

**SỰ TẠO MÔ SẸO VÀ DỊCH TREO TẾ BÀO THÔNG ĐỔ LÂM ĐỒNG
TAXUS WALLICHIANA ZUCC. CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP
PACLITAXEL**

**THE FORMATION OF LAM DONG *TAXUS WALLICHIANA* ZUCC.
CALLUS AND CELL SUSPENSION CULTURE FOR PACLITAXEL
BIOSYNTHESIS**

Trần Hồng Anh^{1*}, Võ Đình Quang¹, Lê Thị Thủy Tiên²

¹*Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Tp Hồ Chí Minh*

²*Trường Đại học Bách khoa Tp Hồ Chí Minh*

Ngày nhận bài 2.6.2015, ngày chuyển phản biện 10.6.2015, ngày nhận phản biện
23.7.2015, ngày chấp nhận đăng

Mô sẹo thông đổ Lâm Đồng *Taxus wallichiana* Zucc. đợc hình thành từ thân cây non trên môi trường khoáng và vitamin B5 bổ sung saccharose 20 g/l, 2,4-D 4 mg/l, kinetin 1 mg/l và AgNO₃ 150 mg/l. Việc sử dụng tổ hợp 2,4-D 0,1 mg/l, 6-BA 0,5 mg/l và NAA 0,5 mg/l để thay thế cho 2,4-D 4 mg/l và kinetin 1 mg/l nhằm thúc đẩy sự tăng sinh và tổng hợp paclitaxel của mô sẹo. Dịch treo tế bào thông đổ Lâm Đồng (*Taxus wallichiana* Zucc.) đợc tạo từ mô sẹo, trong môi trường lỏng có thành phần tương tự như môi trường nuôi cấy mô sẹo. Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào chịu ảnh hưởng bởi trọng lượng tế bào khởi đầu và vận tốc lắc. Trọng lượng tế bào khởi đầu từ 1-1,5 g/10 ml môi trường và vận tốc lắc từ 60-110 vòng/phút thích hợp cho sự tăng trưởng của dịch treo tế bào thông đổ.

***Từ khóa:* cây thông đổ, dịch treo tế bào, paclitaxel, *Taxus wallichiana* Zucc., thông đổ Lâm Đồng.**

Chỉ số phân loại 2.8

Summary

Taxus wallichiana Zucc. callus was formed from stem of young tree in B5 medium supplemented with sucrose 20 g/l, 2,4-D 4 mg/l, kinetin 1 mg/l and AgNO₃ 150 mg/l. The using of 2,4-D 0.1 mg/l, 6-BA 0.5 mg/l and NAA 0.5 mg/l in order to replace the combination of 2,4-D 4 mg/l and kinetin 1 mg/l was suitable for the growth and paclitaxel biosynthesis in callus. Lam Dong *Taxus wallichiana* Zucc. cell suspension culture was made from callus in liquid medium whose components were the same as in callus culture medium. The growth of cell suspension culture had been affected by initial cell weight and shaking speed. The initial cell weight which was 1-1.5 g of fresh calli in 10 ml liquid medium and shaking speed of 60-110 rpm were suitable for the growth of cell suspension culture.

***Key word:* cell suspension culture, Lam Dong yew tree, paclitaxel, *Taxus wallichiana* Zucc., yew.**

Classification number 2.8

****Tác giả chính: Tel: 0989369665; Email: saomai6@yahoo.com***

Đặt vấn đề

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[®] với hoạt chất chính là paclitaxel được tổ chức “Food and Drug Administration” (FDA) chính thức công nhận là loại thuốc chữa bệnh ung thư buồng trứng và ung thư vú hiệu quả nhất [1].

Paclitaxel có ở các bộ phận của cây thông đỏ, đặc biệt là vỏ cây, lá và lõi thân cây *Taxus brevifolia* [2]. 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 bị chết sau khi thu hoạch.

Việt Nam có 2 loài thông đỏ là *Taxus chinensis* và *Taxus wallichiana* Zucc.; trong đó, *Taxus wallichiana* đã được chứng minh trong lá có chứa hợp chất 10-deacetylbaicatin-III (10-DAB) - tiền chất có thể chuyển hóa thành paclitaxel [3]. 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 [4-9]. Theo hướng nghiên cứu về dịch treo tế bào, các nhà khoa học đã nghiên cứu nuôi cấy tế bào và phục hồi mô sẹo từ dịch treo tế bào thông đỏ Himalaya (*Taxus wallichiana* Zucc.) [7]. Nhóm tác giả đã thiết lập được điều kiện tạo dịch treo tế bào *Taxus wallichiana* là môi trường C3 gồm thành phần khoáng B5, 20% (v/v) nước dừa, 60 g/l đường saccharose và 1 mg/l kinetin nhưng môi trường này lại ức chế sự tăng sinh mô sẹo. Để phục hồi mô sẹo, tế bào được thu nhận vào ngày thứ 25 khi nuôi cấy dịch treo tế bào và được nuôi cấy trên môi trường C3 bổ sung 20 g/l đường saccharose trong tối. Một số công trình khác cũng đã nghiên cứu về dịch treo tế bào *Taxus wallichiana* được tạo ra từ mô sẹo có nguồn gốc từ thân non cây *Taxus wallichiana* Lâm Đồng trên môi trường khoáng B5 có bổ sung 4 mg/l 2,4-D và 1 mg/l kinetin [8]. Sự tăng sinh của dịch treo tế bào tốt nhất khi trong môi trường nuôi cấy có sự hiện diện của saccharose 30 g/l và 2,4-D 5 mg/l kết hợp với kinetin 0,5 mg/l. Việc sử dụng polyvinylpyrrolidone (PVP) với hàm lượng 1000 mg/l tỏ ra có khả năng đẩy lùi tác động cản của polyphenol và giúp cho sự tăng sinh của dịch treo tế bào. Tuy nhiên, để tiến tới mục tiêu công nghiệp hóa việc sản xuất hoạt chất paclitaxel đặc trị ung thư tại Việt Nam, cần thiết phải có các nghiên cứu theo hướng tăng nhanh sinh khối nhưng vẫn duy trì được hàm lượng paclitaxel cao để tạo cơ sở cho việc xây dựng quy trình công nghệ ở quy mô công nghiệp. Hơn nữa, để dễ dàng cho công tác tinh sạch paclitaxel trong tế bào sau này, môi trường nuôi cấy cần phải giảm thiểu hoặc không sử dụng 2,4-D, một auxin mạnh được sử dụng phổ biến để tạo mô sẹo đối với thông đỏ. Vì vậy, rất cần thiết phải có các nghiên cứu về ảnh hưởng của các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong đó có sự giảm hàm lượng 2,4-D khi nuôi cấy tế bào, tiến tới không sử dụng 2,4-D trong nuôi cấy dịch treo tế bào thông đỏ, từ đó lựa chọn tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật thích hợp cho sự tăng sinh cũng như sự tích lũy paclitaxel trong tế bào. Bài báo này góp phần nghiên cứu về sự tạo mô sẹo và dịch treo tế bào thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc. có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel trong môi trường có sự giảm thiểu 2,4-D.

Nội dung nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Cây thông đỏ Lâm Đồng *Taxus wallichiana* Zucc.

Tạo mô sẹo

Khúc cắt thân non 3-4 tuần tuổi từ cây thông đỏ 1 năm tuổi, có chiều dài 1 cm sau giai đoạn khử trùng với cồn 70°, hypoclorid canxi 5%, và HgCl₂ 0,5‰ được cấy trên môi trường tạo sẹo là môi trường B5 [10] bổ sung 2,4-D 4 mg/l, kinetin 1 mg/l [8], AgNO₃ 150 mg/l và agar 8 g/l. Mẫu cấy được cấy chuyển sau mỗi 15 ngày. Sự nuôi cấy được thực hiện trong buồng tối, ở 25±1°C và độ ẩm 60-65%. Điều kiện nuôi cấy này được áp dụng trong tất cả các thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến sự tăng sinh và tích lũy paclitaxel của mô sẹo

Mô sẹo 2 tháng tuổi được cấy trên môi trường B5 bổ sung saccharose 20 g/l, AgNO₃ 150 mg/l và các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật gồm 2,4-D nồng độ thấp (0,1-0,2 mg/l) kết hợp với 6-BA (0,5-1 mg/l) và NAA (0,5-1 mg/l). Sự gia tăng sinh khối mô sẹo được xác định bởi chỉ số tăng trưởng của tế bào sau 30 ngày nuôi cấy. Hàm lượng paclitaxel trong mô sẹo được xác định bằng máy sắc ký lỏng cao áp (HPLC) với chất chuẩn là taxol 99% của Sigma (Mỹ).

Nuôi cấy dịch treo tế bào

Mô sẹo 5 tháng tuổi 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 AgNO₃ 150 mg/l. Hệ thống tế bào được đặt trên máy lắc vòng với tốc độ lắc 110 vòng/phút.

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 thay đổi (0,5; 1,0; 1,5 và 2 g) được nuôi cấy trong erlen 50 ml chứa 10 ml môi trường B5 lỏng bổ sung saccharose 20 g/l; 2,4-D 0,1 mg/l, 6-BA 0,5 mg/l, NAA 0,5 mg/l, AgNO₃ 150 mg/l. Hệ thống tế bào 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 g 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, AgNO₃ 150 mg/l). Hệ thống tế bào 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.

Quan sát tế bào

Tế bào thông đỏ được quan sát dưới kính hiển vi quang học trong 1 giọt thuốc thử lugol (I₂KI) với độ phóng đại 400 lần nhằm xác định hình dạng và đặc tính của tế bào.

Xác định thể tích tế bào lắng

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. Chỉ số tăng trưởng của dịch treo tế bào được tính theo [11]: chỉ số tăng trưởng = (SCV sau - SCV đầu)/SCV đầu.

Xác định hàm lượng paclitaxel

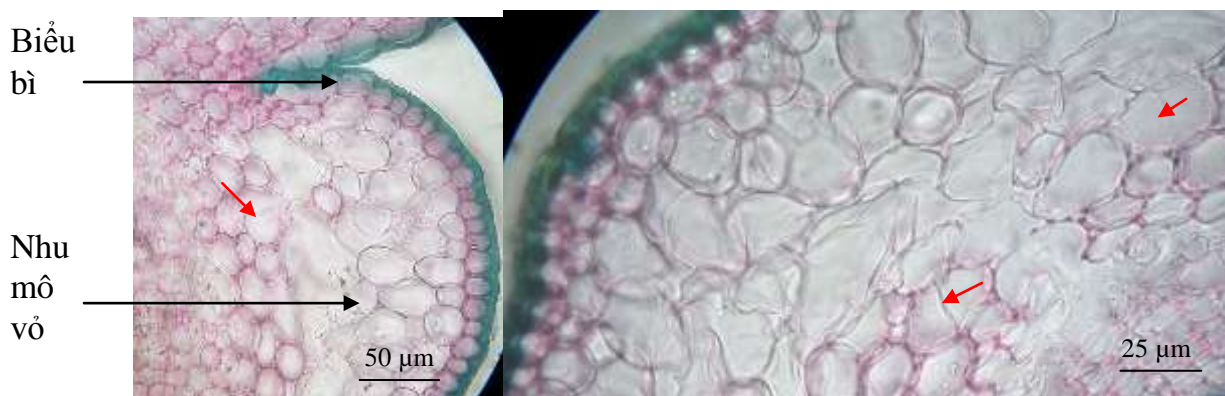
Hàm lượng paclitaxel có trong dịch treo tế bào được xác định bằng máy HPLC sử dụng đầu dò UV, chất chuẩn là taxol 99% của hãng Sigma (Mỹ).

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp có 10 bình nuôi cấy. 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 $p = 0,05$ của các giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau kèm theo sau số trung bình và sai số chuẩn.

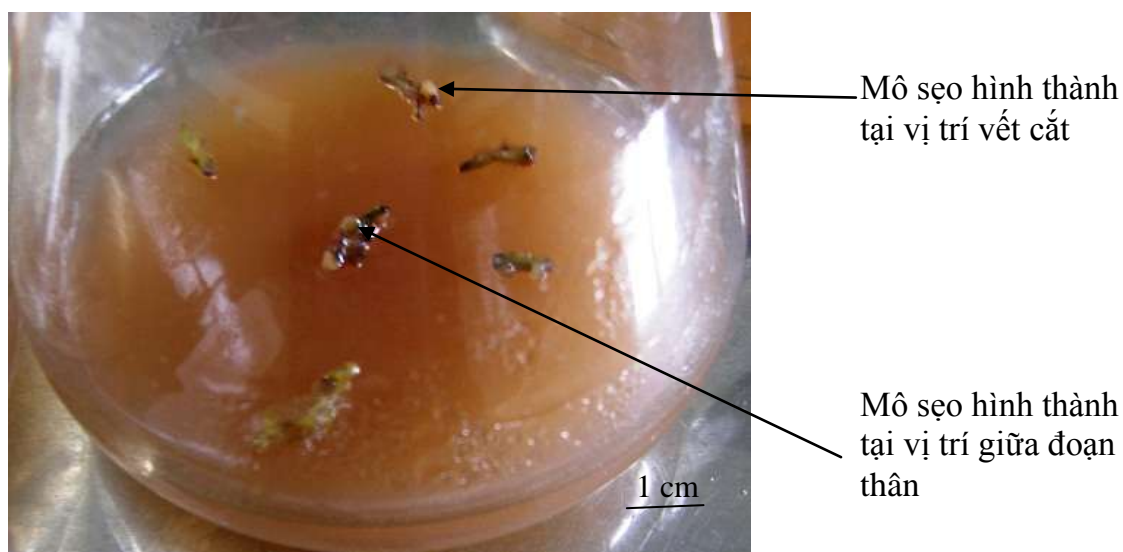
Kết quả

Khúc cắt thân non 3-4 tuần tuổi từ cây thông đỏ 1 năm tuổi với chiều dài 1 cm được đặt nằm ngang trên môi trường tạo sẹo là môi trường B5 bổ sung 2,4-D 4 mg/l, kinetin 1 mg/l và $AgNO_3$ 150 mg/l. Sau 15 ngày nuôi cấy, mẫu cấy bắt đầu cong và sự phân chia của các tế bào nhu mô vỏ thân có thể quan sát được dưới kính hiển vi (hình 1).



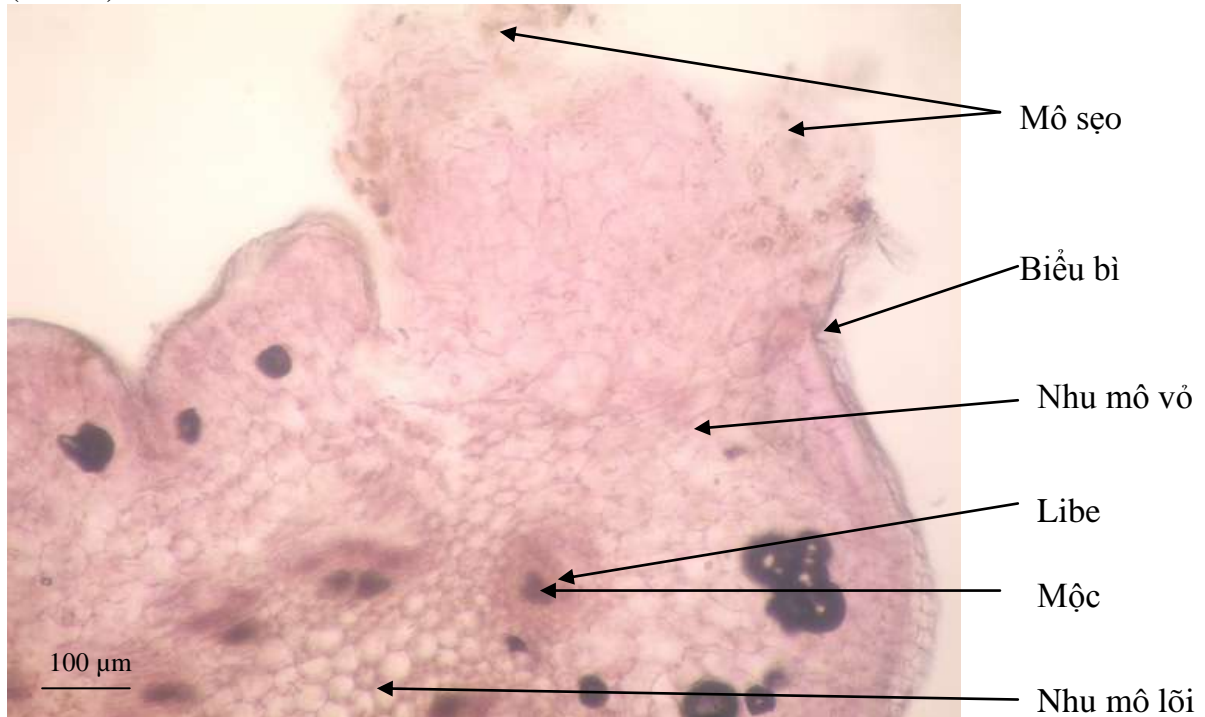
Hình 1: tế bào nhu mô vỏ thân có sự thành lập vách ngăn ngang sau 15 ngày nuôi cấy (dấu mũi tên)

Sau 45 ngày nuôi cấy, có thể nhận thấy sự xuất hiện của mô sẹo ở vị trí vết cắt hoặc ở giữa mẫu cấy (hình 2).



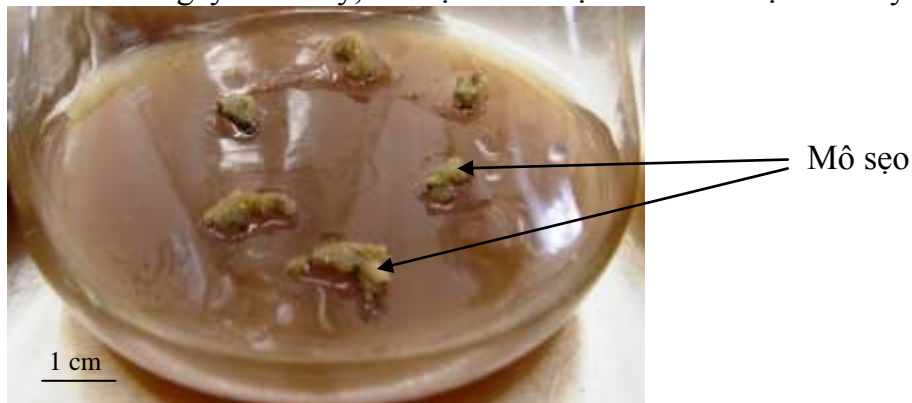
Hình 2: sự hình thành mô sẹo sau 45 ngày nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung 2,4-D 4 mg/l, kinetin 1 mg/l và $AgNO_3$ 150 mg/l

Mô sẹo hình thành giai đoạn này có dạng chắc, màu vàng sáng. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu của [5] và [8]. Dưới kính hiển vi quang học, có thể quan sát thấy các tế bào mô sẹo sắp xếp vô trật tự, phá vỡ biểu bì để tiếp tục phát triển (hình 3).



Hình 3: phẫu thức ngang mẫu thân thông đỏ sau 45 ngày nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung 2,4-D 4 mg/l + kinetin 1 mg/l và $AgNO_3$ 150 mg/l

Sau 60 ngày nuôi cấy, mô sẹo xuất hiện trên toàn bộ mẫu cây (hình 4).



Hình 4: mô sẹo hình thành từ mẫu cây sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung 2,4 D 4 mg/l + kinetin 1 mg/l và $AgNO_3$ 150 mg/l

Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm auxin như 2,4-D hay NAA thường được sử dụng như nguồn auxin ngoại sinh kích thích sự hình thành mô sẹo ở nhiều đối tượng thực vật [12]. Trong các loại auxin, 2,4-D là chất được sử dụng hiệu quả nhất [13]. Ngoài các chất thuộc nhóm auxin, để hình thành mô sẹo, một số loài thực vật cần có sự tác động phối hợp giữa auxin và cytokinin. Không ngoài quy luật này, sự hình thành mô sẹo từ thân non cây thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc. cũng

cần phải có sự kết hợp của 2,4-D nồng độ 4 mg/l với kinetin 1 mg/l [8] hoặc NAA nồng độ 2 mg/l kết hợp với kinetin 0,2 mg/l [4].

Các tế bào nhu mô vỏ thân dễ dàng tạo mô sẹo trên môi trường nuôi cấy có auxin riêng lẻ hay kết hợp với cytokinin [14]. Quan sát hình thái giải phẫu thân non thông đỏ, chúng tôi nhận thấy sự phân chia khởi đầu ở vài tế bào nhu mô vỏ (hình 1), sau đó sự phân chia tiếp tục xảy ra mạnh dẫn đến sự hình thành mô sẹo và nhô ra ngoài sau sự phá vỡ biểu bì thân (hình 3). Sau 2 tháng, mô sẹo có màu trắng ngà, dạng chặt (hình 4).

Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự tăng trưởng và tích lũy paclitaxel của mô sẹo

Mô sẹo được nuôi cấy trong các môi trường có thành phần và nồng độ auxin và cytokinin thay đổi. Sự tăng trưởng và tích lũy paclitaxel của mô sẹo sau 30 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: sự tăng trưởng và tích lũy paclitaxel của mô sẹo sau 30 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Chất ĐHSTTV (mg/l)			Chỉ số tăng trưởng	Paclitaxel (µg/g)
	2,4-D	NAA	6-BA		
NT1 (đối chứng)	0	0	0	0,87±0,06 ^e	KPH
NT2	0,1	0,5	0	2,32±0,11 ^d	11,4
NT3	0,1	1	0	2,65±0,20 ^d	KPH
NT4	0,1	0,5	0,5	4,48±0,52^{ab}	231,8
NT5	0,1	1	0,5	4,13±0,05^{ab}	70,9
NT6	0,2	0,5	0	2,86±0,42 ^{cd}	41,5
NT7	0,2	1	0	3,61±0,10 ^{bc}	48,9
NT8	0,2	0,5	1	4,76±0,13^a	138,4
NT9	0,2	1	1	4,10±0,39^{ab}	72,8

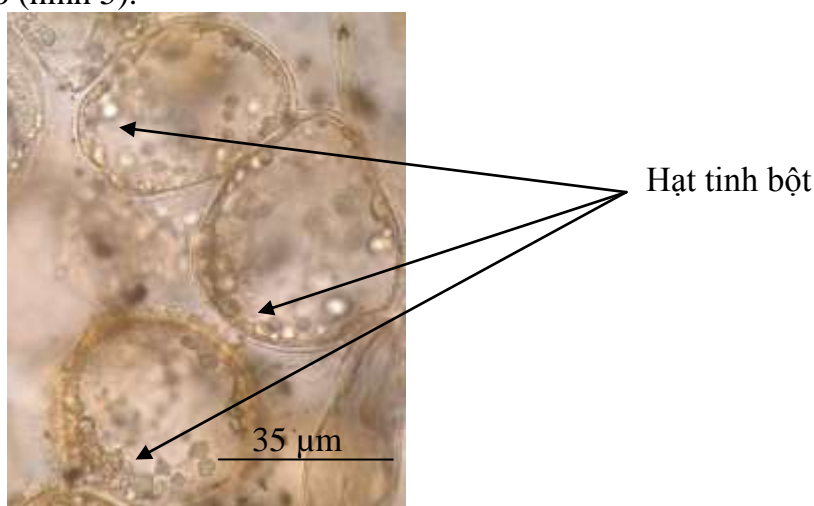
Ghi chú: ĐHSTTV: điều hòa sinh trưởng thực vật KPH: không phát hiện; các chữ cái khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, mô sẹo tăng trưởng tốt trong tất cả các nghiệm thức (NT) có sự hiện diện của chất điều hòa sinh trưởng thực vật, đặc biệt trên các môi trường có sự hiện diện của 6-BA (NT 4, 5, 8 và 9). Chỉ số tăng trưởng của mô sẹo cao nhất trên môi trường có 2,4-D 0,2 mg/l, NAA 0,5 mg/l, 6-BA 1 mg/l là 4,76 (NT 8), tiếp theo là mô sẹo trên môi trường có 2,4-D 0,1 mg/l, NAA 0,5 mg/l, 6-BA 0,5 mg/l (4,48) (NT 4). Tuy nhiên, sự khác nhau giữa các NT này không có ý nghĩa về mặt thống kê. Mô sẹo tăng trưởng chậm hơn khi không có 6-BA trong môi trường nuôi cấy (NT 2, 3, 6 và 7).

Loại auxin thường được sử dụng để cảm ứng tạo sẹo là 2,4-D. Tuy nhiên, nếu mô sẹo được duy trì một thời gian dài trong môi trường có 2,4-D nồng độ cao thì kiểu gen của tế bào có thể bị biến đổi. Trong nhiều trường hợp, việc chuyển mô sẹo sau khi hình thành từ môi trường có 2,4-D sang môi trường có NAA hoặc IAA được thực

hiện [15]. Fornale [16] cũng sử dụng môi trường B5 bổ sung 2,4-D 10 μM (tương đương 2,26 mg/l), kinetin 4 μM (0,86 mg/l) và GA_3 nồng độ 1 μM (0,35 mg/l) để cảm ứng tạo mô sẹo từ thân non cây thông đỏ *Taxus baccata* L. Sau 4-6 tuần, mô sẹo cũng được cấy chuyển qua môi trường B5 có NAA 10 μM (1,86 mg/l) và 6-BA 0,5 μM (0,11 mg/l) nhằm loại bỏ 2,4-D trong môi trường nuôi cấy. Tương tự, mô sẹo 2 tháng tuổi trong thí nghiệm của chúng tôi được cấy chuyển qua môi trường có chứa tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật gồm 2,4-D nồng độ thấp (0,1-0,2 mg/l) kết hợp với 6-BA (0,5-1 mg/l) và NAA (0,5-1 mg/l). Kết quả là chỉ số tăng trưởng của mô sẹo sau 1 tháng nuôi cấy tăng từ 2,32 đến 4,76 ở tất cả các NT (chỉ số tăng trưởng ở NT đối chứng là 0,87) chứng tỏ sự kết hợp giữa 2,4-D nồng độ thấp với 6-BA và NAA kích thích tốt sự tăng sinh của tế bào mô sẹo thông đỏ.

Sự sinh tổng hợp paclitaxel của mô sẹo được ghi nhận sau 30 ngày nuôi cấy. Tương tự như sự tăng trưởng của mô sẹo, hàm lượng paclitaxel cao hơn trên các môi trường nuôi cấy có sự phối hợp giữa auxin và cytokinin. Hàm lượng paclitaxel cao nhất (231,8 $\mu\text{g/g}$) được ghi nhận ở mô sẹo trên môi trường có 2,4-D 0,1 mg/l, NAA 0,5 mg/l và 6-BA 0,5 mg/l. Trong khi đó, mô sẹo trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật (NT 1) hay môi trường có 2,4-D 0,1 mg/l, NAA 1 mg/l (NT 3) không tổng hợp được paclitaxel. Như vậy, việc thay thế một phần 2,4-D bằng NAA kết hợp với 6-BA đã tác động tốt đến sự sinh trưởng của mô sẹo và sự tích lũy paclitaxel trong tế bào mô sẹo, và tổ hợp thích hợp cho sự sinh trưởng và tích lũy paclitaxel là 2,4-D nồng độ 0,1 mg/l kết hợp với 6-BA 0,5 mg/l và NAA 0,5 mg/l. Mặt khác, tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng này cũng thích hợp cho sự tạo mô sẹo làm nguyên liệu tạo dịch treo tế bào với mô sẹo có màu vàng sáng và bắt đầu xốp sau 4 tháng nuôi cấy. Dưới kính hiển vi, mô sẹo gồm những tế bào đẳng kính, vách mỏng. Hạt tinh bột (nhuộm màu xanh tím với iod) hầu như phân bố khắp tế bào nhưng tập trung nhiều nhất ở gần màng nguyên sinh. Không nhìn thấy nhân trong tế bào (hình 5).



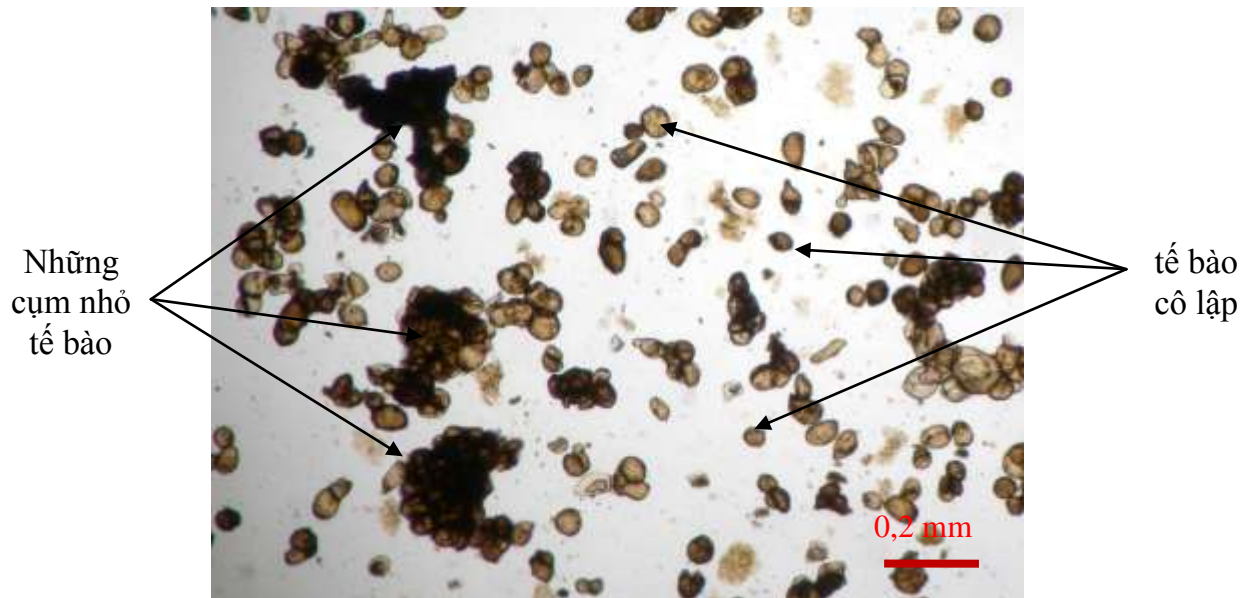
Hình 5: tế bào mô sẹo sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường B5 bổ sung 2,4-D 0,1 mg/l, 6-BA 0,5 mg/l, NAA 0,5 mg/l và AgNO_3 150 mg/l

Dựa vào khả năng tăng trưởng và tích lũy paclitaxel của mô sẹo, chúng tôi lựa chọn môi trường B5 bổ sung 2,4-D 0,1 mg/l, NAA 0,5 mg/l và 6-BA 0,5 mg/l (NT 4) để nuôi cấy mô sẹo làm nguyên liệu tạo dịch treo tế bào.

Nuôi cấy dịch treo tế bào

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 AgNO₃ 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±1°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 (hình 6).



Hình 6: 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

Ngoài các yếu tố như ánh sáng, nhiệt độ, các yếu tố vật lý khác cũng ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào như mật độ tế bào ban đầu hay vận tốc của máy lắc.

Trọng lượng tế bào khởi đầu (mật độ tế bào khởi đầu) có 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 NT 2 và 3 (trọng lượng tế bào khởi đầu lần lượt 1 và 1,5 g), sự tăng trưởng của dịch treo tế bào cao hơn các NT còn lại. Chỉ số tăng trưởng của dịch treo tế bào cao nhất ở NT 2 với trọng lượng tế bào khởi đầu là 1 g (bảng 2).

Bảng 2: 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

Trọng lượng tế bào khởi đầu (g)	Chỉ số tăng trưởng
0,5	0,02±0,03 ^b

1,0	0,24±0,03 ^a
1,5	0,17±0,05 ^a
2,0	0,00±0,00 ^b

Các chữ cái khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.
Thể tích môi trường cho các thí nghiệm là 10 ml

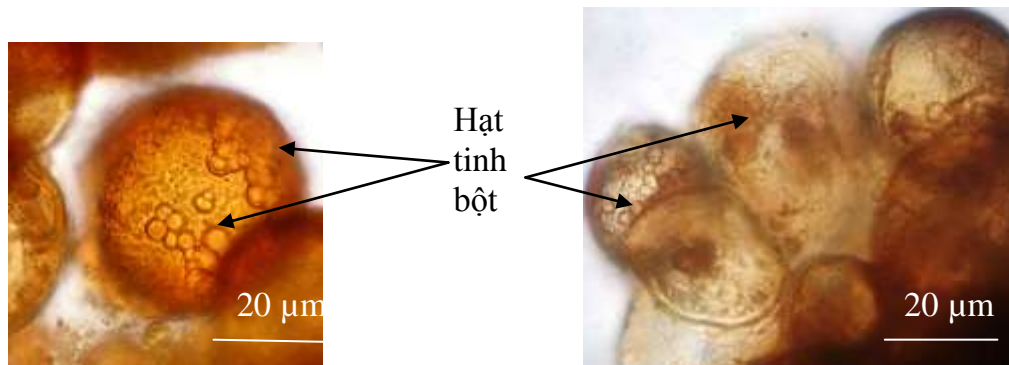
Như vậy, trọng lượng tế bào ban đầu thích hợp cho sự tăng sinh của dịch treo tế bào là 1 và 1,5 g tế bào tươi/10 ml môi trường. Kết quả này cũng phù hợp với Fornale [16] khi nuôi cấy 1 g mô sẹo *Taxus baccata* L. với 10 ml môi trường lỏng trong bình tam giác 100 ml để tạo dịch treo tế bào. Với trọng lượng tế bào ban đầu thấp hơn hoặc cao hơn, sự tăng sinh diễn ra chậm hơn. Trong môi trường lỏng, mô sẹo 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 [17]. Vì vậy, việc xác định mật độ tế bào ban đầu thích hợp là cần thiết.

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 (hình 7).



Hình 7: 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 (hình 8).



Hình 8: tế bào thông đở sau 3 tuần nuôi cấy

Từ thí nghiệm trên, trọng lượng tế bào khởi đầu là 1 g/10 ml môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng của dịch treo tế bào nên được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

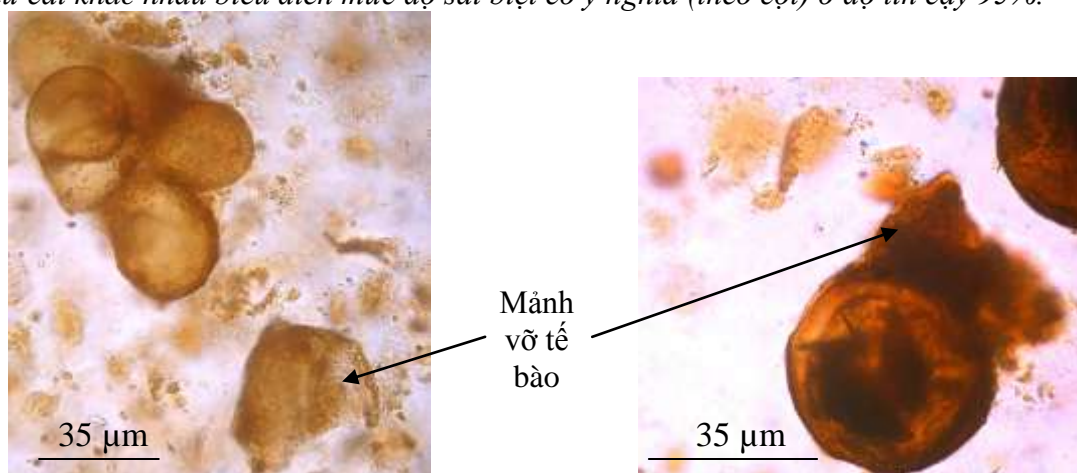
Ảnh hưởng của vận tốc lắc đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào

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 3), đồng thời với sự xuất hiện những mảnh vỡ tế bào trong môi trường nuôi cấy (hình 9). 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 3: ảnh hưởng của vận tốc lắc lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào

Tốc độ lắc (vòng/phút)	Chỉ số tăng trưởng
60	0,22±0,03 ^a
85	0,18±0,02 ^a
110	0,14±0,02 ^a
135	0,02±0,04 ^b

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



Hình 9: tế bào dịch treo ở 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 hiện diện của nhiều mảnh vỡ tế bào trong môi trường nuôi cấy (hình 9). Có thể nhận 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 [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 [6] 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 [18], Fornale [16] đã áp dụng vận tốc lắc 100 vòng/phút để duy trì dịch treo tế bào. Tương tự, Yuan [19] đã áp dụng vận tốc lắc 100 vòng/phút để nuôi cấy dịch treo tế bào *Taxus chinensis* var. *mairei*. Trong khi đó, Pestchanker [20] 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 [21], Lee [22] nuôi cấy dịch treo *Taxus chinensis* ở vận tốc lắc 150 vòng/phút trong khi Dong và Zhong [23] 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.

Kết luận

Khi đặt khúc cắt thân non 3-4 tuần tuổi từ cây thông đỏ 1 năm tuổi nằm ngang trên môi trường tạo sẹo (môi trường B5 bổ sung 2,4-D 4 mg/l, kinetin 1 mg/l và AgNO₃ 150 mg/l), sự phân chia khởi đầu ở vài tế bào nhu mô vỏ sau 15 ngày nuôi cấy, sau đó sự phân chia tiếp tục xảy ra mạnh mẽ dẫn đến sự hình thành mô sẹo và nhô ra ngoài sau sự phá vỡ biểu bì thân. Sau 2 tháng, mô sẹo có màu trắng ngà, dạng chặt.

Sự sử dụng tổ hợp 0,1 mg/l 2,4-D; 0,5 mg/l 6-BA và 0,5 mg/l NAA thích hợp cho sự tăng sinh của mô sẹo. Chỉ số tăng trưởng của mô sẹo sau một tháng nuôi cấy là 4,76 và hàm lượng paclitaxel đạt 231,8 µg/g trọng lượng khô.

Dịch treo tế bào hình thành và tăng trưởng tốt từ sự nuôi cấy 1-1,5 g tế bào tươi trong 10 ml môi trường lỏng B5 trên máy lắc vòng với tốc độ lắc 60-110 vòng/phút. 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. Sự phân chia của tế bào dịch treo thể hiện qua sự hình thành vách ngăn ngang giữa tế bào sau 2 tuần nuôi cấy.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu trân trọng 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 Đại học Khoa học Tự nhiên Tp Hồ Chí Minh đã phối hợp phân tích paclitaxel.

Tài liệu tham khảo

- [1] Woo D.D.L, Miao S.Y.P, Pelayo J.C, Wool A.S (1994), “Taxol inhibits progression of congenital polycystic kidney disease”, *Nature*, **368**, pp.750 -753.
- [2] Vidensek N, Lim P, Campbell A and Carison C (1990), “Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig and seedling from several *Taxus* species”, *Journal of natural products*, **53(6)**, pp.1609-1610.
- [3] Nguyễn Hữu Toàn Phan, Nguyễn Thị Diệu Thuần, Nguyễn Văn Hào, Châu Công Minh (2007), “Sự biến động của hàm lượng 10-Deacetyl Baccatin III và 10-Hydroxy Baccatin III theo thời gian thu hái trong lá cây thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc. ở tỉnh Lâm Đồng”, *Tạp chí Sinh học*, **29(4)**, trang 49-51.
- [4] 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.
- [5] Nguyễn Thị Thanh Hiền (2005), “Khảo sát khả năng hình thành và phát triển mô sẹo cây thông đỏ *Taxus wallichiana* - Một loại cây quý của tỉnh Lâm Đồng”, *Tạp chí Khoa học ứng dụng*, **số 8**, Trường Đại học Tôn Đức Thắng, trang 24-28.
- [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**, 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, Nguyễn 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*, **4(2)**, trang 221-226.
- [9] Lê Thị Thủy Tiên, Bùi Trang Việt, Nguyễn Đức Lượng (2006), “Tìm hiểu về sự tăng sinh của dịch treo tế bào *Taxus wallichiana* Zucc.”, *Tạp chí Phát triển KH&CN*, **9(5)**, trang 47-51.
- [10] Gamborg O.L, Miller R.A and Ojima K (1968), “Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells”, *Exp.Cell Res*, **50**, pp.151-158.
- [11] Chen Y.Q, Yi F, Cai M, Luo J.X (2003), “Effects of amino acids, nitrate, and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*”, *Plant Growth Regulation*, **41**, pp.265-268.
- [12] Dixon R.A and Gonzales R.A (1994), *Plant cell culture*, The practical approach series, Second Edition, Oxford University Press.
- [13] Vũ Văn Vụ (1999), *Sinh lý thực vật ứng dụng*, Nxb Giáo dục.
- [14] Bùi Trang Việt (2000), *Sinh lý thực vật đại cương*, Nxb Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh.
- [15] Edwin F.G (1993), *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1: 2 nd Edition*, Exegetics Ltd, Edington, Wilts-England, pp.420-425.
- [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)**, pp.81-88.
- [17] Henshaw G.G, JHA K.K, Mehta A.R, Joan Shadeshafft D and Street H.E (1996), “Studies on the Growth in Culture of Plant Cells”, *J. Exp. Bot*, **17(2)**, pp.362-377.

- [18] Cusidó R.M, Palazón J, Bonfill M, Expósito O, Moyano E, Pinol M.T (2007), “Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*”, *Biochem Eng J*, **33**, pp.159-167.
- [19] 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**, pp.77-83.
- [20] 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)**, pp.256-260.
- [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**, pp.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)**, pp.1134-1140.
- [23] 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**, pp.116-121.