

# VAI TRÒ CỦA MỘT SỐ TỔ HỢP ĐƯỜNG VÀ CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG THỰC VẬT ĐẾN SỰ TĂNG SINH CỦA DỊCH TREO TẾ BÀO THÔNG ĐỎ *TAXUS WALLICHIANA* ZUCC.

Trần Hồng Anh<sup>1\*</sup>, Lê Thị Thủy Tiên<sup>2</sup>, Võ Đình Quang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP.HCM, saomai6@yahoo.com

<sup>2</sup>Đại học Bách Khoa TP.HCM

## TÓM TẮT

Dịch treo tế bào thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc. được tạo ra từ mô sẹo có nguồn gốc từ thân non cây *Taxus wallichiana* Zucc. lấy từ địa bàn Lâm Đồng trên môi trường khoáng B5 bổ sung saccharose 20 g/l, 2,4-D 4 mg/l + kinetin 1 mg/l và AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l. Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố vật lý (trọng lượng tế bào khởi đầu và vận tốc lắc) và các yếu tố hóa học (loại và nồng độ đường và tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật). Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào tốt nhất khi nuôi cấy 1 g mô sẹo tươi trong 10 ml môi trường lỏng B5 bổ sung saccharose 20 g/l + glucose 5 g/l + fructose 5 g/l cùng với tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật picloram 1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + NAA 0,5 mg/l trong bình tam giác 50 ml, trên máy lắc vòng với vận tốc lắc 60 vòng/phút, trong tối, ở nhiệt độ 25 ± 1°C. Việc bổ sung vào môi trường nuôi cấy 200 mg đường (glucose, fructose, saccharose hoặc hỗn hợp 3 loại đường này) vào thời điểm sau 2 tuần nuôi cấy đã kích thích sự tăng sinh nhưng không kích thích sự sinh tổng hợp paclitaxel.

**TỪ KHÓA:** cây thông đỏ, thông đỏ Lâm Đồng, *Taxus wallichiana* Zucc., dịch treo tế bào, paclitaxel.

## MỞ ĐẦU

Hợp chất paclitaxel có hoạt tính chống ung thư được chiết xuất lần đầu tiên từ vỏ cây thông đỏ vào năm 1969. Năm 1992, Taxol<sup>®</sup> với hoạt chất chính là paclitaxel đã được tổ chức FDA “Food and Drug Administration” chính thức công nhận là loại thuốc chữa bệnh ung thư buồng trứng và ung thư vú hiệu quả nhất [30]. Công ty Bristol Myers Squibb phát triển các loại thuốc này và đăng ký dưới tên Taxol<sup>®</sup>.

Paclitaxel có ở các bộ phận thuộc cây thông đỏ, đặc biệt là ở vỏ cây, lá và lõi thân cây *Taxus brevifolia* [27]. Tuy nhiên, việc chiết tách hợp chất này rất khó khăn, hiệu suất thấp và tốn kém. Trong các loài *Taxus*, hàm lượng paclitaxel trong vỏ thân cây *Taxus brevifolia* cao nhất nhưng hợp chất này chỉ chiếm 0,01 – 0,07 % trọng lượng vỏ cây. Hơn nữa, vỏ cây rất mỏng (khoảng 3 mm) và đây lại là loại cây phát triển rất chậm. Việc khai thác vỏ cây thuộc nhóm này gặp nhiều hạn chế do cây sẽ bị chết sau khi thu hoạch vỏ.

Bốn phương pháp được các nhà khoa học đưa ra để thu nhận paclitaxel nhằm hạn chế việc khai thác thông đỏ một cách ô ạt: (1) tổng hợp hóa học, (2) bán tổng hợp từ 10-deacetyl baccatin III, (3) sản xuất paclitaxel từ vi nấm và (4) nuôi cấy tế bào *Taxus*, trong đó phương pháp nuôi cấy tế bào *Taxus* được xem là ổn định nhất và hiệu quả nhất để sản xuất paclitaxel [20]. Ngày càng có nhiều phòng thí nghiệm

ngiên cứu thu nhận paclitaxel bằng phương pháp nuôi cấy tế bào *Taxus* và đã đạt được một số kết quả đáng kể. Hiện nay, Python Biotech là nhà sản xuất paclitaxel lớn nhất, đã sử dụng bể lên men quy mô lớn với dung tích lên đến 75.000 lít để nuôi cấy tế bào *Taxus*. Một công ty khác, Samyang Genex, sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào *Taxus* để sản xuất paclitaxel với tên thương hiệu là Genexol<sup>®</sup> [31].

Việt Nam có 2 loài thông đỏ là thông đỏ trung quốc *Taxus chinensis* và thông đỏ Himalaya *Taxus wallichiana* trong đó loài *Taxus wallichiana* đã được chứng minh trong lá và thân có chứa hợp chất paclitaxel và 10-deacetyl baccatin-III (10-DAB) – tiền chất có thể chuyển hóa thành paclitaxel. Cùng với xu hướng của thế giới, các nhà khoa học tại Việt Nam đã bắt tay vào nghiên cứu thông đỏ và đã có một số kết quả về nhân giống vô tính, tạo và tăng sinh mô sẹo cũng như nghiên cứu về dịch treo tế bào thông đỏ [2],[3],[6],[8],[9]. Hai vấn đề lớn cần phải giải quyết để sử dụng dịch treo tế bào thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc. trong mục đích sản xuất thuốc điều trị ung thư tại Việt Nam là phải có biện pháp tăng mạnh sinh khối và tăng hàm lượng paclitaxel trong sinh khối.

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Tạo mô sẹo

Khúc cắt thân non 3-4 tuần tuổi từ cây thông đỏ 1 năm tuổi có chiều dài 1 cm sau khi được khử trùng với hypochlorid canxi 5%, cồn 70° và HgCl<sub>2</sub> 0,5% được cấy trên môi trường tạo sẹo: môi trường B5 [17] bổ sung 2,4-D 4 mg/l + kinetin 1 mg/l [8] và AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l. Mẫu được cấy chuyển sau mỗi 15 ngày. Sự nuôi cấy được thực hiện trong tối, ở 25±1°C.

### Nuôi cấy dịch treo tế bào

Mô sẹo 5 tháng tuổi (sau 10 lần cấy chuyển) được chuyển vào 10 ml môi trường lỏng B5 với saccharose 20 g/l; 2,4-D 0,1 mg/l + 6-BA 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l và AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l. Hệ thống tế bào được đặt trên máy lắc vòng trong điều kiện tối ở nhiệt độ 25±1°C và ẩm độ 60 – 65 %.

### *Khảo sát ảnh hưởng của trọng lượng tế bào khởi đầu lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào*

Mô sẹo 5 tháng tuổi với trọng lượng tươi từ 0,5 gram đến 2 gram được nuôi cấy trong erlen 50 ml chứa 10 ml môi trường lỏng (môi trường B5 bổ sung saccharose 20 g/l; 2,4-D 0,1 mg/l + 6-BA 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l, AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l). Hệ thống tế bào được nuôi cấy ở 25±1°C, trong tối và được lắc liên tục (110 vòng/phút). Sự tăng sinh của dịch treo tế bào sau 3 tuần nuôi cấy được đánh giá bởi chỉ số tăng trưởng.

### *Khảo sát ảnh hưởng của vận tốc lắc đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào*

Mô sẹo 5 tháng tuổi có trọng lượng tươi 1 gram được đặt trong erlen 50 ml chứa 10 ml môi trường lỏng (môi trường B5 bổ sung saccharose 20 g/l; 2,4-D 0,1 mg/l + 6-BA 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l, AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l). Hệ thống tế bào được nuôi cấy ở 25±1°C, trong tối và được lắc liên tục với vận tốc lắc thay đổi (60, 85, 110 và 135 vòng/phút). Sự tăng sinh của dịch treo tế bào sau 3 tuần nuôi cấy được đánh giá bởi chỉ số tăng trưởng.

### *Khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào thông đỏ*

Mô sẹo 5 tháng tuổi có trọng lượng tươi 1 gram được đặt trong erlen 50 ml chứa 10 ml môi trường lỏng (môi trường B5 bổ sung 2,4-D 0,1 mg/l + 6-BA 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l, AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l). Các loại đường sử dụng trong nuôi cấy dịch treo tế bào gồm saccharose 20 g/l kết hợp với glucose (0 – 10 g/l) và fructose (0 – 10 g/l). Hệ thống tế bào được nuôi cấy ở 25±1°C, trong tối và được lắc liên tục với vận tốc lắc 60 vòng/phút. Sự tăng sinh của dịch treo tế bào sau 3 tuần nuôi cấy được đánh giá bởi chỉ số tăng trưởng.

#### ***Khảo sát ảnh hưởng của tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào***

Mô sẹo 5 tháng tuổi có trọng lượng tươi 1 gram được đặt trong erlen 50 ml chứa 10 ml môi trường lỏng (môi trường B5 bổ sung saccharose 20 g/l + glucose 5 g/l + fructose 5 g/l, AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l) với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật gồm picloram (0 – 1 mg/l) kết hợp với kinetin (0 – 0,2 mg/l) và NAA (0 – 0,5 mg/l). Hệ thống tế bào được nuôi cấy ở 25±1°C, trong tối và được lắc liên tục với vận tốc lắc 60 vòng/phút. Sự tăng sinh của dịch treo tế bào sau 3 tuần nuôi cấy được đánh giá bởi chỉ số tăng trưởng.

#### ***Khảo sát sự sinh trưởng và tích lũy paclitaxel của dịch treo tế bào thông đở bởi sự phối hợp các tác nhân chọn lọc***

Mô sẹo 5 tháng tuổi có trọng lượng tươi 1 gram được đặt trong erlen 50 ml chứa 10 ml môi trường lỏng (môi trường B5 bổ sung saccharose 20 g/l + glucose 5 g/l + fructose 5 g/l, picloram 1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + NAA 0,5 mg/l, AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l). Hệ thống tế bào được nuôi cấy ở 25±1°C, trong tối và được lắc liên tục với vận tốc lắc 60 vòng/phút. Sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần nuôi cấy, tiến hành theo dõi các chỉ tiêu: chỉ số tăng trưởng của dịch treo tế bào, hàm lượng đường tổng trong tế bào và trong môi trường lỏng, cường độ hô hấp của tế bào, hoạt tính các chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh của tế bào, sự tích lũy paclitaxel trong tế bào và trong môi trường lỏng.

#### ***Khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy đến sự tăng trưởng và tích lũy paclitaxel của tế bào thông đở***

Mô sẹo 5 tháng tuổi có trọng lượng tươi 1 gram được đặt trong erlen 50 ml chứa 10 ml môi trường lỏng (môi trường B5 bổ sung saccharose 20 g/l + glucose 5 g/l + fructose 5 g/l, picloram 1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + NAA 0,5 mg/l, AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l). Hệ thống tế bào được nuôi cấy ở 25±1°C, trong tối và được lắc liên tục với vận tốc lắc 60 vòng/phút. Sau 2 tuần nuôi cấy, môi trường được bổ sung đường saccharose (200 mg/l), glucose (200 mg/l) hoặc fructose (200 mg/l) hoặc hỗn hợp đường (saccharose 134 mg/l, glucose 33 mg/l, fructose 33 mg/l). Sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần bổ sung đường, tiến hành theo dõi các chỉ tiêu: chỉ số tăng trưởng của dịch treo tế bào, cường độ hô hấp của tế bào dịch treo, sự tích lũy paclitaxel trong tế bào.

#### **Quan sát tế bào**

Tế bào thông đở được quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần nhằm xác định hình dạng và đặc tính của tế bào.  
Chuẩn bị tiêu bản: đặt 0,1 ml dịch treo tế bào lên lame cùng với 1 giọt I<sub>2</sub>KI. Để yên trong 30 phút trước khi quan sát dưới kính hiển vi.

### **Xác định thể tích tế bào lắng (SCV, Settle cell volume)**

Sự tăng sinh của dịch treo tế bào được xác định theo thể tích tế bào lắng (SCV, Settle cell volume) sau khi để yên 15 phút (O'Looney và Fry, 2005). Chỉ số tăng trưởng của dịch treo tế bào được tính theo Chen và cs (2003) [10]: Chỉ số tăng trưởng = (SCV sau – SCV đầu)/SCV đầu.

### **Xác định cường độ hô hấp của tế bào**

Cường độ hô hấp của dịch treo tế bào theo thời gian nuôi cấy được xác định bằng phương pháp áp kế Warburg ở 25°C, trong tối. 0,5 g tế bào thông đỏ được đặt trong bình Warburg có chứa 2,0 ml môi trường nuôi cấy dịch treo tương ứng. Cường độ hô hấp được thể hiện bởi lượng O<sub>2</sub> được tế bào hấp thu (μl/g trọng lượng tươi/giờ).

### **Xác định hàm lượng đường**

Hàm lượng đường trong tế bào hoặc trong môi trường nuôi cấy tế bào được trích ly bằng ethanol, thực hiện phản ứng màu bằng phenol 5% với sự hiện diện của H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc. Xác định cường độ màu trong quang phổ kế ở 490 nm [1].

### **Xác định hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong tế bào**

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật: auxin (AIA), cytokinin (zeatin), gibberellin (GA<sub>3</sub>) và acid abscisic trong tế bào mô sẹo hoặc trong tế bào dịch treo sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần nuôi cấy được ly trích và cô lập bằng cách dùng các dung môi thích hợp. Sự xác định vị trí auxin, cytokinin, gibberellin và acid abscisic được thực hiện bằng phương pháp sắc ký trên bản mỏng tráng sẵn silicagel 60 F254 (mã số 1.05554, Merck), ở nhiệt độ 30°C, với dung môi di chuyển được isopropanol: amon hydroxyd: nước = 10:1:1 theo thể tích. Vị trí của các hormon tăng trưởng thực vật trên bản sắc ký được phát hiện nhờ quan sát trực tiếp dưới tia UV. Hoạt tính các chất điều hòa sinh trưởng thực vật được ước lượng dựa trên các sinh trắc nghiệm: diệp tiêu lúa (*Oryza sativa* L.) cho auxin và acid abscisic, tử diệp dưa chuột (*Cucumis sativus* L.) cho cytokinin và cây mầm xà lách (*Lactuca sativa* L.) cho gibberellin [12],[23].

### **Xác định hàm lượng paclitaxel**

Hàm lượng paclitaxel có trong dịch treo tế bào được xác định bằng máy sắc ký lỏng cao áp (HPLC) sử dụng đầu dò UV, chất chuẩn là taxol 99% của hãng Sigma – Mỹ. Điều kiện chạy HPLC: Cột C18; thành phần pha động: methanol 65% + nước 35%; pha nước chứa 0,01% triethylamine, dùng acid clohydric chỉnh tới pH 4; tốc độ dòng: 0,5 ml/phút. Bước sóng: 227 nm.

### **Xử lý số liệu**

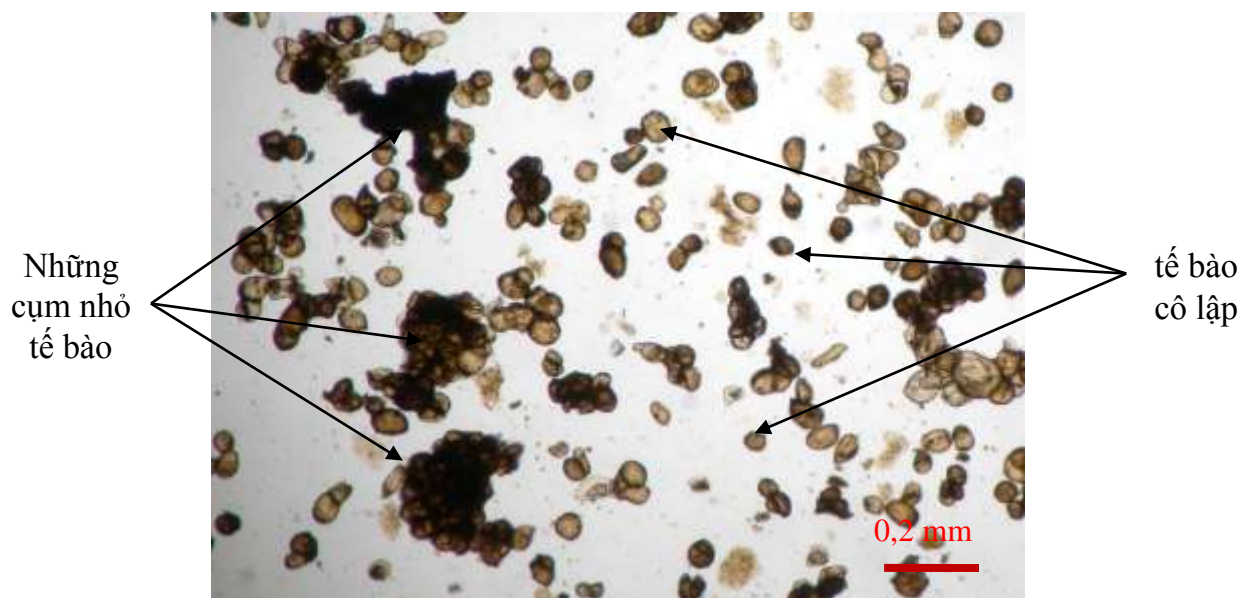
Các số liệu ghi nhận được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (One way anova) và phép thử Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 0,05 (xử lý thống kê bằng phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS) phiên bản 11.5 dành cho Window). Sự sai biệt có ý nghĩa ở mức p = 0,05 (p: probability) của các giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau kèm theo sau số trung bình và sai số chuẩn.

## **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Mô sẹo 5 tháng tuổi trên môi trường B5 bổ sung saccharose 20 g/l; 2,4-D 0,1 mg/l + 6-BA 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l và AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l được cấy chuyển sang môi trường lỏng có thành phần tương tự như môi trường tạo sẹo. Hệ thống tế bào

được duy trì trên máy lắc tròn trong điều kiện tối, nhiệt độ  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , ẩm độ 60 - 65%.

Sự phóng thích các tế bào đơn và các nhóm nhỏ tế bào từ mô sẹo có nguồn gốc từ thân vào môi trường lỏng được thấy rõ sau 7 - 14 ngày nuôi cấy. Dịch treo tế bào có màu nâu nhạt, kích thước các cụm tế bào không đều nhau (ảnh 3.1).



**Ảnh 1.** Dịch treo tế bào gồm các tế bào cô lập và những cụm nhỏ tế bào hình thành sau 2 tuần nuôi cấy dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x4.

### **Ảnh hưởng của trọng lượng tế bào khởi đầu lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào**

Trọng lượng tế bào khởi đầu (mật độ tế bào khởi đầu) ảnh hưởng quan trọng đến sự tăng trưởng của tế bào thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc. Sau 3 tuần nuôi cấy, sự tăng trưởng của dịch treo tế bào (được đánh giá qua chỉ số tăng trưởng) thay đổi tùy theo trọng lượng tế bào khởi đầu. Ở nghiệm thức 2 và 3 (với trọng lượng tế bào khởi đầu lần lượt 1 và 1,5 g), sự tăng trưởng của dịch treo tế bào cao hơn các nghiệm thức còn lại. Chỉ số tăng trưởng của dịch treo tế bào cao nhất ở nghiệm thức 2 với trọng lượng tế bào khởi đầu là 1 g (bảng 1).

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của trọng lượng tế bào khởi đầu lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào thông đỏ sau 3 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Thể tích môi trường (ml)	Chỉ số tăng trưởng
0,5 g tế bào khởi đầu	10	$0,02 \pm 0,03^b$
1,0 g tế bào khởi đầu	10	$0,24 \pm 0,03^a$
1,5 g tế bào khởi đầu	10	$0,17 \pm 0,05^a$
2,0 g tế bào khởi đầu	10	$0,00 \pm 0,00^b$

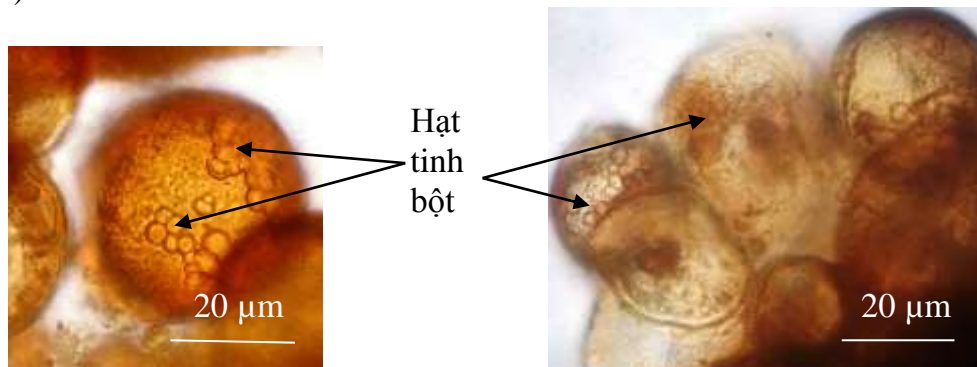
Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Quan sát tế bào thông đỏ sau 2 tuần nuôi cấy dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 và x100 chúng tôi ghi nhận được sự phân chia của tế bào dịch treo thể hiện qua sự hình thành vách ngăn ngang giữa tế bào. Tế bào dịch treo màu nâu nhạt đến đậm, kích thước thay đổi, vách mỏng với các hạt tinh bột rải rác trong nguyên sinh chất (ảnh 3).



**Ảnh 3.** Tế bào dịch treo sau 2 tuần nuôi cấy. Dấu mũi tên ( → ) chỉ vị trí thành lập vách ngăn ngang

Sau 3 tuần nuôi cấy, tế bào chuyển dần từ màu vàng sáng sang màu nâu đậm, vách mỏng, kích thước không đều nhau, hạt tinh bột có kích thước lớn. Sự hình thành vách ngăn ngang giữa các tế bào không phổ biến như ở tuần thứ 2 của quá trình nuôi cấy (ảnh 4).



**Ảnh 4.** Tế bào thông đỏ sau 3 tuần nuôi cấy

Trong nghiên cứu của chúng tôi, trọng lượng tế bào ban đầu thích hợp cho sự tăng sinh của dịch treo tế bào là 1 và 1,5 g tế bào tươi/10 ml môi trường. Kết quả này cũng phù hợp với Fornale và cs. (2002) [16] khi sử dụng 1 g mô sẹ *Taxus baccata* L. với 10 ml môi trường lỏng trong bình tam giác 100 ml để tạo dịch treo tế bào. Với trọng lượng tế bào ban đầu thấp hơn hoặc cao hơn, sự tăng sinh diễn ra chậm hơn. Trong môi trường lỏng, mô sẹ sẽ phóng thích ra những tế bào riêng lẻ hoặc cụm tế bào gồm vài chục đến vài trăm tế bào làm tăng diện tích hấp thu các chất dinh dưỡng từ môi trường nuôi cấy. Mật độ tế bào ban đầu thấp sẽ dẫn đến sự thiếu tác động

tương hỗ giữa các tế bào, trường hợp ngược lại sẽ là nguyên nhân dẫn đến sự cạnh tranh mạnh mẽ nguồn dinh dưỡng của tế bào [18].

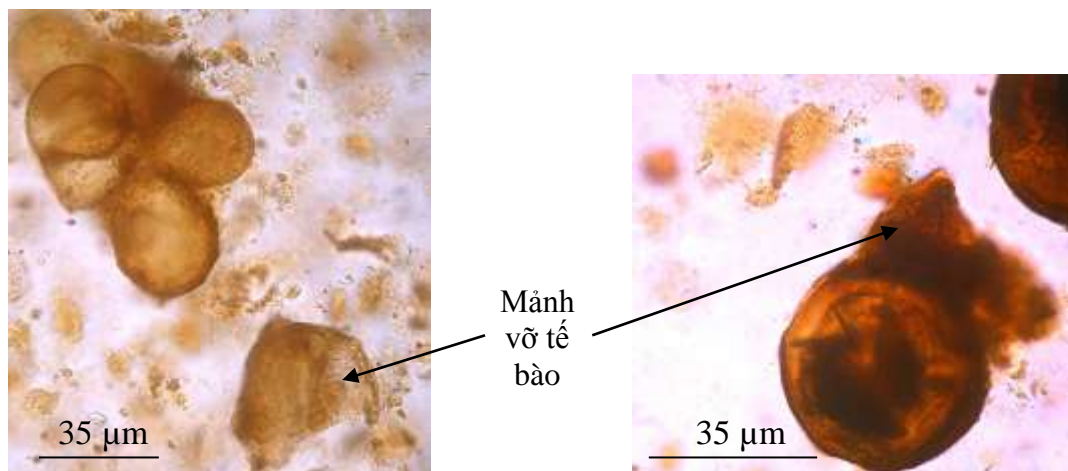
### ***Ảnh hưởng của vận tốc lắc đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào***

Động tác lắc tròn cần thiết cho sự trao đổi chất và tăng sinh của tế bào. Sự tăng tốc độ lắc làm giảm mạnh sự tăng trưởng của dịch treo tế bào (chỉ số tăng trưởng là 0,02 với tốc độ lắc 135 vòng/phút) (bảng 2), đồng thời với sự xuất hiện những mảnh vỡ tế bào trong môi trường nuôi cấy (ảnh 5). Tốc độ lắc ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng sinh của dịch treo tế bào. Tốc độ lắc càng cao, dịch treo tế bào càng mịn.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của vận tốc lắc lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào

Nghiệm thức	Chỉ số tăng trưởng
Vận tốc lắc 60 vòng/phút	$0,22 \pm 0,03^a$
Vận tốc lắc 85 vòng/phút	$0,18 \pm 0,02^a$
Vận tốc lắc 110 vòng/phút	$0,14 \pm 0,02^a$
Vận tốc lắc 135 vòng/phút	$0,02 \pm 0,04^b$

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



**Ảnh 5.** Tế bào dịch treo với tốc độ lắc 135 vòng/phút

Hoạt động lắc tròn của máy lắc giúp cho sự trao đổi khí giữa môi trường và tế bào diễn ra thuận lợi, dẫn đến sự tăng trưởng và phân chia bình thường của tế bào. Tốc độ lắc từ 30 đến 200 vòng/phút được lựa chọn căn cứ vào thể tích môi trường nuôi, kích thước và hình dạng của bình nuôi hoặc vật liệu tạo dịch treo tế bào. Đối với dịch treo *Taxus wallichiana* Zucc., vận tốc lắc thích hợp cho sự tăng sinh của tế bào từ 60 đến 110 vòng/phút. Vận tốc lắc 135 vòng/phút tỏ ra không phù hợp với sự tăng sinh của dịch treo tế bào. Khi quan sát dịch treo tế bào được nuôi cấy với vận tốc lắc 135 vòng/phút dưới kính hiển vi, nhiều tế bào bị phá vỡ do sự va chạm tế bào/cụm tế bào với nhau hoặc với thành bình tam giác, làm cho nội dung tế bào thoát ra ngoài môi trường và tế bào chết, từ đó ảnh hưởng nghiêm trọng đến quá trình tăng trưởng và phát triển của quần thể tế bào trong dịch treo (ảnh 5). Có thể thấy việc sử dụng vận

tốc lắc cao để nuôi cấy dịch treo tế bào *Taxus wallichiana* Zucc. ít được ủng hộ. Lê Thị Thủy Tiên và cs.(2006) [9] đã áp dụng vận tốc lắc 80 vòng/phút cho tất cả các nghiên cứu trên dịch treo tế bào *Taxus wallichiana* Zucc., Dương Tấn Nhựt và cs. (2007) [6] lại áp dụng vận tốc 110 vòng/phút để nuôi cấy dịch treo tế bào *Taxus wallichiana* Zucc. làm nguyên liệu cho thí nghiệm tái sinh mô sẹo. Với các đối tượng thông đỏ khác, các tác giả sử dụng các vận tốc lắc khác nhau. Ví dụ với *Taxus baccata*, Cusidó và cs. (1999), Fornale và cs. (2002) đã áp dụng vận tốc lắc 100 vòng/phút để duy trì dịch treo tế bào. Tương tự, Yuan và cs (2002) đã áp dụng vận tốc lắc 100 vòng/phút để nuôi cấy dịch treo tế bào *Taxus chinensis* var. *mairei*. Trong khi đó, Pestchanker và cs. (1996) đã nuôi cấy dịch treo *Taxus cuspidata* trong bình tam giác 250 ml chứa 50 ml dịch treo với vận tốc lắc 120 vòng/phút. Kim và cs. (2001), Lee và cs. (2010) nuôi cấy dịch treo *Taxus chinensis* ở vận tốc lắc 150 vòng/phút trong khi Dong và Zhong (2002) lại nuôi cấy dịch treo tế bào loài thông đỏ này ở vận tốc lắc 110 vòng/phút. Như vậy có thể thấy rằng tế bào của các loài thông đỏ khác nhau thích hợp với một vận tốc lắc khác nhau khi được nuôi trong môi trường lỏng.

### ***Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào thông đỏ***

Việc kết hợp các loại đường khác nhau với nồng độ thay đổi ảnh hưởng mạnh lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào. Sau 3 tuần nuôi cấy dịch treo tế bào với loại và nồng độ đường khác nhau, chỉ số tăng trưởng của dịch treo tế bào ở các nghiệm thức có sự kết hợp giữa saccharose 20 g/l với glucose 5 g/l và fructose 5 hay 10 g/l cao hơn nghiệm thức chỉ bổ sung saccharose 20 g/l cũng như tất cả những nghiệm thức còn lại và sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên, việc bổ sung glucose 10 g/l kết hợp với fructose 5 - 10 g/l lại làm giảm sự tăng trưởng của dịch treo tế bào (bảng 3).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào thông đỏ

Nghiệm thức	Chỉ số tăng trưởng
Saccharose 20 g/l+ glucose 0 g/l + fructose 0 g/l	0,05 ± 0,02 <sup>b</sup>
Saccharose 20 g/l + glucose 5 g/l + fructose 5 g/l	<b>0,27 ± 0,04<sup>a</sup></b>
Saccharose 20 g/l + glucose 5 g/l + fructose 10 g/l	<b>0,27 ± 0,02<sup>a</sup></b>
Saccharose 20 g/l + glucose 10 g/l + fructose 5 g/l	0,02 ± 0,02 <sup>b</sup>
Saccharose 20 g/l + glucose 10 g/l + fructose 10 g/l	0,01 ± 0,01 <sup>b</sup>

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



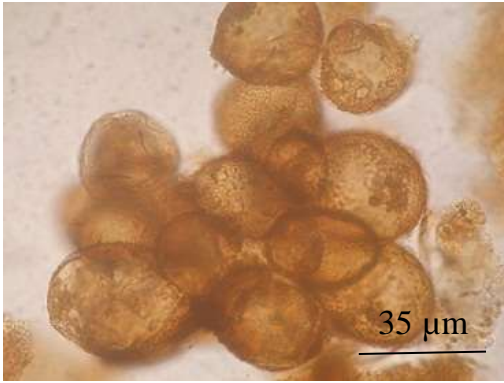
Về mặt cơ bản, sự gia tăng nồng độ đường trong môi trường nuôi cấy có hai tác động khác nhau đến tế bào thực vật: tác động thứ nhất là làm thay đổi áp suất thẩm thấu của môi trường bên ngoài tế bào, tác động thứ hai là cung cấp nguồn carbohydrate sẵn sàng cho các hoạt động sống của tế bào [21]. Thông thường, các tác giả sử dụng saccharose để nuôi cấy dịch treo tế bào và mỗi đối tượng thực vật khác nhau thích hợp với một nồng độ saccharose khác nhau. Với Dừa cạn (*Catharanthus roseus*), dịch treo tế bào phát triển tốt ở môi trường bổ sung saccharose 60 g/l [4]; với Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L. Hams), dịch treo tế bào phát triển tốt ở môi trường bổ sung saccharose 25 g/l [5]; với Râu mèo (*Orthosiphon Stamineus* Benth), dịch treo tế bào phát triển tốt ở môi trường bổ sung saccharose 30 g/l [11]. Đối với thông đỏ *Taxus chinensis*, Kim và cs. (2001) [21] kết luận là dịch treo tế bào chậm tăng trưởng khi bổ sung saccharose với nồng độ lớn hơn 30 g/l.

Saccharose là đường đôi được tạo thành bởi sự kết hợp giữa glucose và fructose qua liên kết -OH glycoside. Trong tế bào, saccharose có vai trò cung cấp nhiên liệu cho sự hô hấp của tế bào hoặc cho sự tổng hợp tinh bột dự trữ. Ngoài saccharose, glucose là một đường đơn quan trọng đối với tế bào. Sự hô hấp của tế bào bắt đầu từ glucose. Glucose cũng tham gia vào sự tổng hợp tinh bột. Bên cạnh glucose, fructose cũng là một đường đơn hiện diện trong tế bào và là thành phần tạo nên đường đôi saccharose.

Trong thí nghiệm này, việc bổ sung vào môi trường nuôi cấy dịch treo tế bào hỗn hợp đường gồm 20 g/l saccharose, 5 g/l glucose và 5 g/l fructose đã kích thích sự gia tăng thể tích tế bào lắng tốt nhất sau 3 tuần nuôi cấy (bảng 3). Việc sử dụng một loại đường riêng lẻ (saccharose 20 g/l) ít có hiệu quả trong sự tăng sinh của dịch treo tế bào so với khi sử dụng các loại đường phối hợp với nhau. Tuy nhiên, hàm lượng đường tổng số trong môi trường cao hơn 35 g/l lại làm giảm sự tăng sinh của dịch treo tế bào (bảng 3). Hàm lượng đường cao làm tăng áp suất thẩm thấu của môi trường gây ra trạng thái co nguyên sinh của tế bào, dẫn đến sự chậm tăng trưởng của tế bào. Theo [Palazón](#) và cs. (2003), mô sẹo *T. baccata* được nuôi cấy trong đĩa petri chứa 24 ml môi trường B5 bổ sung 0,5% saccharose (tương đương 5 g/lít); 0,5% fructose (tương đương 5 g/l), NAA 2 mg/l và 6-BA 0,1 mg/l đã tăng trưởng tốt nhất trong số 24 nghiệm thức khảo sát, trọng lượng tươi đạt 1,01 g sau 28 ngày nuôi cấy từ 0,3 g mô sẹo ban đầu. Như vậy, việc kết hợp nhiều loại đường trong môi trường nuôi cấy đã kích thích sự tăng sinh của tế bào thông đỏ.

Tế bào thông đỏ quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 sau 3 tuần nuôi cấy được thể hiện qua ảnh 6.

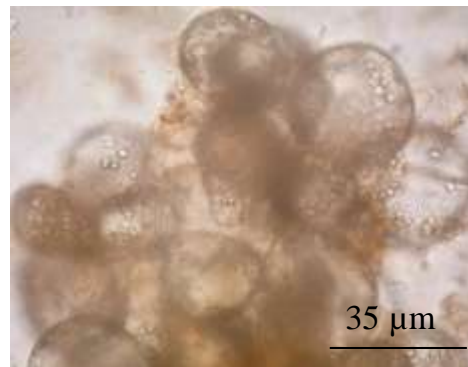
Qua ảnh 6 có thể nhận thấy tế bào dịch treo trong tất cả các nghiệm thức đều có vách mỏng, kích thước không đều nhau. Sự tích lũy tinh bột của tế bào trong từng nghiệm thức cũng khác nhau: tế bào trong các nghiệm thức bổ sung saccharose 20 g/l, glucose 5 g/l và fructose 5 - 10 g/l chứa tinh bột nhiều hơn các nghiệm thức còn lại.



Saccharose 20 g/l



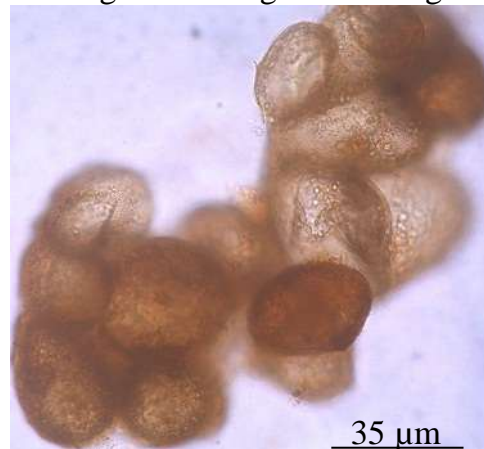
Sac 20 g/l + Glu 5 g/l + Fru 5 g/l



Sac 20 g/l + Glu 5 g/l + Fru 10g/l



Sac 20 g/l + Glu 10 g/l + Fru5 g/l



Sac 20 g/l + Glu 10 g/l + Fru10 g/l

**Ảnh 6.** Tế bào dịch treo *Taxus wallichiana* Zucc. sau 3 tuần nuôi cấy trong môi trường có loại và nồng độ đường khác nhau

***Ảnh hưởng của tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào***

Bên cạnh các yếu tố trọng lượng tế bào khởi đầu, vận tốc lắng, loại và hàm lượng đường trong môi trường nuôi cấy..., chất điều hòa sinh trưởng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào. Sự thay thế tổ hợp 2,4-D, NAA và 6-BA bởi tổ hợp picloram, kinetin và NAA được thực hiện nhằm cải thiện sự tăng trưởng của dịch treo tế bào. Sự phối hợp giữa picloram 1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + NAA 0,5 mg/l tỏ ra có hiệu quả cao nhất trong mục đích kích thích sự tăng trưởng của dịch treo tế bào (chỉ số tăng trưởng 0,84) và sự khác biệt có

ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào thấp khi không có sự hiện diện của NAA hoặc có sự hiện diện của NAA nhưng lại không có kinetin trong môi trường nuôi cấy (bảng 4).

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào sau 3 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Chỉ số tăng trưởng
Đối chứng (NAA 0,5 mg/l + 2,4 D 0,1 mg/l + 6-BA 0,5 mg/l)	0,20 ± 0,03 <sup>c</sup>
Picloram 1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l	0,26 ± 0,05 <sup>c</sup>
Picloram 1 mg/l + kinetin 0,2 mg/l	0,50 ± 0,03 <sup>b</sup>
Picloram 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l	0,27 ± 0,09 <sup>c</sup>
Picloram 1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + NAA 0,5 mg/l	<b>0,84 ± 0,02<sup>a</sup></b>
Picloram 1 mg/l + kinetin 0,2 mg/l + NAA 0,5 mg/l	0,43 ± 0,04 <sup>b</sup>

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

Ngoài đường là nguồn cung cấp carbon, các chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong môi trường nuôi cấy, đặc biệt là auxin, đã kích thích sự phân chia tế bào dẫn đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào. Auxin ngoại sinh có vai trò quan trọng trong quá trình tăng trưởng của dịch treo tế bào. Tuy nhiên, nhu cầu về thành phần và nồng độ của auxin và cytokinin cũng như tỉ lệ giữa auxin và cytokinin phụ thuộc vào từng đối tượng nuôi cấy. Đối với thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc., khi sử dụng picloram 1 mg/l kết hợp với kinetin 0,1 mg/l và NAA 0,5 mg/l đã kích thích sự gia tăng thể tích tế bào lắng hơn gấp 2 lần so với khi sử dụng tổ hợp 2,4-D 0,1 mg/l + BA 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l sau 3 tuần nuôi cấy (bảng 4). Như vậy, dịch treo tế bào *Taxus wallichiana* Zucc. tăng sinh tốt khi có sự hiện diện của picloram trong môi trường nuôi cấy và tỉ lệ giữa auxin và cytokinin cao sẽ kích thích sự tăng sinh của tế bào thông đỏ tốt hơn tỉ lệ auxin và cytokinin thấp.

#### **Khảo sát sự sinh trưởng và tích lũy paclitaxel của dịch treo tế bào thông đỏ bởi sự phối hợp các tác nhân chọn lọc**

Khi kết hợp các yếu tố trọng lượng tế bào ban đầu (1 g/10 ml), vận tốc lắc (60 vòng/phút), môi trường khoáng và vitamin B5 kết hợp với saccharose 20 g/l + glucose 5 g/l + fructose 5 g/l; picloram 1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + NAA 0,5 mg/l, dịch treo tế bào tăng trưởng liên tục từ tuần thứ nhất đến tuần thứ ba rồi giảm vào tuần thứ tư. Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào thông đỏ ở mức cao nhất vào tuần thứ 3 của quá trình nuôi cấy với chỉ số tăng trưởng đạt 0,28 ± 0,03 (bảng 5). Sự gia tăng thể tích tế bào lắng từ tuần thứ nhất đến tuần thứ 3 tương ứng với sự giảm hàm lượng đường tổng số trong môi trường nuôi cấy (hàm lượng đường tổng số trong môi trường ban đầu là 20,04 mg/ml, sau đó giảm dần theo sự kéo dài thời gian nuôi cấy, còn 13,61 mg/ml ở tuần thứ ba và 10,90 mg/ml ở tuần thứ tư) (bảng 6). Khi hàm lượng đường trong môi trường giảm đến một mức độ nào đó, sự tăng trưởng của dịch

treo tế bào chậm lại, thậm chí không tăng trưởng do sự thiếu hụt nguồn cung cấp carbon cũng như sự suy giảm áp suất thẩm thấu của môi trường nuôi cấy. Khi đó, đổi mới môi trường là điều cần thiết để duy trì sự tăng trưởng của dịch treo tế bào.

**Bảng 5.** Sự tăng trưởng và tích lũy paclitaxel của dịch treo tế bào theo thời gian

Thời gian (tuần)	Chỉ số tăng trưởng	Hàm lượng paclitaxel	
		Tế bào ( $\mu\text{g/g}$ )	Môi trường ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	$0,12 \pm 0,03^b$	570	2,77
2	$0,25 \pm 0,04^a$	710	1,24
3	$0,28 \pm 0,03^a$	540	2,36
4	$0,24 \pm 0,02^a$	580	2,29

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

Phân tích hàm lượng đường tổng số trong tế bào theo thời gian nuôi cấy chúng tôi nhận thấy hàm lượng đường tổng số ban đầu là  $13,45 \text{ mg/g}$  tế bào (ở tuần 0) và giảm dần theo sự kéo dài thời gian nuôi cấy (bảng 6). Hàm lượng đường tổng số trong tế bào thấp nhất ( $1,57 \text{ mg/g}$  tế bào) ở tuần thứ 3 khi sự tăng sinh của dịch treo tế bào ở mức cao nhất (bảng 6). Kết quả này cho thấy đường đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp năng lượng và sừn carbon cho các phản ứng sinh tổng hợp các chất cần thiết cho hoạt động tăng trưởng và phân chia của tế bào.

**Bảng 6.** Sự biến thiên hàm lượng đường tổng số trong tế bào và trong môi trường nuôi cấy theo thời gian

Thời gian (tuần)	Hàm lượng đường tổng số	
	Trong tế bào ( $\text{mg/g}$ )	Trong môi trường ( $\text{mg/ml}$ )
0	$13,45 \pm 0,05^a$	$20,04 \pm 0,14^a$
1	$4,52 \pm 0,13^b$	$17,33 \pm 1,60^{ab}$
2	$3,25 \pm 0,13^c$	$14,96 \pm 0,23^{bc}$
3	$1,57 \pm 0,11^d$	$13,61 \pm 0,47^{cd}$
4	$1,71 \pm 0,14^d$	$10,90 \pm 0,94^d$

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

Ngoài việc phân tích hàm lượng đường tổng số, cường độ hô hấp của tế bào cũng được theo dõi trong suốt thời gian nuôi cấy. Kết quả ở bảng 7 cho thấy tế bào thông đỏ ban đầu có cường độ hô hấp  $30,87 \mu\text{l O}_2/\text{g/giờ}$ . Sau 1 tuần nuôi cấy, cường độ hô hấp của tế bào giảm còn  $13,84 \mu\text{l O}_2/\text{g/giờ}$ . Nguyên nhân có thể do sự chuyển tế bào đột ngột từ môi trường rắn qua môi trường lỏng đã làm cho tế bào chưa kịp thích ứng với môi trường mới, dẫn đến sự giảm các hoạt động chuyển hóa trong tế bào. Sau giai đoạn thích nghi, cường độ hô hấp của tế bào gia tăng tương ứng với sự tăng trưởng của tế bào (cường độ hô hấp của tế bào đạt  $44,25 \mu\text{l O}_2/\text{g/giờ}$  ở tuần thứ 2 của quá trình nuôi cấy và  $51,19 \mu\text{l O}_2/\text{g/giờ}$  ở tuần thứ ba) (bảng 7). Để chuẩn bị cho các hoạt động phân chia và kéo dài, tế bào phải tích lũy năng lượng và sừn carbon cần

thiết bằng cách gia tăng hoạt động hô hấp. Cường độ hô hấp cao nhất của tế bào thông đỏ ở tuần thứ 3, đây là thời điểm tương ứng với sự tăng trưởng mạnh nhất của dịch treo tế bào rồi giảm xuống sau đó. Hoạt động hô hấp của tế bào tạo năng lượng dưới dạng ATP nhờ sự sử dụng oxygen nhận được từ môi trường để phá vỡ các phân tử glucose có mặt trong tế bào (nguồn gốc từ saccharose trong môi trường nuôi cấy) hoặc từ sự phân hủy tinh bột dự trữ trong tế bào và tái sắp xếp lại các điện tử trong các cầu nối hóa học (Bùi Trang Việt, 2000). Chính vì vậy, lượng oxygen hòa tan trong môi trường nuôi cấy sẽ giảm dần theo thời gian, tỉ lệ nghịch với tốc độ tăng trưởng của dịch treo tế bào. Và khi nồng độ oxygen giảm thấp, sự lão suy và sự chết tế bào sẽ xảy ra.

**Bảng 7.** Cường độ hô hấp của tế bào thông đỏ theo thời gian nuôi cấy

Thời gian (tuần)	Cường độ hô hấp của tế bào ( $\mu\text{l O}_2/\text{g/giờ}$ )
0	$30,87 \pm 2,66^b$
1	$13,84 \pm 1,54^c$
2	$44,25 \pm 4,26^a$
3	$51,19 \pm 4,48^a$
4	$22,09 \pm 2,23^{bc}$

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

Quá trình hô hấp ngoài chức năng cung cấp năng lượng cho tế bào còn cung cấp các sản phẩm trung gian cho các con đường sinh tổng hợp khác nhau, trong đó có con đường sinh tổng hợp paclitaxel. Khi phân tích hàm lượng paclitaxel trong tế bào theo thời gian nuôi cấy, hàm lượng paclitaxel cao nhất ở tuần thứ 2 (709,35  $\mu\text{g/g}$ ) (bảng 5), lúc này cường độ hô hấp của tế bào rất cao (44,25  $\mu\text{l O}_2/\text{g/giờ}$ ) (bảng 7). Ngoài sự hiện diện trong tế bào, paclitaxel còn được tế bào phóng thích vào môi trường nuôi cấy. Hàm lượng paclitaxel trong môi trường nuôi cấy biến thiên trong suốt thời gian nuôi cấy, dao động từ 1,24 đến 2,77  $\mu\text{g/ml}$  (bảng 5).

Khi phân tích hàm lượng các chất điều hòa sinh trưởng nội sinh trong tế bào theo thời gian nuôi cấy chúng tôi nhận thấy hoạt tính của AIA và zeatin đều giảm trong khi hoạt tính của  $\text{GA}_3$  và acid abscisic lại tăng tại thời điểm sau 1 tuần nuôi cấy so với ban đầu (bảng 8). Điều này có thể là do khi thay đổi môi trường nuôi cấy từ rắn qua lỏng đã làm cho tế bào chưa kịp thích ứng với môi trường mới, dẫn đến các hoạt động tổng hợp các chất điều hòa sinh trưởng giảm. Ngược lại, hoạt tính acid abscisic nội sinh tăng, đây là nhóm chất điều hòa sinh trưởng thường được tế bào tăng cường tổng hợp trong điều kiện stress để đáp ứng với sự thay đổi của điều kiện môi trường.

Sau giai đoạn thích nghi, dịch treo tế bào đi vào giai đoạn tăng trưởng nhanh (thời điểm tuần thứ 2 và thứ 3 của quá trình nuôi cấy). Lúc này, hoạt tính các chất thuộc nhóm kích thích tăng trưởng (AIA, zeatin và gibberellin) đều tăng so với thời điểm sau 1 tuần nuôi cấy (bảng 8). Sự gia tăng hoạt tính các chất kích thích tăng trưởng

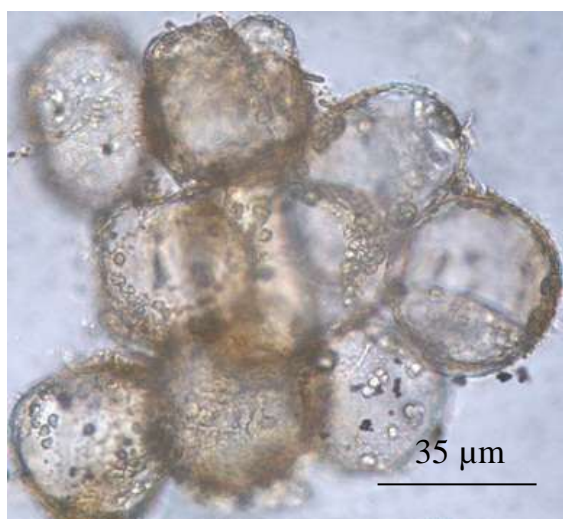
nhằm kích thích sự tăng sinh của tế bào dịch treo. Ở tuần thứ 4 của quá trình nuôi cấy, hoạt tính của acid abscisic ở mức cao (0,94 mg/l) (bảng 8) đã kìm hãm sự tăng trưởng của dịch treo tế bào, đưa tế bào đi vào giai đoạn lão suy và chết. Ngược lại, hoạt tính của các chất kích thích tăng trưởng (AIA, zeatin và gibberellin) đều giảm so với thời điểm 3 tuần, trong đó hoạt tính của AIA giảm mạnh nhất: từ 1,54 mg/l xuống còn 0,80 mg/l (bảng 8). Điều này cũng góp phần giải thích vì sao thể tích tế bào lắng tại thời điểm này không tăng mà có xu hướng giảm so với thời điểm 3 tuần (thời điểm thể tích tế bào lắng ở mức cao nhất).

**Bảng 8.** Hoạt tính các chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh trong tế bào thông đỏ

Thời gian (tuần)	Hoạt tính các chất điều hòa sinh trưởng thực vật tương đương (mg/l)			
	AIA	Zeatin	GA3	ABA
0	1,19 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,06 <sup>d</sup>	0,44 ± 0,04 <sup>c</sup>
1	0,50 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,51 ± 0,07 <sup>cd</sup>	0,64 ± 0,03 <sup>b</sup>
2	1,20 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,07 <sup>b</sup>
3	1,54 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,08 <sup>bc</sup>	0,71 ± 0,04 <sup>b</sup>
4	0,80 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,94 ± 0,06 <sup>a</sup>

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

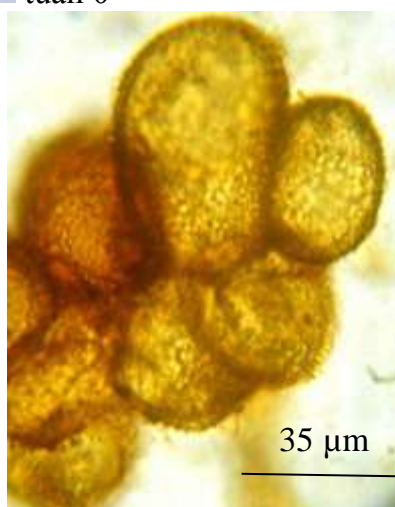
Dưới kính hiển vi quang học, chúng tôi ghi nhận sự tích lũy tinh bột trong tế bào giảm dần trong suốt thời gian nuôi cấy (ảnh 7). Ngoài nguồn carbon được cung cấp cho tế bào dưới dạng saccharose, glucose và fructose, tế bào còn sử dụng tinh bột dự trữ cho các hoạt động tăng sinh và tổng hợp paclitaxel.



tuần 0



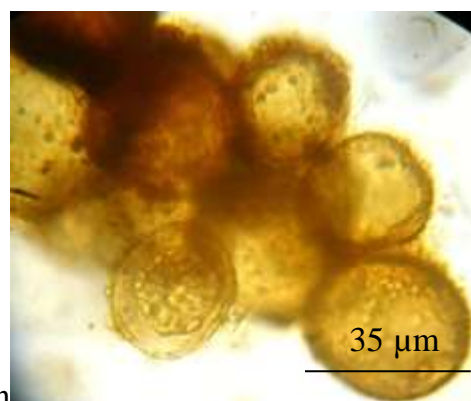
1 tuần



2 tuần



3 tuần



4 tuần

**Ảnh 7.** Tế bào dịch treo thông đỏ

**Khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy đến sự tăng trưởng và tích lũy paclitaxel của tế bào thông đỏ**

Dịch treo tế bào thông đỏ được duy trì trong môi trường nuôi cấy với sự hiện diện của saccharose 20 g/l, glucose 5 g/l, fructose 5 g/l. Sau 2 tuần nuôi cấy, môi trường được bổ sung 200 mg đường (tương đương với lượng đường trong môi trường bị giảm sau 2 tuần nuôi cấy). Kết quả sau 1 tuần bổ sung đường, thể tích tế bào lắng

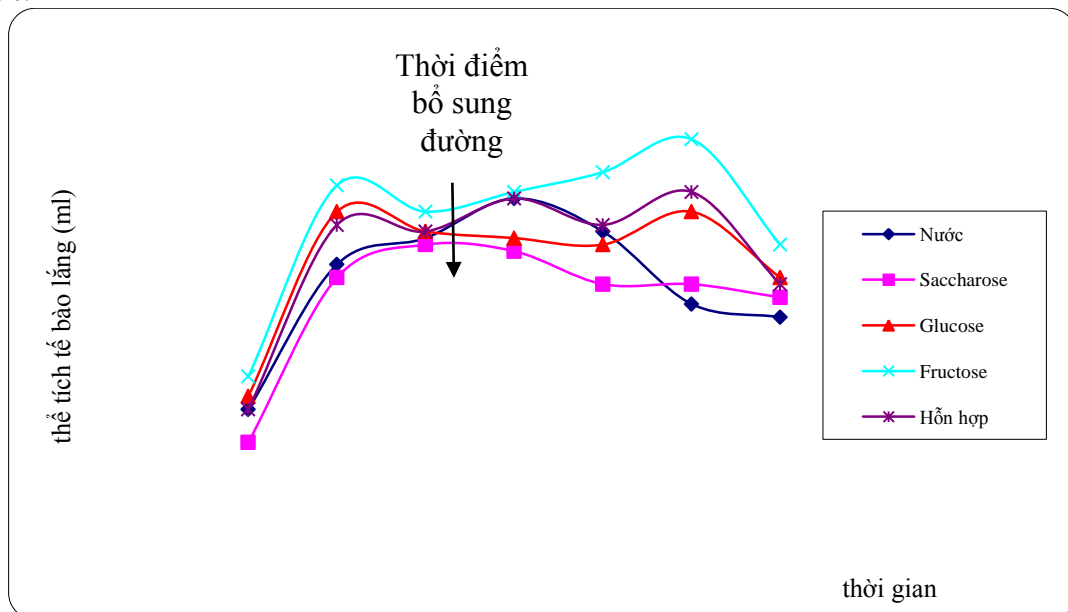
tiếp tục gia tăng ở tất cả các nghiệm thức trừ nghiệm thức bổ sung saccharose. Sự gia tăng thể tích tế bào lắng ở nghiệm thức bổ sung saccharose chỉ bắt đầu tăng từ tuần thứ 2 (hình 1). Như vậy, việc bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy đã kích thích sự tăng sinh đồng thời kéo dài giai đoạn tăng sinh của tế bào thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc. thêm 3 tuần so với khi không bổ sung (hình 1). Trong các loại đường khảo sát, fructose kích thích sự tăng sinh của tế bào thông đỏ tốt nhất. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Hirasuna và cs. (1996) khi nuôi cấy tế bào *T. baccata*: sự bổ sung fructose (1%) vào ngày nuôi cấy thứ 10 cải thiện đáng kể trọng lượng tươi của tế bào.

Ở tuần thứ 5, tức là 3 tuần sau khi bổ sung đường, chỉ số tăng trưởng của các nghiệm thức đều giảm so với thời điểm 4 tuần, trong đó nghiệm thức bổ sung nước cất có chỉ số tăng trưởng giảm nhiều nhất. Chỉ số tăng trưởng của dịch treo tế bào tiếp tục giảm khi kéo dài thời gian nuôi cấy (bảng 9).

**Bảng 9.** Chỉ số tăng trưởng của dịch treo tế bào thông đỏ theo thời gian khi được bổ sung đường vào môi trường tại thời điểm 2 tuần

Nghiệm thức	Chỉ số tăng trưởng			
	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6
BS nước cất	0,46 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,47 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>c</sup>
BS saccharose	0,40 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>
BS glucose	0,49 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>b</sup>
BS fructose	0,52 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>b</sup>
BS hỗn hợp S:G:F=4:1:1	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>b</sup>

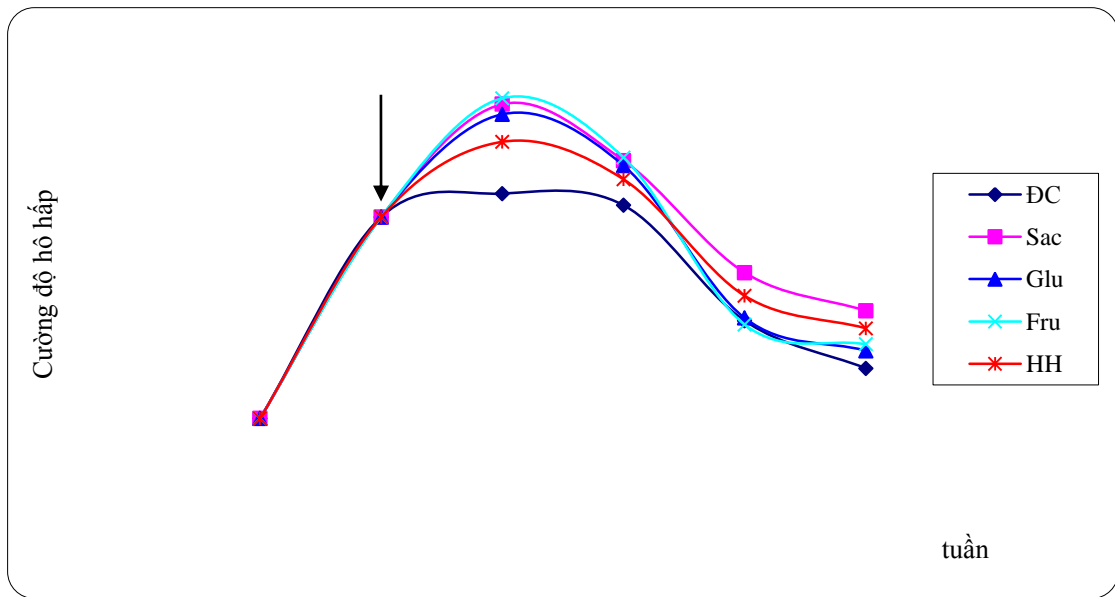
Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.



**Hình 1.** Đường cong sinh trưởng của tế bào thông đỏ có bổ sung đường sau 2 tuần nuôi cấy



Trong quá trình tăng trưởng của dịch treo tế bào, cường độ hô hấp của tế bào ở tuần thứ 3 của quá trình nuôi cấy (hay 1 tuần sau khi bổ sung đường) của hầu hết các nghiệm thức đều cao nhất rồi giảm dần ở các tuần kế tiếp. Riêng nghiệm thức bổ sung saccharose thì cường độ hô hấp của tế bào lại cao nhất sau 4 tuần (2 tuần bổ sung đường) và giảm dần ở các tuần kế tiếp (hình 2). Sự gia tăng hoạt động hô hấp của tế bào sau sự bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy chứng tỏ tế bào sử dụng hiệu quả lượng đường bổ sung để làm nguồn cung cấp năng lượng cũng như sừn carbon cho hoạt động phân chia của tế bào.



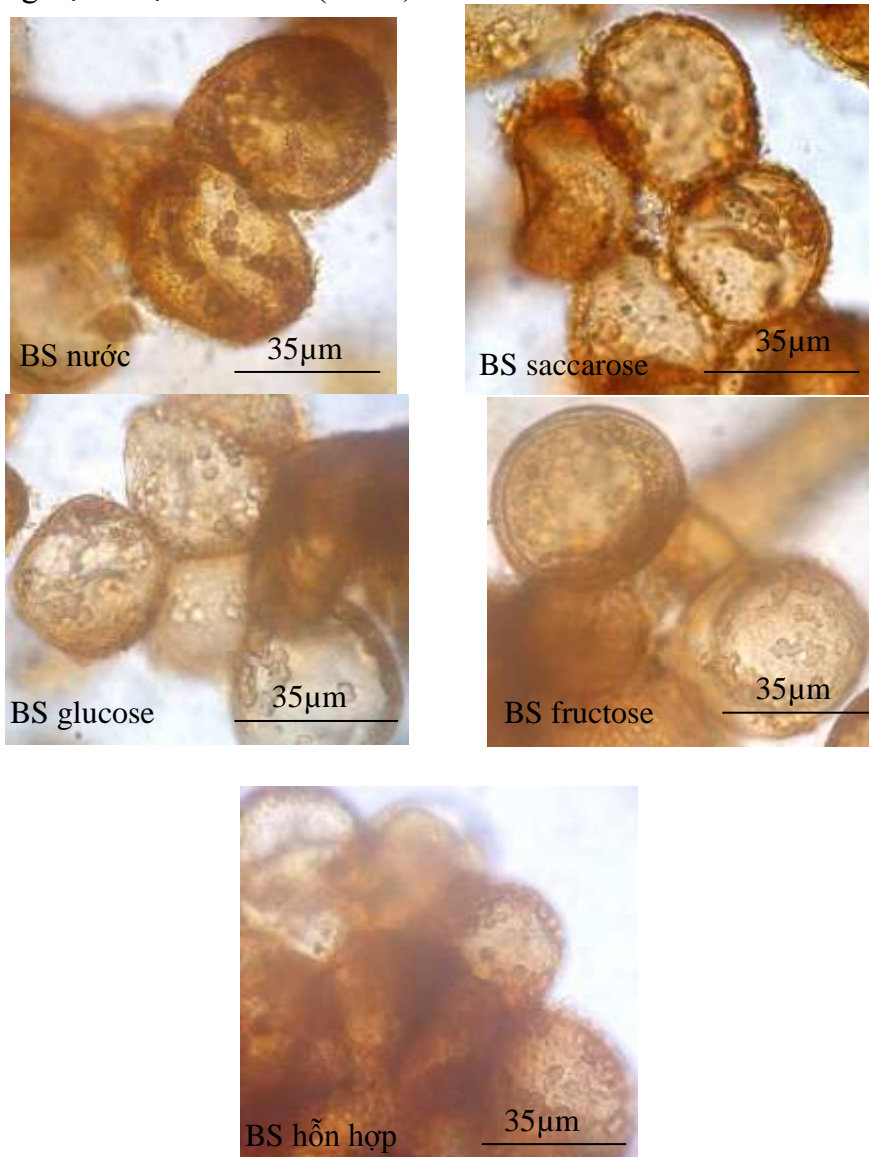
**Hình 2.** Cường độ hô hấp của tế bào dịch treo theo thời gian khi được bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy ở tuần thứ 2

Tuy nhiên, bên cạnh sự tiếp tục tăng sinh của tế bào là sự giảm tổng hợp paclitaxel so với đối chứng (bảng 10). Như vậy, nguồn carbon bổ sung chủ yếu được tế bào sử dụng cho hoạt động phân chia hơn là sự sinh tổng hợp paclitaxel. So sánh hàm lượng paclitaxel giữa các nghiệm thức bổ sung đường, chúng tôi nhận thấy fructose là yếu tố giúp cho sự sinh tổng hợp paclitaxel tốt hơn các loại đường khác. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Hirasuna và cs. (1996) trên tế bào *Taxus baccata* về khả năng sử dụng các nguồn đường khác nhau để tổng hợp paclitaxel và chứng minh fructose làm tăng hàm lượng paclitaxel trong khi glucose lại ngăn cản quá trình này.

**Bảng 10.** Hàm lượng paclitaxel trong tế bào sau sự bổ sung đường

Nghiệm thức	Hàm lượng paclitaxel (mg/g)			
	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6
BS nước cất	1,10	1,25	1,87	0,91
BS saccharose	0,86	1,04	1,40	0,79
BS glucose	0,76	0,69	1,46	0,89
BS fructose	1,00	0,60	1,74	0,88
BS hỗn hợp S:G:F=4:1:1	0,82	0,75	1,23	0,88

Đặc điểm của tế bào thông đỏ sau 3 tuần bổ sung đường được ghi nhận dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 (ảnh 8).



**Ảnh 8.** Tế bào thông đỏ sau 3 tuần bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy

Tế bào thông đỏ ở tất cả các nghiệm thức đều có màu nâu đậm, chứa nhiều hạt tinh bột rải rác khắp nguyên sinh chất và kích thước các tế bào không đều nhau trong cùng một cụm tế bào. Tế bào có vách mỏng trừ nghiệm thức bổ sung fructose, tế bào có vách dày (ảnh 8).

## KẾT LUẬN

- Dịch treo tế bào hình thành và tăng trưởng tốt từ sự nuôi cấy 1 g mô sẹo trong 10 ml môi trường lỏng B5 bổ sung saccharose 20 g/l + glucose 5 g/l + fructose 5 g/l, picloram 1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + NAA 0,5 mg/l. Hệ thống tế bào được duy trì trong điều kiện tối, trên máy lắc vòng với tốc độ lắc 60 vòng/phút.
- Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào bắt đầu từ tuần thứ nhất, kéo dài đến tuần thứ 3 với chỉ số tăng trưởng 0,28 rồi giảm sau đó. Hàm lượng đường tổng số trong tế bào và trong môi trường dịch treo giảm dần theo thời gian nuôi cấy. Cường độ hô hấp của dịch treo tế bào thấp ở tuần thứ nhất, tăng nhanh ở tuần 2, 3 (giai đoạn tế bào tăng trưởng mạnh) và giảm ở tuần thứ 4 (giai đoạn tế bào giảm hay ngừng tăng trưởng). Hoạt tính của AIA và zeatin trong tế bào thông đỏ tăng từ tuần 1 đến tuần 3, giảm ở tuần 4. Hoạt tính của GA<sub>3</sub> tăng ở tuần 1,2 rồi giảm sau đó. Riêng hoạt tính của ABA tăng dần theo thời gian nuôi cấy.
- Sự hiện diện của paclitaxel được xác định trong tế bào dịch treo và trong môi trường nuôi cấy. Hàm lượng paclitaxel trong tế bào cao nhất ở tuần thứ 2 của quá trình nuôi cấy (710 µg/g), trong khi hàm lượng paclitaxel trong môi trường lỏng cao nhất ở tuần thứ nhất (2,77 µg/ml).
- Sự bổ sung vào môi trường nuôi cấy 200 mg đường (glucose, fructose, saccharose hoặc hỗn hợp 3 loại đường này) đã kích thích sự tăng sinh nhưng không kích thích sự sinh tổng hợp paclitaxel.

## LỜI CẢM ƠN

*Chân thành cảm ơn TS. Vương Chí Hùng – Trung tâm Trồng và chế biến thuốc Đà Lạt đã cung cấp nguyên liệu thực vật và ThS. Nguyễn Huy Du – Phòng thí nghiệm Trung Tâm, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên TP.HCM đã phối hợp phân tích paclitaxel.*

# ROLES OF SOME COMBINING SUGARS AND PLANT GROWTH REGULATORS ON GROWTH OF *TAXUS WALLICHIANA* ZUCC. CELL SUSPENSION

Tran Hong Anh<sup>1\*</sup>, Le Thi Thuy Tien<sup>2</sup>, Vo Dinh Quang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The branch of National Center for Technological Progress in Ho Chi Minh City,  
saomai6@yahoo.com

<sup>2</sup>University of Technology, VNU-HCM

## Abstract

*Taxus wallichiana* Zucc. cell suspension was made from calli derived from young stem of Lam Dong *Taxus wallichiana*, on B5 medium with saccharose 20 g/l, 2,4-D 4 mg/l, kinetin 1 mg/l and AgNO<sub>3</sub> 150 mg/l. The growth of cell suspension has been impressed by some physical factors such as outset cell weight, shaker speed and chemical factors such as kind and concentration of sugar, kind and concentration of plant growth regulators. The best growth of cell suspension is when culture 1 g fresh calli in 10 ml B5 medium with saccharose 20 g/l + glucose 5 g/l + fructose 5 g/l, picloram 1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + NAA 0,5 mg/l in 50 ml erlenmeyer. The culture was maintained in shaker with speed 60 rpm, in the dark, at 25 ± 1°C. Adding in medium 200 mg sugar (glucose, fructose, saccharose or mixing three kinds of them) after culture 2 weeks had stimulated the growth but had not stimulated the synthesis of paclitaxel.

**Key word:** red pine, Lam Dong red pine, *Taxus wallichiana* Zucc., cell suspension, paclitaxel.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lâm Thị Kim Châu, Nguyễn Thượng Lệnh, Văn Đức Chính, Phạm Thị Ánh Hồng, Nguyễn Thị Huyền, Trần Mỹ Quan (1997), *Thực tập lớn sinh hóa*, Tủ sách Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM, TP.HCM.
2. Vũ Bình Dương, Nguyễn Văn Long, Nguyễn Tùng Linh, Sang Yo Byun, (2008) “Nghiên cứu quy trình tạo callus thông đỏ Việt Nam (*Taxus wallichiana*)”, *Tạp chí Dược học* (số 9), trang 24-27.
3. Trần Văn Định (2005), *Bảo tồn nguồn gen cây thông đỏ (*Taxus baccata* var, *wallichiana* Zucc.) bằng kỹ thuật nuôi cấy tái sinh chồi đỉnh in vitro*, Luận văn thạc sĩ ngành Lâm nghiệp, trường Đại học Nông Lâm TP.HCM, TP.HCM.
4. Bùi Văn Lê, Nguyễn Ngọc Hồng (2006), “Ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật và đường saccharose lên dịch nuôi cấy huyền phù tế bào dứa cạn *Catharanthus roseus*”, *Tạp chí phát triển KH&CN*, tập 9 (số 6-2006), trang 59-66.

5. Phạm Thị Tố Liên (2008), *Bước đầu nghiên cứu dịch treo tế bào cây Đinh lăng Polyscias Fruticosa L. Harms trong mục đích thu nhận saponin*, Luận văn thạc sĩ sinh học chuyên ngành sinh lý thực vật, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học quốc gia TP.HCM, TP.HCM.
6. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Trịnh Đôn, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Đinh Văn Khiêm, Lê Thị Xuân (2007), “Nuôi cấy tế bào và phục hồi mô sẹo từ dịch treo tế bào cây thông đỏ Himalaya (*Taxus wallichiana* Zucc.)”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* ( số 2-2007), trang 205 – 215.
7. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Trịnh Trâm, Nguyễn Trịnh Đôn, “Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường lên bước đầu tăng trưởng của dịch treo tế bào thông đỏ”, <http://www.scribd.com/doc/73895044>.
8. Lê Thị Thủy Tiên, Bùi Trang Việt, Trần Đức Lượng (2006), “Tạo mô sẹo và dịch huyền phù tế bào có khả năng sản xuất taxol từ lá và thân non cây thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc.”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, tập 4 (số 2), trang 221-226.
9. Lê Thị Thủy Tiên, Bùi Trang Việt, Trần Đức Lượng (2006), “Tìm hiểu về sự tăng sinh của dịch treo tế bào *Taxus wallichiana* Zucc.”, *Tạp chí phát triển KH&CN*, tập 9 (số 5 – 2006), trang 47-51.
10. Lê Thị Thủy Tiên và cs (2009), *Nuôi cấy tế bào Taxus spp, để thu nhận taxol và các hợp chất liên quan*, Luận án tiến sĩ chuyên ngành sinh lý thực vật, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học quốc gia TP.HCM, TP.HCM.
11. Nguyễn Lê Tú Trâm (2010), *Nuôi cấy tế bào cây râu mèo (Orthocypdon Stamineus Benth.) để thu nhận flavonoid*, Luận văn thạc sĩ sinh học chuyên ngành sinh lý thực vật, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học quốc gia TP.HCM, TP.HCM.
12. 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 ĐHTN TPHCM, số 1, trang 155-165.
13. Bùi Trang Việt (2000), *Sinh lý thực vật đại cương*, NXB Đại học quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 333 trang.
14. Cusidó R.M., Palazón J., Bonfill M., Expósito O., Moyano E., Pi ~ nol M.T. (2007), “Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*”, *Biochem Eng J*, 33,159–167.
15. Dong H. D., Zhong J. J. (2002), “Enhanced taxane productivity in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* cells by combining elicitation, sucrose feeding and ethylene incorporation”, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 116–121.
16. Fornale S.; Esposti D.D., Navia-Osorio A., Cusido R.M., Palazon J., Teresa P., [Bagni](#) N. (2002), “Taxol transport in *Taxus baccata* cell suspension cultures”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (1), 81–88.
17. Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K. (1968), “Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells”, *Exp.Cell Res.* 50: 151-158.
18. Henshaw G.G., JHA K. K., Mehta A. R., Joan Shadeshafft D., and H.E. Street H.E. (1996), “Studies on the Growth in Culture of Plant Cells”, *J. Exp. Bot*, 17(2), 362-377.
19. Hirasuna T.J., Pestchanker L.J., Srinivasan V., Shuler M.L.(1996), “Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*”, *Plant Cell Tiss Org*, 44, 95–102.

20. [Jaziri M.](#), [Zhiri A.](#), Guo Y.W., Dupont J.P., Shimomura K., Hamada H., Vanhaelen M., Homès J. (1996), “*Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey”, [Plant Cell, Tissue and Organ Culture](#), 46 (1), 59-75.
21. Kim, S-I., Choi, H-K., Kim, J-H., Lee, H-S. and Hong (2001), “Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*”, [Enzyme and Microbial Technology](#), 28, 202–209.
22. Lee D., Kim S., Mun S., Kim J. (2010), “Evaluation of feeding and mixing conditions for fractional precipitation of paclitaxel from plant cell cultures”, [Process Biochemistry](#), [45\(7\)](#), 1134–1140.
23. Meidner H.(1984), *Class experiments in Plant Physiology*.George Allen and Unwin (London), 169 pp.
24. Palazón, J., Cusidó, R.M., Bonfill, M., Morales, C., Piñol, M.T. (2003), “Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*”, [Journal of Biotechnology](#), [101\(2\)](#), 157–163.
25. Pestchanker, L.J., Roberts, S.C. and Shuler, M.L. (1996), “Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor”, [Enzyme and Microbial Technology](#), 19 (4), 256–260.
26. Prisca C., Nick P. (2005), “Auxin-Dependent Cell Division and Cell Elongation, 1-Naphthaleneacetic Acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Activate Different Pathways”, [Plantphysiol.org](#), 137(3), 939–948.
27. Vidensek, N.,Lim,P.,Campbell, A. and Carison,C. (1990), “Taxon content in bark, wood, root, leaf, twig and seedling from several *Taxus* species”, [Jornal of natural products](#), 53 (6), 1609-1610.
28. Yuan, Y.J., Wei Z.J., Miao Z.Q., Wu J.C. (2002), “Acting paths of elicitors on taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect”, [Biochem Eng. J.](#), 10, 77–83.
29. Yukimune Y., Tabata H., Higashi Y., Hara Y.(1996), “Methyl jasmonate-induced over-production of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures”, [Nat Biotechnol](#), 14, 1129–1132.
30. Woo, D.D.L., Miao, S.Y.P., Pelayo, J.C., Woolf, A.S.(1994), “Taxol inhibits progression of congenital polycystic kidney disease”, [Nature](#), 368, 750 – 753.
31. <http://www.genex.co.kr/Eng/>