KHẢO SÁT VÀI YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ SINH TỔNG HỢP TAXOL CỦA CÁC HỆ THỐNG TẾ BÀO *TAXUS WALLICHIANA* ZUCC. *IN VITRO*

Lê Thị Thủy Tiên [(1)], Bùi Trang Việt [(2)], Nguyễn Đức Lượng[(1)]

(1) Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

(2) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 08 tháng 01 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 30 tháng 11 năm 2010)

TÓM TẮT: *Mô sẹo và dịch treo tế bào hình thành từ sự phân chia của các tế bào nhu mô vỏ thân cây thông đỏ Lâm Đồng Taxus wallichiana Zucc. trên môi trường B5 có bổ sung 2,4-D và kinetin. Sự sinh tổng hợp taxol của các hệ thống tế bào chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như thời gian nuôi cấy, nhiệt độ, áp suất thẩm thấu, chất cảm ứng... Sự kéo dài thời gian nuôi cấy làm giảm sự tăng trưởng của mô sẹo nhưng làm tăng sự tích luỹ taxol trong tế bào. Ánh sáng ngăn cản sự tăng trưởng của mô sẹo nhưng làm tăng sự tổng hợp taxol. Sự gia tăng áp suất thẩm thấu môi trường nuôi cấy (với saccharose 60 g/l), sự bổ sung phenylalnine (20 mg/l) với vai trò là tiền chất hữu cơ, methyl jasmonate (10 mg/l) với vai trò là tác nhân cảm ứng đều làm tăng sự tích luỹ taxol trong tế bào. Hàm lượng taxol trong các hệ thống tế bào được đánh giá thông qua tác động cản sự tạo phác thể rễ của trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh.*

Từ khóa: *Mô sẹo, dịch treo tế bào, Taxus wallichiana Zucc., taxol.*

1. GIỚI THIỆU

Taxol (paclitaxel), một alkaloid diterpenoid tự nhiên được thu nhận từ vỏ cây thông đỏ Thái Bình Dương (*Taxus brevifolia*), được FDA (the Food and Drug Administration) công nhận là tác nhân hoá trị hiệu quả và quan trọng đối với một số bệnh ung thư vào năm 1992 (Woo và cộng sự, 1994) [22].

Việc cung cấp taxol bị hạn chế do thu nhận từ cây ngoài tự nhiên với số lượng giới hạn, đồng thời với nhu cầu sử dụng để điều trị ung thư ngày càng tăng. Nhiều phương pháp thu nhận taxol được nghiên cứu như tổng hợp hoá học, bán tổng hợp từ tiền chất là 10-deacetylbaccatin III, nuôi cấy tế bào thực vật... Các hệ thống tế bào *Taxus in vitro* được xem như một phương tiện đầy hứa hẹn để sản xuất taxol (Jaziri và cộng sự, 1996) [10]. Tuy nhiên, vẫn còn một số hạn chế khi đưa vào sản xuất phục vụ nhu cầu thương mại do sản lượng thấp và không ổn định. Vì vậy, để có thể thương mại hoá taxol cần phải có những dòng tế bào tăng sinh nhanh, có khả năng sản xuất cao và ổn định. Việc chọn dòng tế bào kết hợp với điều kiện môi trường tối ưu, chất cảm ứng thích hợp là yếu tố quyết định trong sản xuất (Collins-Pavao và cộng sự, 1996) [5]. Các nhà khoa học đã tập trung vào nghiên cứu vấn đề này và nâng cao hiệu suất theo các hướng: bổ sung các tiền chất hữu cơ vào môi trường nuôi cấy (Silvestrini và cộng sự, 2002) [18], tạo áp suất

thẩm thấu của môi trường nuôi cấy (Kim và cộng sự, 2001) [11]; sử dụng các chất cảm ứng như methyl jasmonate (Luo và cộng sự, 2003) [13] ... Tất cả những yếu tố này khi được xử lý độc lập với nhau đều có thể làm tăng sản lượng taxol trong tế bào. Các hướng nghiên cứu trên cho thấy khả năng nâng cao quá trình sinh tổng hợp taxol có thể thực hiện được. Sự sinh tổng hợp taxol được đánh giá bởi các phương pháp tiên tiến (HPLC) nhưng đồng thời cũng có thể đánh giá qua khả năng cản sự hình thành phác thể rễ từ trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh (Lê Thị Thuỷ tiên và cộng sự, 2010) [21].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu tạo mô sẹo và dịch treo tế bào là thân non 3 – 4 tuần tuổi trên cây Thông đỏ Lâm Đồng (*Taxus wallichiana* Zucc.), được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu Lâm sinh Lâm Đồng. Vật liệu dùng trong sinh trắc nghiệm sự tạo phác thể rễ là trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh (*Phaseolus aureus* Roxb.) 3 ngày tuổi.

Phương pháp

• *Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lên sự sinh tổng hợp taxol*

Mô sẹo trên môi trường B5 (Gamborg và cộng sự, 1968) [9] bổ sung 2,4-D 4 mg/l và kinetin 1 mg/l (Lê Thị Thuỷ Tiên và cộng sự, 2006) [19], dịch treo tế bào trong môi trường B5 với 2,4-D 5 mg/l, kinetin 0,5 mg/l, casein hydrolysate 750 mg/l và PVP 1000 mg/l (Lê Thị Thuỷ Tiên và cộng sự, 2006) [20] được sử dụng trong các thí nghiệm cải tiến điều kiện môi trường nuôi cấy để thúc đẩy sự sinh tổng hợp taxol của tế bào. Chỉ số tăng trưởng của mô sẹo và dịch treo tế bào được xác định theo Chen và cộng sự (2003) [3].

Thời gian nuôi cấy

Mô sẹo được duy trì trong thời gian 7, 8, 9 và 10 tháng. Sự cấy chuyền được thực hiện đều đặn sau mỗi 4 tuần. Khảo sát sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của mô sẹo 7, 8, 9 và 10 tháng tuổi.

Ánh sáng

Mô sẹo và dịch treo tế bào được duy trì trong 4 tuần ở điều kiện tối và sáng (cường độ ánh sáng 2800 ± 200 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày). Khảo sát sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào.

Nhiệt độ

Mô sẹo và dịch treo tế bào được nuôi cấy ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau: 22, 25, 28 và 31°C. Khảo sát sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào.

Methyl jasmonate

Methyl jasmonate được bổ sung vào dịch treo tế bào ở ngày thứ 14 của quá trình nuôi cấy với nồng độ 10, 20, 30 và 40 mg/l. Khảo sát sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của dịch treo tế bào.

Phenylalanine

Phenylalanine được bổ sung vào dịch treo tế bào ở ngày thứ 14 của quá trình nuôi cấy với nồng độ 10, 20 và 30 mg/l. Khảo sát sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của dịch treo tế bào.

Saccharose

Dịch treo tế bào được nuôi trong môi trường có saccharose nồng độ 30, 40, 60, 80 và 100 g/l. Khảo sát sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của dịch treo tế bào.

• *Thu nhận taxol từ các hệ thống tế bào*

Taxol trong các hệ thống tế bào được ly trích với chloroform (Chattopadhyay và cộng sự, 2004) [2].

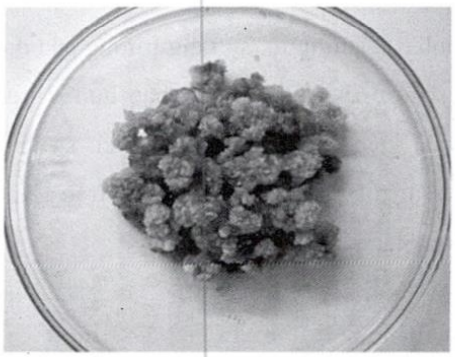
• *Xác định hoạt tính taxol bằng phương pháp trắc nghiệm sự tạo phác thể rễ*

Cao chloroform từ 1g (trọng lượng tươi) mô sẹo hay dịch treo tế bào được hòa tan trong 1ml cồn 5% và bổ sung vào 10 ml môi trường agar với saccharose 20g/l để trắc nghiệm sự tạo phác thể rễ từ trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh. Hoạt tính của taxol trong cao chiết tỷ lệ nghịch với sự sai biệt về số lượng rễ hình thành trong điều kiện chuẩn (không có taxol) sau 30 giờ xử lý trong tối và được tính bằng cách so sánh với dung dịch taxol tinh khiết 1mg/l (Lê Thị Thuỷ Tiên và cộng sự, 2010) [21].

3. KẾT QUẢ

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của mô sẹo

Mô sẹo 7, 8, 9 và 10 tháng tuổi được sử dụng làm nguyên liệu để ly trích và xác định hoạt tính của taxol và các hợp chất liên quan. Sự tăng trưởng của mô sẹo giảm theo sự kéo dài thời gian nuôi cấy. Thời gian nuôi cấy càng kéo dài, mô sẹo càng tăng trưởng chậm và màu sắc của mô sẹo càng đậm hơn (ảnh 1, 2). Sự giảm tăng trưởng của mô sẹo xảy ra song song với sự gia tăng hoạt tính của taxol trong tế bào. Hoạt tính của taxol cao nhất (1,06 mg/l) thu được từ mô sẹo 10 tháng tuổi (bảng 1).



Ảnh 1. Mô sẹo 7 tháng tuổi

Ảnh 2. Mô sẹo 9 tháng tuổi

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên hoạt tính taxol của mô sẹo

Thời gian (tháng)	Chỉ số tăng trưởng	Hoạt tính của taxol (mg/l)
7	$0,33 \pm 0,02^{d}$	$0,62 \pm 0,03^{a}$
8	$0,21 \pm 0,01^{c}$	$0,78 \pm 0,04^{b}$
9	$0,09 \pm 0,00^{b}$	$0,93 \pm 0,04^{c}$
10	$0,03 \pm 0,01^{a}$	$1,06 \pm 0,03^{d}$

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

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào

Nhiệt độ thích hợp cho sự sinh tổng hợp taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào là 28°C. Tuy nhiên, sự tăng trưởng của các hệ thống tế bào này tốt hơn ở 25°C. Sự giảm tăng trưởng của mô sẹo và dịch treo tế bào xảy ra cùng với sự gia tăng tổng hợp taxol trong tế bào. Hoạt tính taxol của mô sẹo cao hơn của dịch treo tế bào trong tất cả các nghiệm thức (bảng 2).

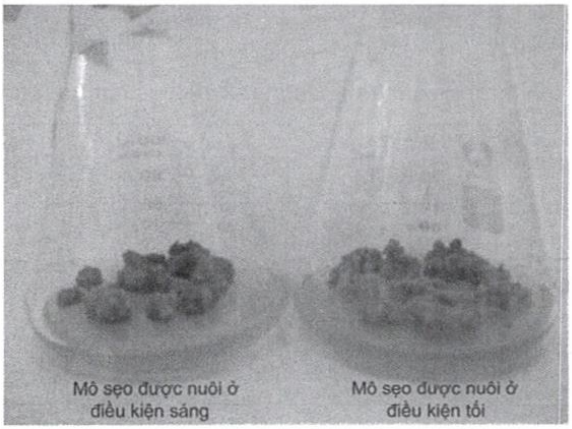
Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào

Nhiệt độ (°C)	Mô sẹo		Dịch treo tế bào	
	Chỉ số tăng trưởng	Hoạt tính của taxol (mg/l)	Chỉ số tăng trưởng	Hoạt tính của taxol (mg/l)
22	$0,43 \pm 0,04^{a}$	$0,43 \pm 0,02^{a}$	$0,28 \pm 0,09^{ab}$	$0,39 \pm 0,04^{a}$
25	$0,58 \pm 0,05^{c}$	$0,59 \pm 0,03^{b}$	$0,43 \pm 0,09^{b}$	$0,50 \pm 0,09^{bc}$
28	$0,31 \pm 0,04^{ab}$	0,76 ± 0,03c	$0,17 \pm 0,06^{a}$	$0,59 \pm 0,03^{c}$
31	$0,25 \pm 0,03^{a}$	$0,64 \pm 0,03^{b}$	$0,07 \pm 0,01^{a}$	$0,42 \pm 0,03^{ab}$

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

Ảnh hưởng của ánh sáng đến hoạt tính taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào

Mô sẹo trong điều kiện chiếu sáng tăng trưởng chậm, màu nâu. Mô sẹo trong điều kiện tối tăng trưởng nhanh hơn và có màu vàng nâu (ảnh 3). Tương tự, sự tăng trưởng của dịch treo tế bào ở điều kiện sáng thấp hơn ở trong tối. Điều kiện chiếu sáng kích thích sự sinh tổng hợp taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào cao hơn điều kiện tối (bảng 3).



Ảnh 3. Mô sẹo được nuôi trong điều kiện chiếu sáng khác nhau

Bảng 3. Ảnh hưởng của ánh sáng lên sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào

Điều kiện nuôi cấy	Mô sẹo		Dịch treo tế bào	
	Chỉ số tăng trưởng	Hoạt tính của taxol (mg/l)	Chỉ số tăng trưởng	Hoạt tính của taxol (mg/l)
Sáng	0,220 ± 0,033	0,960 ± 0,075	0,175 ± 0,029	0,620 ± 0,015
	0,789 ± 0,009	0,570 ± 0,021	0,258 ± 0,046	0,430 ± 0,017

Ảnh hưởng của methyl jasmonate đến sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của dịch treo tế bào

Sự hiện diện của methyl jasmonate trong môi trường nuôi cấy kích thích sự sinh tổng hợp taxol của dịch treo tế bào, đặc biệt với methyl jasmonate 10 mg/l (hoạt tính của taxol là 0,74 mg/l). Tác động của methyl jasmonate nồng độ 30 và 40 mg/l tương đương nhau và hầu như sự tăng trưởng của dịch treo tế bào không bị ảnh hưởng bởi methyl jasmonate (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của methyl jasmonate lên sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của dịch treo tế bào

Methyl jasmonate (mg/l)	Chỉ số tăng trưởng	Hoạt tính của taxol (mg/l)
0	$0,23 \pm 0,04^{a}$	$0,50 \pm 0,01^{a}$
10	$0,21 \pm 0,02^{a}$	$0,74 \pm 0,03^{c}$
20	$0,23 \pm 0,03^{a}$	$0,67 \pm 0,03^{bc}$
30	$0,18 \pm 0,03^{a}$	$0,65 \pm 0,03^{b}$
40	$0,15 \pm 0,01^{a}$	$0,65 \pm 0,02^{b}$

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

Ảnh hưởng của phenylalanine lên sự sinh tổng hợp taxol của dịch treo tế bào

Hoạt tính của taxol trong dịch treo tế bào tăng theo sự gia tăng nồng độ phenylalanine trong môi trường nuôi cấy. Hoạt tính của taxol cao nhất với phenylalanine 20 và 30 mg/l. Phenylalanine không ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào (bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của phenylalanine lên sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của dịch treo tế bào

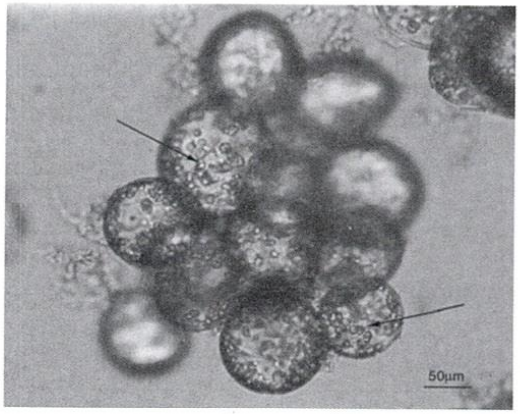
Phenylalanine (mg/l)	Chỉ số tăng trưởng	Hoạt tính của taxol (mg/l)
0	$0,23 \pm 0,04^{a}$	$0,50 \pm 0,01^{a}$
10	$0,28 \pm 0,04^{a}$	$0,61 \pm 0,01^{b}$

20	$0,20 \pm 0,03^{a}$	$0,70 \pm 0,03^{e}$
30	$0,23 \pm 0,03^{a}$	$0,72 \pm 0,03^{e}$

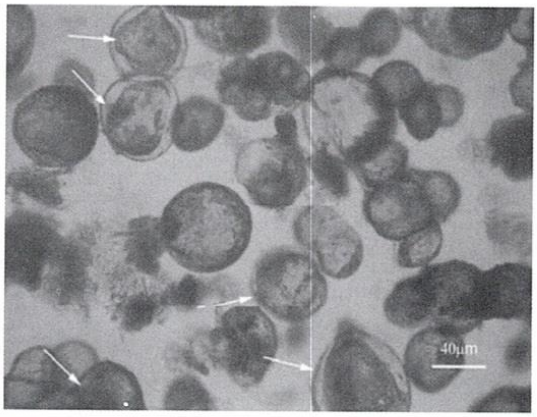
Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Ảnh hưởng của saccharose lên sự sinh tổng hợp taxol của dịch treo tế bào

Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào càng giảm khi nồng độ saccharose trong môi trường nuôi cấy càng tăng. Hiện tượng co nguyên sinh của tế bào dịch treo được quan sát dưới kính hiện vi ở nồng độ saccharose 40 g/l (ảnh 4, 5).



Ảnh 4. Tế bào dịch treo trong môi trường có nồng độ saccharose 30 g/l. Mũi tên chỉ các hạt tinh bột trong tế bào



Ảnh 5. Tế bào dịch treo trong môi trường có nồng độ saccharose 40 g/l. Mũi tên chỉ tế bào đang ở trạng thái co nguyên sinh

Dịch treo tế bào gần như không tăng trưởng với saccharose 80 và 100 g/l. Ngược lại, hoạt tính của taxol tăng khi tăng nồng độ saccharose trong môi trường nuôi cấy và cao nhất (0,8 mg/l) với saccharose 60 g/l. Sự tiếp tục gia tăng nồng độ saccharose làm giảm hoạt tính của taxol trong dịch treo tế bào (bảng 6).

Bảng 6. Ảnh hưởng của saccharose lên sự tăng trưởng và hoạt tính taxol của dịch treo tế bào

Saccharose (g/l)	Chỉ số tăng trưởng	Hoạt tính của taxol (mg/l)
30	$0,23 \pm 0,02^{d}$	$0,50 \pm 0,01^{a}$
40	$0,20 \pm 0,02^{cd}$	$0,67 \pm 0,02^{b}$
60	$0,16 \pm 0,02^{c}$	$0,80 \pm 0,03^{c}$
80	$0,08 \pm 0,06^{b}$	$0,65 \pm 0,03^{b}$
100	$0,02 \pm 0,00^{a}$	$0,44 \pm 0,02^{a}$

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

4. THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự sinh tổng hợp taxol

Thời gian nuôi cấy càng dài, sự tăng trưởng của mô sẹo càng giảm, nhưng sự sinh tổng hợp taxol càng tăng (bảng 1). Trong tế bào thực vật, taxol kết dính các tiểu đơn vị tubulin của vi ống, trạng thái cân bằng động của vi ống bị phá vỡ, ảnh hưởng đến sự phân chia của tế bào (Morejohn và cộng sự, 1984) [14]. Do đó, sự sinh tổng hợp và tích luỹ của taxol trong tế bào theo thời gian nuôi cấy sẽ cản sự phân chia của tế bào và làm chậm sự tăng trưởng của mô sẹo.

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh tổng hợp taxol

Mỗi enzyme có một nhiệt độ tối thích để hoạt động. Nhiệt độ ảnh hưởng trên sự tăng trưởng và sinh tổng hợp taxol của dịch treo tế bào thông qua hoạt động của các enzyme trong các con đường biến dưỡng có liên quan. Trong khoảng nhiệt độ được khảo sát (22 – 31 °C), sự tăng trưởng của mô sẹo và dịch treo tế bào Thông đỏ Lâm Đồng tối đa ở 25°C, và càng giảm khi nhiệt độ của môi trường nuôi cấy càng tăng (bảng 2). Sự gia tăng nhiệt độ có thể ảnh hưởng đến hoạt tính của các enzyme tham gia vào các con đường biến dưỡng tạo các sản phẩm bậc một để cung cấp năng lượng và nguyên liệu cho sự tăng trưởng và phân chia tế bào (Choi và cộng sự, 2000) [4]. Hoạt tính taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào Thông đỏ tăng dần theo sự gia tăng nhiệt độ của môi trường nuôi cấy, cao nhất ở 28°C (0,76 mg/l đối với sẹo và 0,59 mg/l đối với dịch treo tế bào), giảm ở 31°C. Như vậy nhiệt độ tối thích cho sự tăng trưởng tế bào khác với nhiệt độ tối thích cho sự tạo taxol. Choi và cộng sự (2000) cũng ghi nhận dịch treo tế bào *Taxus chinensis* tăng trưởng tốt nhất ở 24°C trong khi sự sinh tổng hợp taxol cao nhất ở 29°C [4].

Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự sinh tổng hợp taxol

Ở nhiều loài thực vật, ngoài tác động lên sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo được nuôi cấy *in vitro*, ánh sáng còn ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp trong tế bào do liên quan đến sự hoạt động của một số enzyme nội bào (Fett-Neto và cộng sự, 1995) [8]. Sự tăng trưởng của mô sẹo và dịch treo tế bào từ thân non cây Thông đỏ Lâm Đồng bị cản mạnh trong điều kiện chiếu sáng nhưng hoạt tính của taxol cao hơn so với trong tối (bảng 3). Mặt khác, mô sẹo trong điều kiện chiếu sáng có màu nâu đậm hơn khi được nuôi trong tối. Khác với kết quả trên *Taxus cuspidata* (Fett-Neto và cộng sự, 1995) [8], ánh sáng cản đồng thời sự tăng trưởng của dịch treo tế bào và sự sinh tổng hợp taxol.

Sự chậm tăng trưởng của mô sẹo dưới ánh sáng được giải thích qua sự tăng cường sinh tổng hợp các hợp chất phenol. Các hợp chất này liên kết với một số enzyme liên quan đến sự tăng trưởng của tế bào và ngăn cản sự hoạt động của các enzyme này (Page và cộng sự, 1987) [16]. Các hợp chất phenol sau khi tổng hợp có thể tiết ra ngoài và bị oxy hoá làm cho mô sẹo và môi trường nuôi cấy có màu nâu. Ánh sáng còn có thể cản sự tăng trưởng của tế

bào thực vật do cản mHMGR, enzyme chìa khoá trong sự sinh tổng hợp mevalonate (tiền chất của gibberellin và cytokinin và của các sterol trên màng tế bào) đang hoạt động mạnh trong những tế bào đang phân chia (Narita và cộng sự, 1989) [15].

Ảnh hưởng của methyl jasmonate lên sự sinh tổng hợp taxol

Methyl jasmonate và acid jasmonic là những hợp chất được xem như nhóm chất điều hoà sinh trưởng thực vật có vai trò trong sự lão suy của thực vật, tham gia vào con đường truyền tín hiệu ngoại sinh (stress, vết thương, sinh vật gây bệnh) và cảm ứng hoạt động của hệ thống phòng thủ ở thực vật. Methyl jasmonate khởi động sự phiên mã mRNA *de novo* của các gen *PAL* dẫn tới sự tạo Phenylalanine ammonia-lyase, enzyme đầu tiên của con đường phenylpropanoid liên quan chặt chẽ đến sự sản xuất các hợp chất thứ cấp ở thực vật (Brincat và cộng sự, 2002) [1]. Methyl jasmonate hầu như không ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào. Tuy nhiên, hàm lượng taxol trong dịch treo tế bào tăng cao khi methyl jasmonate được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Hàm lượng taxol cao nhất trong tế bào dịch treo với methyl jasmonate 10 mg/l là 0,74 mg/l (bảng 4). Ở methyl jasmonate nồng độ 20, 30 và 40 mg/l, hoạt tính của taxol giảm có thể do methyl jasmonate nồng độ cao có những bất lợi đến hoạt động biến dưỡng của tế bào và thậm chí có làm chết tế bào (Kim và cộng sự, 2005) [12] ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp taxol.

Ảnh hưởng của phenylalanine lên sự sinh tổng hợp taxol

Phenylalanine là tiền chất của nhiều hợp chất thứ cấp của tế bào thực vật như anthocyanin (Edahiro và cộng sự, 2005) [6] hay taxol (Fett-Neto và cộng sự, 1993) [7]... Taxol là một alkaloid diterpenoid, có mạch nhánh được tạo thành từ phenylalanine nhờ phản ứng xúc tác của aminomutase, enzyme xúc tác sự tái sắp xếp vị trí của nhóm amin, sự hydroxyl hoá ở vị trí C_2 và sự benzoyl hoá khi gắn kết phenylisoleucin với baccatin III để tạo thành taxol (Brincat và cộng sự, 2002) [1]. Sự hiện diện của phenylalanine làm tăng hoạt tính taxol trong dịch treo tế bào (bảng 5), đặc biệt là phenylalanine 20 và 30 mg/l nhưng dường như không ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào. Như vậy, sự tăng trưởng của dịch treo tế bào và sự sinh tổng hợp taxol là hai quá trình khác nhau.

Ảnh hưởng của saccharose lên sự sinh tổng hợp taxol

Sự gia tăng nồng độ saccharose trong môi trường nuôi cấy làm giảm sự tăng trưởng của dịch treo tế bào. Ở nồng độ saccharose 100 g/l, sự tăng trưởng của dịch treo tế bào gần như hoàn toàn không xảy ra. Về mặt cơ bản, sự gia tăng nồng độ đường có hai tác động khác nhau trên các đặc tính sinh lý của dịch treo tế bào thực vật. Tác động thứ nhất là làm thay đổi các yếu tố vật lý của môi trường xung quanh tế bào do sự gia tăng áp suất thẩm thấu và tác động thứ hai là nguồn carbohydrate sẵn sàng để cung cấp cho các hoạt động sống của tế bào (Kim và cộng sự, 2001) [11]. Sự tăng cao nồng độ

đường gây ra trạng thái co nguyên sinh của tế bào, làm xáo trộn hoạt động biến dưỡng của tế bào và kết quả là sự giảm tăng trưởng của tế bào. Ngược lại, áp suất thẩm thấu của môi trường tăng sẽ trở thành một tín hiệu cảm ứng con đường sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp (Panda và cộng sự, 1992) [17] bao gồm cả taxol. Tuy nhiên, một áp suất thẩm thấu quá cao (nồng độ saccharose 80 và 100 g/l) có thể làm xáo trộn các hoạt động biến dưỡng, cản trở sự sinh tổng hợp taxol. Kết quả nghiên cứu này tương tự như kết quả nghiên cứu của Kim và cộng sự (2001) [11] trên đối tượng là dịch treo tế bào *Taxus chinensis*.

5. KẾT LUẬN

- Sự kéo dài thời gian nuôi cấy làm tăng sự sinh tổng hợp taxol đồng thời với sự giảm tăng trưởng của mô sẹo.

- Điều kiện chiếu sáng thúc đẩy sự sinh tổng hợp taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào.

- Nhiệt độ tối ưu cho sự tăng trưởng và sự sinh tổng hợp taxol của mô sẹo và dịch treo tế bào là 25°C.

- Các yếu tố có tác động hiệu quả đến sự sinh tổng hợp taxol của dịch treo tế bào là methyl jasmonate 10 mg/l và phenylalanine 20 mg/l.

- Saccharose 60 g/l làm tăng sự sinh tổng hợp taxol nhưng làm giảm sự tăng trưởng của dịch treo tế bào.

USING BIOTEST TO ESTIMATE TAXOL PRODUCTION FROM CELL SUSPENSION CULTURE OF *TAXUS WALLICHIANA* ZUCC. IN DIFFERENT CONDITIONS OF CULTURE

Le Thi Thuy Tien[(1)], Bui Trang Viet[(2)], Nguyen Duc Luong [(1)]

(1) University of Technology, VNU-HCM

(2) University of Science, VNU-HCM

***ABSTRACT**: Calli and cell suspension cultures were initiated from Lam Dong Yew (Taxus wallichiana* Zucc.*) young stem explants, on B5 medium supplemented with 2,4-D and kinetin at appropriate concentrations. Taxol content was estimated by using a root primordium biotest with hypocotyl cuttings of Phaseolus aureus* Roxb. *(green bean). Results showed that taxol production was influenced by different conditions of culture, such as culture time, temperature, medium osmotic pressure or methyl jasmonate... The growth of calli were inhibited if they were lighted or maintained for a long time on medium culture but taxol synthesis was stimulated. Phenylalanine (as organic precusor), methyl jasmonate (as biotic elicitor) as well as a high osmotic pressure induced taxol accumulation.*

***Keywords:** Calli, cell suspension, Taxus wallichiana* Zucc., *taxol.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. M.C. Brincat, D.M. Gibson, M.L. Shuler, *Alterations in taxol production in plant cell culture via manipulation of phenylalanine ammonia lyase pathway*, *Biotechnol. Prog*, 18: 1149 – 1156 (2002).

[2]. S. K. Chattopadhyay, S. Kumar, S.N. Srivastava, Singh A., K. R. S. Tirupadiripuliyur, A. K. Garg, S.P. Singh, *Process for preparing brevifoliol. United State Patent application 20040127741* (2004).

[3]. Y-Q. Chen, F. Yi, M. Cai, J-X. Luo, *Effects of amino acids, nitrate, and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of Taxus yunnanensis. Plant Growth Regulation*, 41: 265–268 (2003).

[4]. H.K. Choi, S.I. Kim, J.S. Son, S.S. Hong, H.S. Lee, H.J. Lee, *Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of Taxus chinensis. Enzyme and Microbial Technology* 27: 593–598 (2000).

[5]. M. Collins-Pavao, C.K. Chin, H. Pedersen, *Taxol partitioning in two-phase plant cell cultures of Taxus brevifolia. Journal of Biotechnology* (49): 95 – 100 (1996).

[6]. J. Edahiro, M. Nakamura, M. Seki, *Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into medium. Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99 (1):43-47 (2005).

[7]. A.G. Fett-Neto, S.J. Melanson, K. Sakata, F. DiCosmo, *Improved growth and taxol yield in developing calli of Taxus cuspidata by medium composition modification. Biotechnology* 11: 731-734 (1993).

[8]. A. G. Fett-Neto, J. J. Pennington, F. DiCosmo, *Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of Taxus cuspidata Sieb and Zucc. J. Plant Physiol.*, 146: 584 – 590 (1995).

[9]. O. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojima, *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res* (50): 151-158 (1968).

[10]. M. Jaziri, A. Zhiri, Y.W. Guo, J. P. Dupont, K. Shimomura, H. Hamada, M. Vanhaelen, J. Homes, *Taxus sp. cell, tissue and organ cultures as alternative source for taxoids production: a literature survey. Plant Cell Tissue Organ Cult.* 46, 59 – 75 (1996).

[11]. S-I. Kim, H-K. Choi, J-H. Kim, H-S Lee, S-S. Hong, *Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of Taxus chinensis. Enzyme and Microbial Technology*, 28: 202 – 209 (2001).

[12]. B.J. Kim, D.M. Gibson, M.L. Shuler, *Relationship of viability and apoptosis to taxol production in Taxus sp. suspension cultures elicited with methyl jasmonate. Biotechnol. Prog*, 21, 700-707 (2005).

[13]. J. Luo, G.Y. He, *Optimization of elicitors and precursors for paclitaxel production*

in cell suspension culture of Taxus chinensis in the presence of nutrient feeding. Process Biochemistry, 30: 1 – 8 (2003).

[14]. L. C. Morejohn, D. E. Fosket, *Taxol-induced rose microtubule polymerization in vitro and its inhibition by colchicine. The Journal of Cell Biology*, 99, 141-147 (1984).

[15]. J.O. Narita, W. Gruissem, *Tomato hydroxymethylglutaryl CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. The Plant Cell, 1: 181 –* 190 (1989).

[16]. Y. M. Page, J. Van Staden, *Hypoxoside production in tissue cultures of Hypoxis rooperi. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 9 (2): 131 - 136 (1987).

[17]. A. K Panda., S. Mishram, V. S. Bisaria, *Alkaloid production by plant cell suspension cultures of Holarrhena antidysenterica: I. Effect of major nutrients. Biotechnology and Bioengineering,* 39: 1043 – 1051 (1992).

[18]. A. Silvestrini, G. Pasqua, B. Botta, B. Monacelli, R. van der Heijden, R. Verpoorte, *Effect of alkaloid precursor feeding on a Camptotheca acuminata cell line. Plant Physiology and Biochemistry,* 40: 749-753 (2000).

[19]. Lê Thị Thuỷ Tiên, Bùi Trang Việt, Nguyễn Đức Lượng, *Sự tạo mô sẹo và dịch treo 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(1): 1 – 6 (2006).

[20]. Lê Thị Thuỷ Tiên, Bùi Trang Việt, Nguyễn ĐứcLượng, *Tìm hiểu về sự tăng trưởng của dịch treo tế bào Taxus wallichiana Zucc. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ ĐHQG TPHCM*, 9(5): 47 – 51 (2006).

[21]. Lê Thị Thuỷ Tiên, Bùi Trang Việt, Nguyễn Đức Lượng, *Tác động của taxol trên sự phân chia tế bào trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh (Phaseolus aureus* Roxb.). *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ ĐHQG TPHCM*, 1(13): 43 – 47 (2010).

[22]. D.D.L. Woo, S.Y.P. Miao, J.C. Pelayo, A.S. Woollf, *Taxol inhibits progression of congenital polycystic kidney disease. Nature 368, 750 – 753 (1994).*