TÌM HIỂU VỀ SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA DỊCH TREO TẾ BÀO *TAXUS WALLICHIANA* ZUCC

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 06 tháng 01 năm 2001, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 17 tháng 05 năm 2006)

***TÓM* TẮT:** *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 khóang B5 có bổ sung 2,4-D 4mg/l + kinetin 1mg/l. Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào chịu ảnh hưởng bởi hàm lượng saccharose và hàm lượng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong môi trường nuôi cấy. Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào tốt nhất khi trong môi trường nuôi cấy có sự hiện diện của saccharose 30g/l và 2,4-D 5mg/l kết hợp với kinetin 0,5mg/l. Sự tiết các hợp chất polyphenol ra môi trường nuôi cấy làm giảm sự tăng trưởng của dịch treo tế bào và việc sử dụng PVP hàm lượng 30g/l tỏ ra có khả năng đẩy lùi tác động cản của polyphenol và giúp cho sự tăng trưởng của dịch treo tế bào.*

Từ khoá: dịch treo tế bào, mô sẹo, taxol, ***Taxus wallichiana***

1. MỞ ĐẦU

Taxol được sử dụng làm thuốc chữa một số bệnh ung thư đặc biệt là ung thư vú và ung thư buồng trứng. Sự thu nhận taxol từ vỏ các cây *Taxus* hủy hoại nguồn gen thiên nhiên và ảnh hưởng đến môi trường sinh thái (Seiki và Furusaki, 1996) [9]. Việc sản xuất taxol từ các hệ thống tế bào *in vitro* đã và đang được đặc biệt quan tâm bởi các nhà khoa học ở nhiều nước trên thế giới, vì đây là phương pháp được xem như ổn định nhất và hiệu quả nhất để sản xuất taxol (Jaziri và cộng sự, 1996) [6]. Dịch treo tế bào là hệ thống tế bào thường được sử dụng nhất và đã áp dụng thành công ở nhiều loài thực vật để thu nhận các hợp chất thứ cấp nói chung và alkaloid nói riêng (DiCosmo và cộng sự, 1996; Fisher và cộng sự, 1999) [3, 4]. Sự tăng trưởng của dịch treo tế bào chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố vật lý (nhiệt độ, ánh sáng, độ thông khí...) cũng như thành phần và hàm lượng các chất trong môi trường nuôi cấy như saccharose, các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, các chất chống oxy hoá các hợp chất phenol do tế bào tiết ra môi trường nuôi cấy (acid citric, acid ascorbic...) hay chất liên kết với các hợp chất phenol như PVP (polyvinyl pyrollidone) ... (Dicosmo và cộng sự, 1996) [3]. Do đó, trong bài này chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của saccharose, 2,4-D phối hợp với kinetin, PVP và acid ascorbic trên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào cây thông đỏ Lâm Đồng *Taxus wallichiana* Zucc.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Mô sẹo từ thân non *Taxus wallichiana* Zucc. (thông đỏ Lâm Đồng) được nuôi cấy trên môi trường B5 (Gamborg và cộng sự, 1968) [5] có bổ sung 2,4-D 4mg/l kết hợp với kinetin 1mg/l (Cusidó và cộng sự 2002) [2] và đã qua 4 – 6 lần cấy chuyền.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Nuôi cấy dịch treo tế bào

Dịch treo tế bào được tạo bằng cách đặt mô sẹo vào môi trường B5 lỏng với saccharose 20g/l, 2,4-D 4mg/l, kinetin 1mg/l và được lắc ở vận tốc 80 vòng/phút, ở trong tối, nhiệt độ 22 ± 2^{oC}, ẩm độ 70 ± 2%. Dịch treo tế bào được cấy chuyền sau mỗi 2 tuần. Đường cong tăng trưởng của dịch treo tế bào theo thể tích tế bào lắng (SCV, settled cell volume) được xác định.

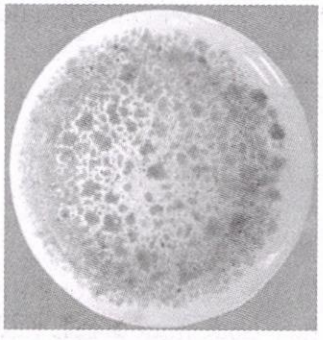
2.2.2. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose, sự phối hợp 2,4-D và kinetin, PVP và acid ascorbic trên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào

Saccharose 20, 30 và 40g/l, 2,4-D 1 – 5mg/l kết hợp với kinetin 0,5 và 1mg/l, PVP 15, 30 và 60mg/l và acid ascorbic 15, 30 và 60mg/l được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Khảo sát sự gia tăng SCV của dịch treo tế bào sau 2 tuần nuôi cấy.

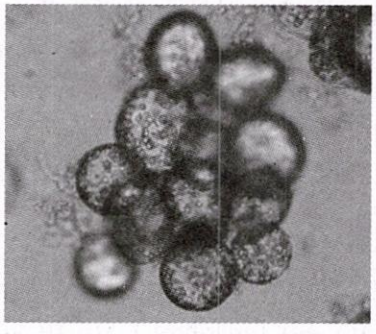
3. KẾT QUẢ, THẢO LUẬN

3.1.Sự tạo dịch treo tế bào

Sự phóng thích các nhóm nhỏ tế bào và các tế bào đơn từ mô sẹo vào môi trường lỏng được thấy rõ sau 1 - 2 tuần nuôi cấy. Dịch treo tế bào ổn định sau 3 – 4 lần cấy chuyền. Dịch treo tế bào ban đầu có màu vàng nhạt, kích thước các cụm tế bào không đều nhau (ảnh 1). Dưới kính hiển vi, tế bào có dạng tròn, nguyên sinh chất đậm đặc với nhiều hạt tinh bột (ảnh 2)

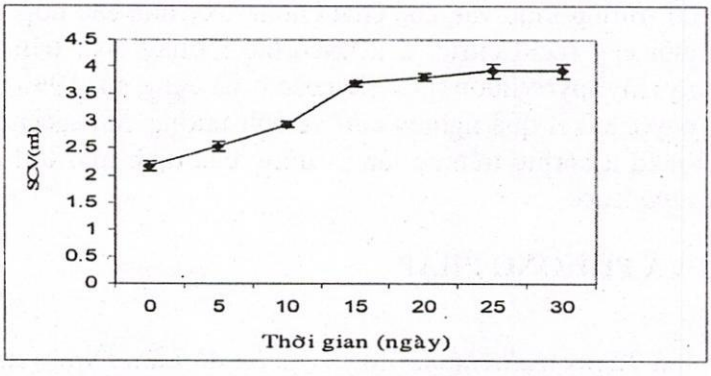


Ảnh 1. Dịch treo tế bào từ mô sẹo có nguồn gốc thân non trong môi trường với saccharose 20g/l, 2,4-D 4mg/l và kinetin 1mg/l sau lần cấy chuyền đầu tiên



Ảnh 2. Cụm tế bào trong dịch treo tế bào từ mô sẹo có nguồn gốc thân non trong môi trường với saccharose 20g/l, 2,4-D 4mg/l và kinetin 1mg/l sau lần cấy chuyền đầu tiên

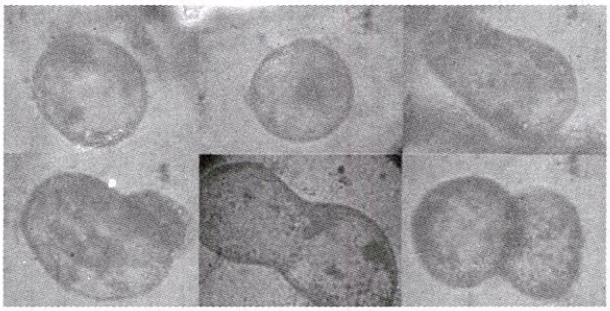
Dịch treo tế bào từ thân non tăng trưởng chậm (hình 1). Sau nhiều lần cấy chuyền, cụm tế bào trong dịch treo vẫn duy trì hình dạng giống như ban đầu nhưng màu sắc chuyển từ nâu nhạt sang nâu đậm đồng thời với sự giảm tăng trưởng của dịch treo tế bào.



Hình 1. Đường cong tăng trưởng của dịch treo tế bào từ thân non Taxus wallichiana trong môi trường lỏng với saccharose 20g/l, 2,4-D 4mg/l và kinetin 1mg/l

Sau 4 tháng nuôi cấy, dịch treo tế bào gồm các cụm (kích thước 0,05 – 1,5mm) và các tế bào cô lập. Dưới kính hiển vi có thể quan sát thấy tinh bột trong tế bào cô lập cũng như trong cụm tế bào nhưng số lượng ít hơn so với thời gian đầu.

Trong các tế bào cô lập, các hạt tinh bột chủ yếu tập trung ở vùng dưới màng nguyên sinh chất (ảnh 3). Sự giảm tăng trưởng của dịch treo tế bào có lẽ phần nào liên quan đến sự giảm số lượng các hạt tinh bột trong tế bào.

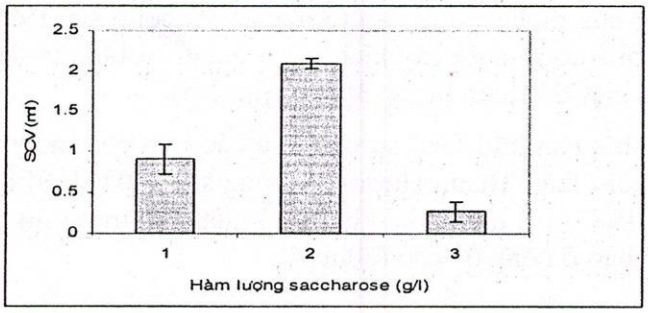


Ảnh 3. Tế bào cô lập trong dịch treo tế bào trong môi trường có saccharose 20g/l, 2,4-D 4m/l và kinetin 1mg/l sau 4 tháng nuôi cấy

3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose trong môi trường nuôi cấy trên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào

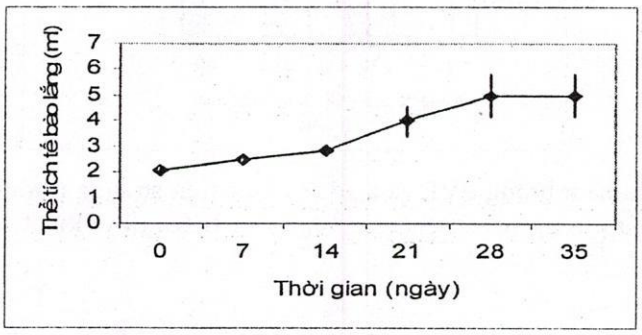
Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose trên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào được đánh giá qua sự gia tăng thể tích tế bào lắng sau 2 tuần nuôi cấy (cuối giai đoạn tăng trưởng nhanh của dịch treo tế bào như được chỉ trong hình 1).

Hàm lượng saccharose 30g/l trong môi trường nuôi cấy giúp cho sự tăng trưởng của huyền phù tế bào tốt hơn so với hàm lượng 20g/l và 40g/l (hình 2), kết quả này phù hợp với nhận xét của Kim và cộng sự (2001) [7] khi nuôi cấy tế bào *Taxus chinensis*. Saccharose 20g/l trong môi trường nuôi cấy có lẽ không cung cấp đủ năng lượng cho các hoạt động biến dưỡng của tế bào trong môi trường trường lỏng nên sự phân chia tế bào xảy ra yếu dẫn đến sự gia tăng thể tích tế bào lắng thấp. Saccharose 40g/l làm tăng áp suất thẩm thấu của môi trường lỏng, gây trở ngại cho các hoạt động biến dưỡng của tế bào nên góp phần vào việc hạn chế sự tăng trưởng của dịch treo tế bào.



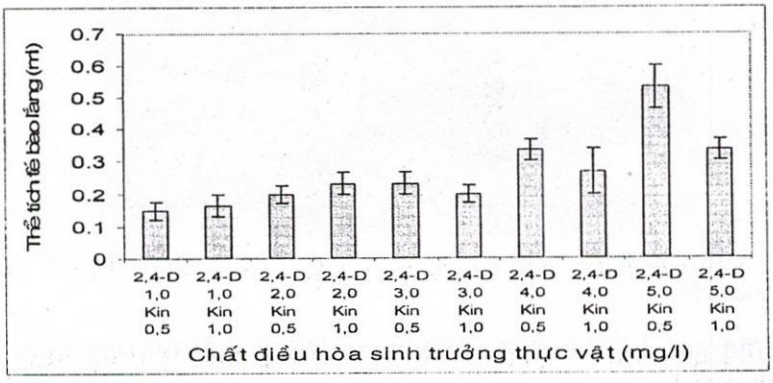
Hình 2. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose trên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào sau 2 tuần nuôi cấy trong môi trường với 2,4-D 4mg/l và kinetin 1mg/l

Saccharose 30g/l (biểu đồ 3) giúp thể tích tế bào lắng tăng gấp 3 lần sau 21 ngày nuôi cấy mà điều này không đạt được với saccharose 20g/l trong môi trường nuôi cấy.



Hình 3. Đường cong tăng trưởng của dịch treo tế bào trong môi trường với saccharose 30g/l, 2,4-D 4mg/l và kinetin 1mg/l

3.3.Ảnh hưởng của hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng thực vật trên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào



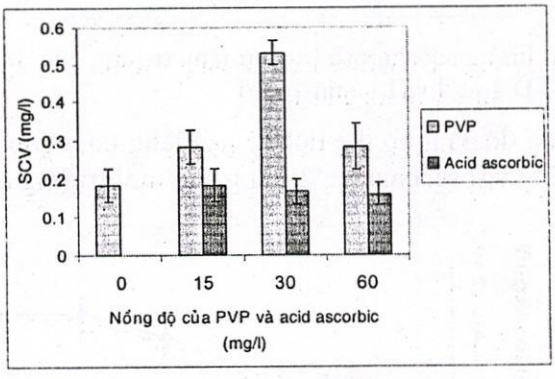
Hình 4. Ảnh hưởng của hàm lượng 2,4-D và kinetin trên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào trong môi trường với saccharose 30g/l

Sự gia tăng hàm lượng 2,4-D trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng tích cực đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào. Khi môi trường có 2,4-D ở hàm lượng thấp (1 – 2mg/l), sự tăng trưởng của dịch treo tế bào tỏ ra tốt hơn khi hàm lượng kinetin cao (1mg/l). Ngược lại, khi hàm lượng 2,4-D cao (3 – 5mg/l), sự tăng trưởng của dịch treo tế bào tốt hơn khi hàm lượng kinetin thấp (0,5mg/l). Trong tất cả các môi trường khảo sát, môi trường có bổ sung 2,4-D 5mg/l phối hợp với kinetin 0,5mg/l có hiệu quả cao nhất đối với sự tăng trưởng của dịch treo tế bào (hình 4).

3.5.Ảnh hưởng của PVP và acid ascorbic trên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào

PVP có vai trò liên kết với các hợp chất polyphenol, ngăn cản tác động của các hợp chất này lên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào (Salzman và cộng sự, 1999) [8]. Vì vậy, sự hiện diện của PVP trong môi trường nuôi cấy kích thích mạnh sự tăng trưởng của dịch treo tế bào *Taxus wallichiana*, đặc biệt là ở hàm lượng 30mg/l (hình 5).

Acid ascorbic là chất cản hữu hiệu sự oxy hóa các hợp chất polyphenol do tế bào tiết ra trong các dịch treo chuối (Trần Thanh Hương và cộng sự, 2003) [10] hay *Solanum laciniatum* (Chandler và cộng sự, 1983) [1] nhưng lại không có hiệu quả trong thí nghiệm này và cản tăng trưởng của dịch treo tế bào ở nồng độ cao (60mg/l).



Hình 5. Ảnh hưởng của hàm lượng PVP và acid ascorbic trên sự tăng trưởng của dịch treo tế bào sau 2 tuần nuôi cấy (trong môi trường với saccharose 30g/l, 2,4-D 5mg/l và kinetin 0,5ng/l)

4. KẾT LUẬN

Sự thay đổi hàm lượng của một số chất trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến sự tăng trưởng của dịch treo tế bào từ mô sẹo có nguồn gốc thân non *Taxus wallichiana*.

Saccharose 30g/l, 2,4-D 5mg/l và kinetin 0,5mg/l trong môi trường nuôi cấy có hiệu quả cao trên sự gia tăng thể tích tế bào lắng của dịch treo tế bào. PVP hàm lượng 30mg/l giúp cho sự tăng trưởng của dịch treo tế bào, tuy nhiên, acid ascorbic hòan tòan không có hiệu quả trong trường hợp này. Trong tương lai, chúng tôi tiếp tục tìm hiểu sự sản xuất taxol và các hợp chất liên quan từ dịch treo tế bào thu được.

Lời cảm ơn : *Chân thành cám ơn Trung tâm Nghiên cứu Lâm sinh Lâm Đồng đã hỗ trợ nguyên liệu thực vật, GSTS Mai Trần Ngọc Tiếng và PGS TS Trần Văn Minh đã cho những ý kiến quí báu.*

STUDYING ON GROWTH OF *TAXUS WALLICHIANA ZUCC.* CELL SUSPENSION CULTURES

Le Thi Thuy Tien[(1)], Bui Trang Viet[(2)], Nguyen Duc Luong[(1)]
(1) University of Technology, VNU- HCM
(2)University of Natural Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT *: Taxus wallichiana Zucc. cell suspension cultures were made from calli derived from young stem segments of Lamdong Taxus wallichiana, on B5 medium with 30g/l sucrose, 5mg/l 2, 4-D and 0,5mg/l kinetin. Polyphenols excreted by cells reduced cell suspension growth. Polyvinyl pirrolidone (PVP, 30mg/l) limited effect of polyphenols and increased growth of these cell suspensions.*

Key words: *calli, cell suspension, polyvinyl pirrolidone, taxol, Taxus wallichianana*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Chandler, S.F. and J.H. Dodds, *Plant Cell Rep.* **2:** 205-208, 1983.

[2]. Cusidó, R. M., Palazón, J., Bonfill, M., Navia-Osorio, A., Morales, C. and Pĩnol, M. T. *Biotechnol, Prog.* (18): 418–423 , 2002.

[3]. Dicosmo F., Misawa M. *CRC Press.* 232p, 1996.

[4]. Fischer, R., Emans, N., Schuster, F., Hellwig, S. and Drossard, J. , *Biotechnol, Appl. Biochem.* (30): 109–112, 1999.

[5]. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. *Exp Cell Res* 50: 151-58, 1968.

[6]. Jaziri, M., Zhiri, A., Guo, Y. W., Dupont, J. P., Shimomura K., Hamada, H., Vanhaelen M., Homès, J. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 46, 59 – 75, 1996.

[7]. Kim, S-I., Choi, H-K., Kim, J-H., Lee, H-S. and Hong, S-J. *Enzyme and Microbial Technology* (28): 202–209 (2001).

[8]. Salzman, R.A., T. Fujita, K. Zhu-Salzman, P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. *Plant molecular biology reporter,* 17, 11–17, 1999.

[9]. Seiki M., Furusaki S. *Chemtech* 26 (3), 41–45, 1996.

[10]. Trần Thanh Hương và Bùi Trang Việt, 2003, *Tài liệu Hội nghị những vấn đề nghiên cứu cơ bản,* Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, 326 – 329, 2003.