất. Đồng thời, cả 6 mẫu đài thực vật đều có khả năng ức chế acetylcholinesterase. Trong đó, *L. fauriana* có khả năng ức chế acetylcholinesterase cao nhất ($IC_{50}=6,617 \pm 0,080$ mg/mL). Cả 6 mẫu đài thực vật được khảo sát đều có flavonoid và đường aldose, ketose, không có alkaloid và saponin triterpenoid.

Như vậy, các loài rêu và địa tiễn được khảo sát trong đề tài có tiềm năng về hoạt tính sinh học và cần có những nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính cũng như thành phần hóa học của chúng, đồng thời tiếp tục tìm kiếm và nghiên cứu thêm những loài đài thực vật mới.

Biological activities and micropropagation of non-vascular plants from Bidoup-Nui Ba National Park, Lam Dong

- Quach Ngo Diem Phuong
- Do Ngoc Bao Tran
- Tra Dong Phuong
- Luong Thien Tam
- Tran Nguyen Anh Thu
- Tran Linh Thuoc

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

At the present time, non-vascular plants (bryophytes) are less studied, especially in Vietnam. Therefore, this research focuses on studying biological activities of some bryophytes species collected in Bidoup-Nui Ba National Park, such as antioxidative, antibacterial activity, acetylcholinesterase inhibitory activity and quantitative analysis of the major secondary metabolites. Moreover, one of the most potential species was micropropagated in vitro in order to get the initiative pharmaceutical materials. Among the six bryophyte species collected in Bidoup-Nui Ba

National Park, three of them are mosses (*Pyrrhobryum spiniforme*, *Bryum argenteum* and *Campylopus umbellatus*) and three of them are liverworts (*Lepidozia fauriana*, *Plagiochila trabeculata* and *Schistochila blumei*). Our results showed that *L. fauriana* had the highest antioxidative activity and acetylcholinesterase inhibitory activity ($IC_{50} = 6.617 \pm 0.080$ mg/mL), *S. blumei* had the potent antibacterial activity. In vitro propagation results showed that silver moss could be micropropagated using spores in MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 2 mg/L kinetin.

Keywords: acetylcholinesterase, antibacterial, antioxidative, bryophytes, in vitro, non-vascular plants

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Alam, V. Shrama, K. K. Rawat, P. K. Verma, Bryophytes - The Ignored Medicinal Plants, *SMU Medical Journal*, 2, 1, 299–316 (2015).
- [2]. H. Ando, A. Matsuo, *Applied bryology*, Vaduz J. Carmer (1984).
- [3]. Y. Asakawa, A. Ludwiczuk, F. Nagashima, Chemical constituents of Marchantiophyta, *Chemical Constituents of Bryophytes*, 95, 25–561 (2013).
- [4]. Y. Asakawa, A. Ludwiczuk, F. Nagashima, Chemosystematics of Marchantiophyta, *Chemical Constituents of Bryophytes*, 95, 639-704 (2013).
- [5]. Y. Asakawa, A. Ludwiczuk, F. Nagashima, Phytochemical and biological studies of bryophytes, *Phytochemistry*, 91, 52–80 (2013).
- [6]. Y. Asakawa, H. Inoue, M. Toyota, T. Takemoto, Sesquiterpenoids of fourteen *Plagiochila* species, *Phytochemistry*, 19, 2623–2626 (1980).
- [7]. R.C. Cambie, A New Zealand phytochemical register - Part V, *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 26, 483 (1996).
- [8]. B.C. Stotler, R. E. Stotler, D.G. Long, Morphology and classification of the Marchantiophyta, In B. Goffinet & A.J. Shaw

- (eds.) *Bryophyte Biology* (2nd edition), 1–54 (2009).
- [9]. B. Crandall-Stotler, R.E. Stotler, D.G. Long, Phylogeny and classification of the Marchantiophyta, *Edinburgh Journal of Botany*, 66, 155–198 (2009).
- [10]. V.T.P. Giao, Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của một số loài rêu ở Vườn Quốc gia Bidoup–Núi Bà, Báo cáo nghiệm thu chương trình Vườn ươm Sáng tạo Khoa học và Công nghệ trẻ, TP. Hồ Chí Minh (2011).
- [11]. B. Goffinet, W.R. Buck, A.J. Shaw, Morphology and classification of the Bryophyta, In B. Goffinet & A. J. Shaw (eds.) *Bryophyte Biology 2nd edition*, 55–138 (2008).
- [12]. H.R. Lin, Lepidozenolide from the liverwort *Lepidozia fauriana* acts as a farnesoid X receptor agonist, *Journal of Asian Natural Products Research*, 17, 2, 149–158 (2015).
- [13]. A. Ludwiczuk, Y. Asakawa, Chemosystematics of selected liverworts collected in Borneo, *Tropical Bryology*, 31, 33–42 (2010).
- [14]. K.R. Markham., D.R. Given, The major flavonoids of an Antarctic Bryum, *Phytochemistry*, 27(9), 2843–2845 (1988).
- [15]. I. Nagano, Y. Aikawa, T. Wada, S. Arai, S. Matsumoto, Chemical elements in the substrates of *scopelophila ligulata* and other mosses growing on the same black slate, *Journal of Environmental Sciences*, 12, 1, 1–8 (1999).
- [16]. A. Sabovljevic, M. Sabovljevic, N. Jockovic, In vitro culture and secondary metabolite isolation in bryophytes, *Methods in molecular Biology, protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants*, 547, 117–128 (2009).
- [17]. A. Sabovljevic, M. Sokovic, M. Sabovljevic, D. Grubisic, Short report: Antimicrobial activity of *Bryum argenteum*, *Fitoterapia*, 77, 144–145 (2006).
- [18]. M. Sabovljevic, A. Bijelovic, D. Grubisic, Bryophytes as a potential source of medicinal compounds, *Lekovite Sirovine Zbornik Radova*, 21, 21, 17–29 (2001).
- [19]. M. Sabovljevic, A. Bijelovic, I. Dragicevic, Effective and easy way of establishing in vitro culture of mosses, *Bryum argenteum* Hedw. and *Bryum Capilure* Hedw. (Bryaceae), *Archives of Biological Sciences*, 54, 1–2, 7–8 (2002).
- [20]. B. Trusheva, D. Trunkova, V. Bankova, Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study, *Chemistry Central Journal*, 7, 1–13 (2007).
- [21]. G. Xiaowei, *Chemistry of Bryophytes*, Doctoral thesis, Department of Chemistry, National University of Singapore, Singapore (2007).