

NUÔI CẤY TẾ BÀO CÂY MÓNG TAY (*IMPATIENS BALSAMINA* L.) ĐỂ THU NHẬN CHẤT KHÁNG NẤM THUỘC NHÓM NAPHTOQUINON

Lâm Thùy Mỹ⁽¹⁾, Nguyễn Đình Nga⁽²⁾, Trương Thị Đẹp⁽²⁾, và Bùi Trang Việt⁽¹⁾

(1) Khoa Sinh học, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

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

(Bài nhận ngày 28 tháng 03 năm 2005, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 10 tháng 08 năm 2005)

TÓM TẮT: Công trình được thực hiện nhằm chứng minh sự hiện diện của các chất kháng nấm thuộc nhóm naphthoquinon ở vài giống trồng cây Móng tay *Impatiens balsamina* L. Mô sẹo được tạo từ hạt và tử diệp trên môi trường B5 chứa NAA 2 mg/l và kinetin 1 mg/l. Dịch treo tế bào được tạo từ các mô sẹo này, bằng cách dùng môi trường B5 chứa 2,4-D 0,1 mg/l và kinetin 1 mg/l. Các chất kháng nấm và các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được ly trích từ lá và mô sẹo. Các sinh trắc nghiệm được dùng để xác định hoạt tính của các chất này. Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự tăng trưởng của mô sẹo liên hệ với sự thành lập chất kháng nấm trong mô sẹo được thảo luận.

Từ khóa: *Impatiens balsamina* L., mô sẹo, dịch treo tế bào, chất kháng nấm, naphthoquinon, các chất điều hòa tăng trưởng thực vật.

1. Mở Đầu

Cây Móng tay (*Impatiens balsamina* L.), được trồng phổ biến ở Việt Nam để làm cảnh, có chứa nhiều dược chất, đặc biệt là các chất kháng nấm thuộc nhóm naphthoquinon (Đỗ Tất Lợi 1995, Võ Văn Chi 1999). Dược chất thường được ly trích từ cây nguyên vẹn, nhưng gần đây hơn, người ta đặc biệt chú ý tới các phương pháp ly trích từ sự nuôi cấy tế bào (Dicosmo and Misawa 1996). Trong bài này, chúng tôi trình bày cách tạo mô sẹo và dịch treo tế bào ở cây Móng tay trong mục đích thu nhận dược chất kháng nấm.

2. Vật Liệu Và Phương Pháp

2.1. Vật liệu

- Lá từ các cây Móng tay (*Impatiens balsamina* L.) đang ra hoa có hoa màu hồng, tím, đỏ tươi và đỏ sẫm.

- Hạt từ các cây Móng tay có hoa màu hồng, tím, đỏ tươi và đỏ sẫm.

- Tử diệp của cây mầm 2 tuần tuổi được nuôi cấy *in vitro* từ hạt các cây Móng tay có hoa màu hồng, tím, đỏ tươi và đỏ sẫm được gieo trên môi trường B5 (Gamborg and Philips 1995).

- Vi nấm *Pityrosporium orbiculare* ATTC 44344.

2.2. Phương pháp

Sự tạo mô sẹo: Hạt hay tử diệp được nuôi cấy trên môi trường B5 (Gamborg and Philips 1995) không chứa hay chứa các chất điều hòa tăng trưởng thực vật có thành phần như sau:

2,4-D 0,1 mg/l và kinetin 1 mg/l;

2,4-D 1 mg/l và kinetin 1 mg/l;

NAA 2 mg/l và kinetin 1 mg/l;

NAA 5 mg/l và kinetin 1 mg/l.

Tử diệp được rạch trên bề mặt và đặt úp xuống môi trường. Sự nuôi cấy được thực hiện trong tối, ở nhiệt độ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm tương đối $56 \pm 4\%$.

Sự tạo dịch treo tế bào: Dùng 1g mô sẹo 4 tuần tuổi (có nguồn gốc từ tử diệp của cây có hoa màu đỏ thẫm) được cho vào Erlen chứa 10 ml môi trường B5 có 2,4-D 0,1 mg/l và kinetin 1 mg/l. Erlen được đặt trên máy lắc vòng ở 80 vòng/phút, ánh sáng 1.000 ± 200 lx (12 giờ chiếu sáng/ngày), nhiệt độ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm tương đối $56 \pm 4\%$.

Quan sát hình thái giải phẫu: Mô sẹo được quan sát dưới kính lúp và chụp ảnh. Dịch treo tế bào được quan sát và chụp ảnh trực tiếp dưới kính hiển vi.

Đo cường độ quang hợp và hô hấp: Cường độ quang hợp và hô hấp được đo bằng máy Warburg, dựa trên sự trao đổi khí oxygen, ở 25°C , 2.500 lx (quang hợp) hay trong tối (hô hấp).

Ly trích và đo hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật: Lá từ cây ngoài thiên nhiên và mô sẹo 4 tuần tuổi được dùng để ly trích các chất điều hòa tăng trưởng thực vật bằng các dung môi thích hợp, và xác định hoạt tính của chúng nhờ các sinh trắc nghiệm và bằng cách so sánh với các dung dịch chuẩn (theo Bùi Trang Việt 1992).

Ly trích, xác định và thử hoạt tính của chất kháng nấm: Lá và mô sẹo được sấy khô ở 50°C cho tới khi trọng lượng không đổi, nghiền trong metanol 80%, và giữ trong tối, ở 30°C , trong 24 giờ. Lọc, cô cạn, hòa cạn trong nước và ly trích với acetat etil. Làm bốc hơi acetat etil và hòa cạn trong acetat etil để tạo các dịch trắc nghiệm, ở nồng độ tương đương 0,2g bột lá hay mô sẹo khô trong 0,5 ml acetat etil.

Tế bào dịch treo được ly tâm ở 700 vòng / phút (trong 10 phút) và ly trích theo cách trên, để tạo dịch trắc nghiệm ở nồng độ tương ứng với 1g tế bào tươi trong 0,2 ml acetat etil.

Để chứng minh sự hiện diện của chất kháng nấm, các dịch trắc nghiệm trên được chấm lên bản mỏng sắc ký, mỗi vết 10 μl , song song với chất đối chiếu 2-methoxy-1,4-naphtoquinon. Sự phân ly được thực hiện với dung môi CHCl_3 , và vị trí các chất trên bản sắc ký được xác định dưới đèn UV 254nm (2-methoxy-1,4-naphtoquinon phát quang tím) hay bằng cách phun thuốc thử KOH/MeOH (để thấy vết vàng cam).

Để thử tác dụng kháng nấm, 30 μl dịch trắc nghiệm được cho lên mỗi đĩa giấy có đường kính 6 mm. Để khô tự nhiên các đĩa giấy, và cho chúng lên môi trường PGY (pepton 10 g/l, glucoz 20 g/l, yeast extract 10 g/l, agar 15 g/l, dầu ô-liu 2,5%) đã được cấy nấm *Pityrosporum orbiculare* ATTC 44344. Đường kính vòng kháng nấm được quan sát sau 48 giờ ủ ở 37°C .

3. Kết Quả Và Thảo Luận

3.1. Sự tạo mô sẹo từ hạt và tử diệp

Đối với sự tạo mô sẹo từ hạt, trong tất cả các xử lý, sự phối hợp NAA 2 mg/l và kinetin 1 mg/l cho mô sẹo phát triển mạnh ở mặt tử diệp tiếp xúc với môi trường (ảnh 1). Đối với sự tạo mô sẹo từ tử diệp, mô sẹo hình thành tại các vết cắt và phát triển tốt nhất trên môi trường B5 có sự phối hợp của 2,4-D 0,1 mg/l và kinetin 1 mg/l, và ở các tử diệp có nguồn gốc từ cây có hoa màu đỏ thẫm và đỏ tươi (ảnh 2-5).

3.2. Sự nuôi cấy dịch treo tế bào

Sau 6 tuần nuôi cấy, dịch treo tế bào tương đối ổn định với các nhóm tế bào đang phân chia mạnh (ảnh 6) hay các tế bào rời rạc.

3.3. Cường độ quang hợp và cường độ hô hấp của mô cấy trên môi trường tạo mô sẹo

Cường độ quang hợp và hô hấp luôn luôn rất cao ở tử diệp có nguồn gốc từ cây có hoa màu đỏ thẫm, ở ngày 0 (tử diệp 2 tuần tuổi trên môi trường B5), cũng như ở ngày 7, so với tử diệp có nguồn gốc từ cây có hoa màu đỏ tươi, tím hay hồng (bảng 1). Các tiền chất của các hợp chất thứ cấp ở thực vật, bao gồm các chất được dùng trong Y Dược, có nguồn gốc từ hô hấp tế bào (Taiz and Zeiger, 1991). Do đó, phải chăng hoạt động biến dưỡng mạnh của mô cấy có liên quan tới sự thành lập và tăng trưởng mô sẹo, cũng như sự tạo các hợp chất kháng nấm?

Bảng 1: Cường độ quang hợp và hô hấp của mô cấy (tử diệp có nguồn gốc từ cây có hoa màu đỏ thẫm, đỏ tươi, tím và hồng) trên môi trường B5 có bổ sung 2,4-D 0,1 mg/l phối hợp với kinetin 1 mg/l.

| Thời gian (ngày) | Hồng | Tím | Đỏ tươi | Đỏ thẫm |
|---|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Cường độ quang hợp ($\mu\text{l O}_2/\text{g/giờ}$) | | | | |
| 0 | 16,09 \pm 0,75 | 17,77 \pm 0,78 | 90,87 \pm 7,06 | 194,54 \pm 10,05 |
| 7 | 2,34 \pm 0,20 | 14,73 \pm 0,61 | 9,35 \pm 0,40 | 16,76 \pm 0,76 |
| Cường độ hô hấp ($\mu\text{l O}_2/\text{g/giờ}$) | | | | |
| 0 | 7,21 \pm 0,45 | 6,84 \pm 0,30 | 17,42 \pm 1,85 | 26,60 \pm 2,18 |
| 7 | 10,99 \pm 1,05 | 6,98 \pm 0,33 | 30,95 \pm 2,83 | 40,46 \pm 3,66 |

3.4. Sự hiện diện và hoạt tính của chất kháng nấm

Hoạt tính kháng nấm hiện diện rõ trên bản thạch được cấy nấm *Pityrosporium orbiculare* ATTC 44344 đối với dịch trích lá và mô sẹo có nguồn gốc từ cây có hoa đỏ thẫm, không có đối với dịch treo tế bào (ảnh 7, 8, 9).

Trên bản sắc ký mỏng, dịch trích lá cây có hoa hồng và đỏ thẫm có vết tương ứng với chất đối chiếu (2-methoxy-1,4-naphthoquinon), tuy nhiên chỉ có dịch trích mô sẹo có nguồn gốc từ cây có hoa đỏ thẫm có vết tương ứng với chất đối chiếu (ảnh 10, 11, 12).

3.5. Hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Đặc điểm nổi bật nhất về hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật là hoạt tính auxin rất cao ở lá hay mô sẹo có nguồn gốc từ cây có hoa đỏ thẫm so với các cây khác. Hoạt tính gibberelin khá cao trong lá của các cây có hoa màu đỏ thẫm và hồng, nhưng rất cao trong mô sẹo từ cây có hoa màu đỏ thẫm (bảng 2,3).

Bảng 2: Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong lá của các cây Móng tay có hoa hồng, tím, đỏ tươi và đỏ thẫm.

| Hoạt tính (mg/l) | Hồng | Tím | Đỏ tươi | Đỏ thẫm |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Auxin | 3,24 \pm 0,04 | 1,20 \pm 0,00 | 3,08 \pm 0,00 | 5,60 \pm 0,04 |
| Acid abscisic | 0,40 \pm 0,00 | 0,40 \pm 0,00 | 0,42 \pm 0,00 | 0,46 \pm 0,00 |
| Cytokinin | 0,41 \pm 0,00 | 0,15 \pm 0,00 | 0,14 \pm 0,00 | 0,29 \pm 0,00 |
| Giberelin | 4,55 \pm 0,00 | 0,70 \pm 0,00 | 0,37 \pm 0,00 | 3,01 \pm 0,01 |

Bảng 3: Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong mô sẹo có nguồn gốc từ cây Móng tay có hoa màu hồng, tím, đỏ tươi và đỏ thẫm.

| Hoạt tính (mg/l) | Hồng | Tím | Đỏ tươi | Đỏ thẫm |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Auxin | 1,35 ± 0,00 | 2,00 ± 0,01 | 1,14 ± 0,00 | 6,00 ± 0,03 |
| Acid abscisic | 0,50 ± 0,00 | 1,44 ± 0,01 | 0,49 ± 0,00 | 0,48 ± 0,00 |
| Cytokinin | 0,26 ± 0,00 | 0,65 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 |
| Giberelin | 7,34 ± 0,05 | 3,08 ± 0,01 | 0,91 ± 0,03 | 4,95 ± 0,03 |

Các kết quả được trình bày cho thấy, auxin và tỉ lệ auxin/ cytokinin cao có vai trò quan trọng trong cả sự phát triển mô sẹo lẫn sự tạo các chất có hoạt tính kháng nấm từ mô sẹo. Giberelin cao liên quan tới sự tạo chất kháng nấm trong lá của các cây có hoa màu đỏ thẫm và hồng, nhưng hàm lượng rất cao của giberelin trong mô sẹo từ cây có hoa màu hồng không giúp sự tạo chất kháng nấm này trong mô sẹo.

4. Kết Luận

1. Cây Móng tay có hoa màu đỏ thẫm có lá và mô sẹo từ tử diệp chứa nhiều hoạt tính kháng nấm so với các cây có hoa màu hồng, tím và đỏ tươi.
2. Hoạt động biến dưỡng mạnh (quang hợp và hô hấp), hàm lượng auxin và đặc biệt là tỉ lệ auxin / cytokinin có vai trò đặc biệt quan trọng trong sự tạo mô sẹo và sự tạo các hoạt chất kháng nấm của mô sẹo.

Trong tương lai, chúng tôi sẽ tiếp tục tìm hiểu thêm vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự tạo mô sẹo và dịch treo tế bào, cũng như trong sự tạo các hoạt chất kháng nấm của mô sẹo và dịch treo tế bào.

THE OBTAINMENT OF THE FUNGICIDES BELONGING TO NAPHTOQUINONE GROUP FROM *IMPATIENS BALSAMINA* L. USING CELL AND TISSUE CULTURES

Lam Thuy My⁽¹⁾, Nguyen Dinh Nga⁽²⁾, Truong Thi Dep⁽²⁾, Bui Trang Viet⁽¹⁾

(1) University of Natural Sciences – VietNam National University Ho Chi Minh City

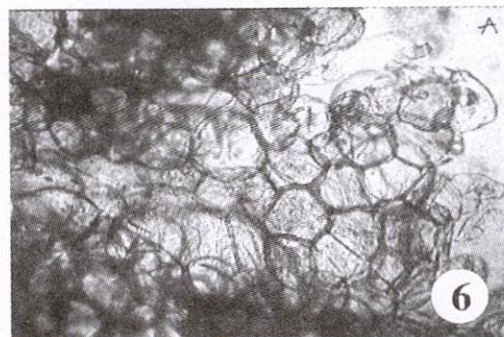
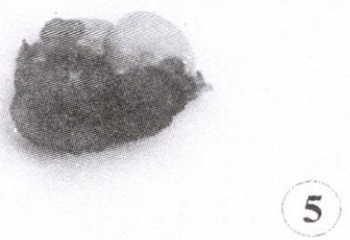
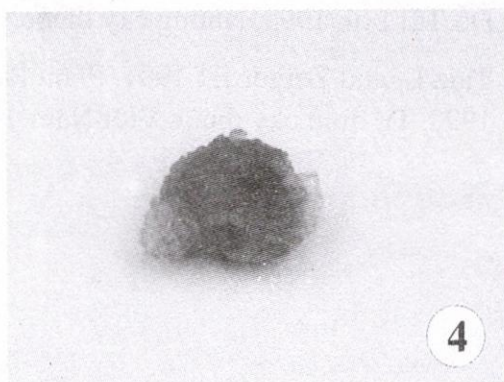
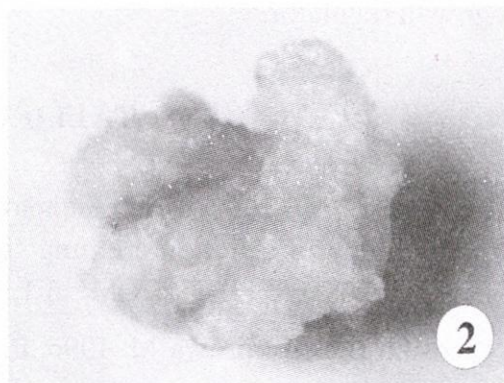
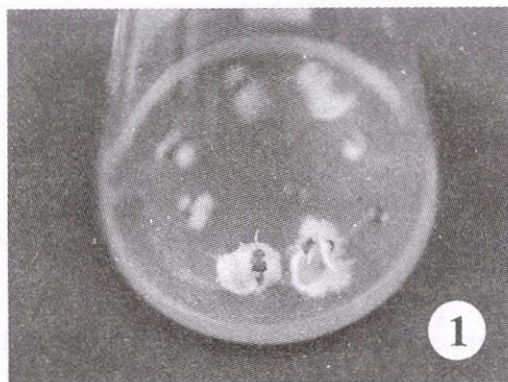
(2) University of Medicine Ho Chi Minh City

ABSTRACT: Attempts were made in this paper to show the presence of the fungicides belonging to naphthoquinone group in some cultivars of *Impatiens balsamina* L. Calluses were initiated from seeds and cotyledons on B5 medium containing 2 mg/l NAA and 1 mg/l kinetin. Cell suspensions were obtained from these calluses, using B5 medium supplemented with 0,1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l kinetin. The fungicides and the plant growth regulators were extracted from the leaves and the calluses. Bioassays were used to detect the presence of hormone and fungicide activities. Roles of the plant growth regulators on the callus growth in relation to fungicide formation were discussed.

Keywords: *Impatiens balsamina* L., callus, cell suspension, fungicide, naphthoquinone, plant growth regulator.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

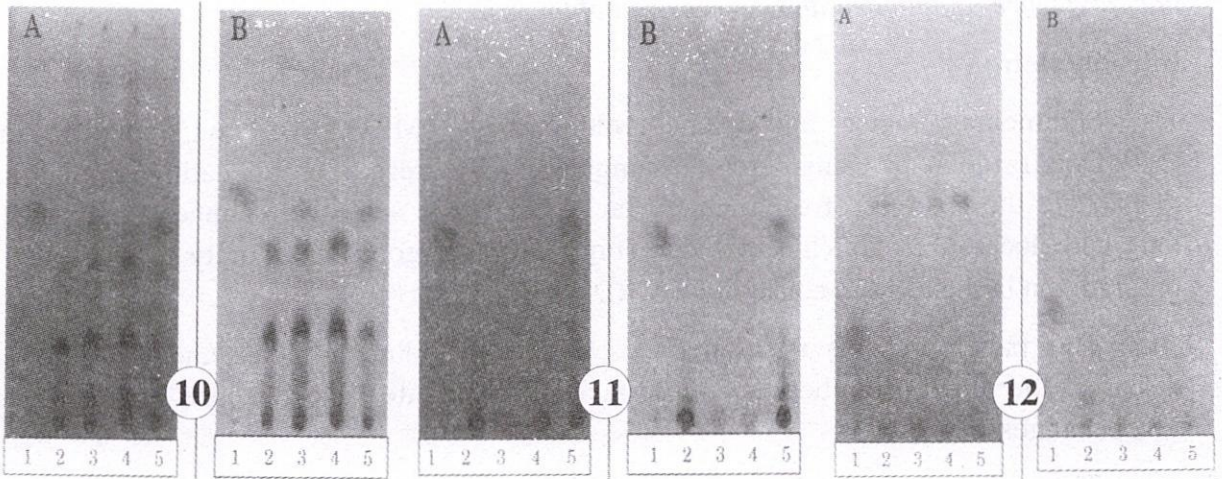
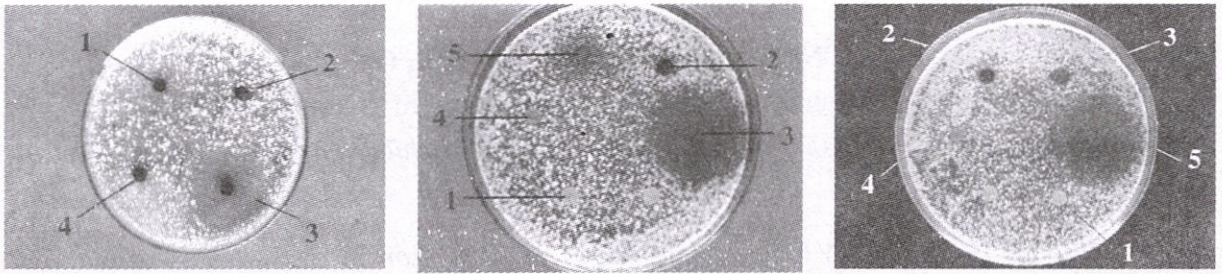
1. Bùi Trang Việt. 1992. Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng “bông” và “trái non” Tiêu (*Piper nigrum* L.). Tập san khoa học, ĐHTH TP HCM, số 1, 155 - 165.
2. Dicosmo F. and Misawa M. 1996. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental methods. Springer.
3. Gamborg O.L. and Philips G.C. 1995. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlay.
4. Đỗ Tất Lợi, 1995. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nxb. Khoa học và kỹ thuật.
5. Taiz L. and Zeiger E., 1991. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings. Võ Văn Chi, 1999. Tự điển cây thuốc Việt Nam. Nxb. Y học.



Ảnh 1: Mô sẹo từ hạt của cây có màu đỏ thẫm sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường B5 có NAA 2mg/l và kinetin 1mg/l

Ảnh 2-5: Mô sẹo từ hạt của cây có màu đỏ tươi (ảnh 2), đỏ thẫm (ảnh 3), tím (ảnh 4) và hồng (ảnh 5), sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường B5 có 2,4-D 0,1mg/l và kinetin 1mg/l.

Ảnh 6: Tế bào dịch treo từ mô sẹo từ hạt của cây có hoa màu đỏ thẫm sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường B5 có 2,4-D 0,1mg/l và BA 1mg/l



Ảnh 7: Hoạt tính kháng nấm của dịch trích lá từ cây có hoa màu hồng (1), đỏ tươi (2), đỏ thẫm (3) và tím (4)

Ảnh 8: Hoạt tính kháng nấm của dịch trích mô sẹo từ tử diệp của cây có hoa màu hồng (1), đỏ tươi (2), đỏ thẫm (3) và tím (4) so với dịch trích lá từ cây có hoa màu hồng (5)

Ảnh 9: Hoạt tính kháng nấm của dịch trích tế bào dịch treo có nguồn gốc từ cây có hoa màu hồng (1), đỏ tươi (2), đỏ thẫm (3) và tím (4) so với dịch trích mô sẹo từ tử diệp của cây có hoa màu đỏ thẫm (5)

Ảnh 10: Phát hiện vị trí Naphthoquinon trên bản mỏng sắc kí: chất đối chiếu (1), chất trích lá từ cây có hoa màu tím (2), hồng (3), đỏ tươi (4) và đỏ thẫm (5). A, phát hiện dưới tia UV. B, phát hiện bằng thuốc thử KOH/MeOH

Ảnh 11: Phát hiện vị trí Naphthoquinon trên bản mỏng sắc kí: chất đối chiếu (1), chất trích mô sẹo từ lá cây có hoa màu tím (2), hồng (3), đỏ tươi (4) và đỏ thẫm (5). A, phát hiện dưới tia UV. B, phát hiện bằng thuốc thử KOH/MeOH

Ảnh 12: Phát hiện vị trí Naphthoquinon trên bản mỏng sắc kí: chất đối chiếu (1), chất trích tế bào dịch treo từ cây có hoa màu tím (2), hồng (3), đỏ tươi (4) và đỏ thẫm (5). A, phát hiện dưới tia UV. B, phát hiện bằng thuốc thử KOH/MeOH