

TÁC ĐỘNG CỦA TAXOL TRÊN SỰ PHÂN CHIA TẾ BÀO TRỤ HẠ DIỆP CÂY MÀM ĐẬU XANH (*PHASEOLUS AUREUS* ROXB.)

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 07 tháng 10 năm 2008, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 11 tháng 01 năm 2010)

TÓM TẮT: Khả năng ức chế sự phân chia tế bào thực vật của taxol được chứng minh qua tác động ức chế sự tạo phác thể rễ, sự kéo dài rễ và sự tạo mô sẹo từ trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh. Quá trình tạo phác thể rễ và tạo sẹo của trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh bị hạn chế khi có sự hiện diện của taxol trong môi trường nuôi cấy, đặc biệt với nồng độ 1,0 mg/l. Colchicine 15 mg/l có thể ức chế tác động của taxol trên sự tạo rễ nhưng không ức chế được tác động của taxol trên sự tạo mô sẹo.

Từ khóa: cỏ rễ, colchicine, mô sẹo, phác thể rễ, taxol, *Taxus* sp., trụ hạ diệp.

1. GIỚI THIỆU

Trong điều kiện bình thường, sự tăng trưởng và phát sinh hình thái của thực vật chịu sự điều khiển của chương trình phát triển nội sinh và sự tác động của các yếu tố môi trường. Trong cả hai trường hợp, chất điều hoà sinh trưởng thực vật đều tham gia vào sự phân chia và biệt hoá tế bào [10].

Quá trình tạo rễ ở cành giâm gồm ít nhất hai giai đoạn: tạo phác thể rễ cần auxin ở nồng độ cao và kéo dài phác thể rễ để trở thành rễ thực sự cần auxin ở nồng độ thấp [5]. Sự kéo dài phác thể rễ bao gồm sự kéo dài tế bào sẵn có và sự tiếp tục phân chia của các tế bào phác thể rễ. Mô sẹo là một khối tế bào không phân hoá, hình thành từ các mô hoặc cơ quan đã phân hoá dưới các điều kiện đặc biệt (vết thương..., xử lý với các chất điều hoà sinh trưởng...) và có đặc tính phân chia mạnh.

Taxol, một alkaloid diterpenoid, được thu nhận từ các bộ phận của cây thuộc giống *Taxus*. Ở động vật, taxol có khả năng tác động lên vi ống làm chu trình tế bào bị ngừng lại ở giai đoạn G₂M [3; 11]. Ở thực vật, taxol ức chế sự thành lập vách ngăn ngang giữa tế bào mẹ để tạo hai tế bào con do ức chế sự khừ trùng hợp vi ống [1; 7]. Vi ống được tạo thành khi có sự hiện diện của taxol rất bền dẫn đến sự rối loạn chức năng thông thường của tế bào, và tế bào bị chết do trạng thái cân bằng động của vi ống bị phá vỡ [9]. Ngược với taxol, colchicine - một chất được thu nhận từ cây *Colchicum autumnale*, là tác nhân kích thích sự khừ trùng hợp vi ống, có khả năng ngăn ức chế tác động của taxol trên vi ống [6].

Hoạt động phân chia tế bào trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh trong quá trình tạo mô sẹo cũng

như tạo phác thể rễ chịu ảnh hưởng bởi nồng độ taxol và vai trò đối kháng của colchicine được chứng minh trong nghiên cứu này.

2. NGUYÊN LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh *in vitro* (*Phaseolus aureus* Roxb.) 3 ngày tuổi *in vitro* được gieo từ hạt trên môi trường thạch (6 g/l), trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux, nhiệt độ 30 - 32°C.

2.2. Phương pháp

Sự tạo phác thể rễ

Khúc cắt trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh dài 15 mm, ở vị trí cách cỏ rễ 0,5 cm được cắm sâu khoảng 5 mm trong môi trường agar 6 g/l có bổ sung saccharose 20 g/l. Thực hiện 10 khúc cắt trong mỗi bình tam giác. Sự tạo rễ được ghi nhận khi có sự xuất hiện phác thể rễ sau 30 giờ nuôi cấy.

Khảo sát tác động của taxol trên sự tạo phác thể rễ

10 khúc cắt trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh được cấy trong môi trường agar và saccharose có bổ sung 2,4-D 0,05 mg/l và taxol ở các nồng độ 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/l. Ghi nhận số phác thể rễ hình thành sau 30 giờ.

Khảo sát tác động của taxol trong sự kéo dài phác thể rễ

10 khúc cắt trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh được cấy trong môi trường agar với saccharose trong 30 giờ, sau đó chuyển sang môi trường tương tự có bổ sung taxol 1,0 mg/l riêng rẽ hay kết hợp với colchicine ở các nồng độ 5, 10, 15 và 20 mg/l. Xác định số phác thể rễ và số rễ kéo dài sau 30 giờ nuôi cấy tiếp theo. Sự xuất

hiện của rễ được ghi nhận khi rễ có chiều dài từ 1 mm.

Khảo sát tác động của taxol trong sự tạo sẹo

10 lát cắt ngang trụ hạ diệp cây mâm đậu xanh (dày 1 mm, vị trí cách cổ rễ 0,5 cm) được nuôi cấy trên môi trường B5 [2] với agar 6 g/l, saccharose 20 g/l, 2,4-D 0,1 và 0,2 mg/l, và taxol 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/l. Trong nghiệm thức với 2,4-D 0,1 mg/l, mẫu cây được xử lý trong 30 giờ, sau đó chuyển sang môi trường tương tự có bổ sung taxol 1,0mg/l và colchicine 5, 10, 15 và 20mg/l. Xác định số mẫu cây tạo sẹo (bằng mắt thường) sau 60 giờ nuôi cấy.

Quan sát sự xuất hiện phác thể rễ bằng phương pháp giải phẫu và nhuộm hai màu. Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê với hệ số tin cậy là 95%.

3.KẾT QUẢ

3.1.Tác động của taxol trên sự tạo rễ

Sự tạo phác thể rễ

Sự xuất hiện phác thể rễ từ trụ hạ diệp cây mâm đậu xanh được ghi nhận sau 30 giờ nuôi cấy trên môi trường agar 6 g/l với saccharose 20 g/l. Phác thể rễ xuất phát ở vị trí bó mạch, tiếp theo là sự phân chia và kéo dài tế bào của phác thể rễ để trở thành rễ thực sự (ảnh 1, 2 và 3).



Ảnh 1. Bó mạch của trụ hạ diệp cây mâm đậu xanh



Ảnh 2. Phác thể rễ hình thành sau 30 giờ nuôi cấy



Ảnh 3. Sự kéo dài của phác thể rễ sau 60 giờ nuôi cấy

Tác động của taxol lên sự tạo phác thể rễ

Sau 30 giờ nuôi cấy trong môi trường agar có saccharose 20 g/l có bổ sung taxol, tác động ức chế phân chia tế bào của taxol biểu hiện từ trụ hạ diệp cây mâm đậu xanh. Hàm lượng taxol càng tăng, số lượng phác thể rễ càng giảm (bảng 1). Tuy nhiên, khi có 2,4-D 0,05 mg/l trong môi trường nuôi cấy, taxol hoàn toàn không có tác động ức chế sự tạo phác thể rễ.

Bảng 1. Tác động của taxol trên sự tạo rễ từ trụ hạ diệp cây mâm đậu xanh

Nồng độ taxol (mg/l)	Số lượng phác thể rễ
0	51,333 ± 3,180 ^a
0,2	33,333 ± 2,028 ^d
0,4	11,667 ± 1,453 ^c
0,6	8,333 ± 1,764 ^{bc}
0,8	4,667 ± 0,667 ^{ab}
1,0	2,000 ± 0,577 ^a

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

Tác động của taxol trên sự kéo dài phác thể rễ

Sự kéo dài phác thể rễ để trở thành rễ thực sự bị ức chế khi có sự hiện diện của taxol trong môi trường nuôi cấy. Khi đó, số lượng rễ thực sự được tạo ra ít hơn khi không có taxol nhưng số lượng phác thể rễ không được kéo dài lại nhiều hơn (bảng 2).

Bảng 2. Tác động của taxol trên sự tạo rễ sau 60 giờ nuôi cấy

Taxol (mg/l)	Số lượng phác thể rễ	Số lượng rễ
0	12,667 ± 2,333 ^a	38,333 ± 1,856 ^b
1,0	26,000 ± 0,577 ^b	21,000 ± 2,729 ^a

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

Tác động của colchicine trên sự tạo rễ

Trong môi trường tạo rễ có taxol 1mg/l, colchicine không có ảnh hưởng gì đến sự tạo rễ.

Tuy nhiên, colchicine lại có tác động thúc đẩy sự kéo dài phác thể rễ để trở thành rễ thực sự sau khi phác thể rễ hình thành trong môi trường cảm ứng không có taxol (bảng 3).

Bảng 3. Tác động của colchicine trong sự tạo rễ với sự hiện diện của taxol sau 60 giờ nuôi cấy

Thời gian cảm ứng tạo rễ (giờ)	Taxol (mg/l)	Colchicine (mg/l)	Số lượng phác thể rễ	Số lượng rễ
0	1,0	0	3,333 ± 0,667 ^a	0
		5	3,667 ± 0,333 ^a	0
		10	3,333 ± 0,333 ^a	0
		15	3,000 ± 0,577 ^a	0
		20	4,000 ± 1,000 ^a	0
30	1,0	0	26,000 ± 2,082 ^b	21,000 ± 2,309 ^a
		5	24,667 ± 2,906 ^{ab}	29,667 ± 1,453 ^{bc}
		10	22,000 ± 1,528 ^{ab}	30,333 ± 2,333 ^{bc}
		15	18,333 ± 0,667 ^a	34,667 ± 2,333 ^c
		20	23,333 ± 1,667 ^{ab}	26,667 ± 2,404 ^{ab}

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

3.2. Tác động của taxol trên sự tạo mô sẹo từ trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh

Ảnh hưởng của taxol trên sự cảm ứng tạo sẹo

Taxol ức chế sự phân chia của tế bào trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh trong quá trình tạo sẹo với sự cảm ứng của 2,4-D 0,1 mg/l trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, tác động này của taxol không xảy ra với 2,4-D 0,2 mg/l (bảng 4).

Bảng 4. Tác động của taxol trên sự tạo sẹo từ lát cắt trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh

Taxol (mg/l)	Tỷ lệ mẫu cấy tạo sẹo (%)	
	Môi trường có 2,4-D 0,1 mg/l	Môi trường có 2,4-D 0,2 mg/l
0	90,000 ± 5,774 ^c	100,000 ± 0,000
0,2	80,000 ± 10,000 ^{bc}	100,000 ± 0,000
0,4	73,333 ± 6,667 ^{bc}	100,000 ± 0,000
0,6	60,000 ± 11,547 ^{ab}	100,000 ± 0,000
0,8	53,333 ± 8,819 ^{ab}	100,000 ± 0,000
1,0	36,667 ± 8,810 ^a	100,000 ± 0,000

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

Tác động của colchicine trên sự tạo sẹo trong môi trường có 2,4-D 0,1 mg/l và taxol 1,0 mg/l

Colchicine tỏ ra không hiệu quả khi ức chế tác động của taxol trên sự tạo sẹo từ trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh ngay cả khi mẫu cấy đã được cảm ứng tạo sẹo trước khi xử lý với taxol (bảng 5).

Bảng 5. Tác động của colchicine trong quá trình tạo sẹo khi có sự hiện diện của taxol

Thời gian cảm ứng tạo sẹo (giờ)	Colchicine (mg/l)	Số lượng mẫu cấy tạo sẹo
0	0	36,667 ± 3,333 ^a
	5	43,333 ± 6,667 ^a
	10	46,667 ± 8,819 ^a
	15	53,333 ± 12,019 ^a
	20	56,667 ± 6,667 ^a
30	0	33,333 ± 8,819 ^a
	5	46,667 ± 6,667 ^a
	10	46,667 ± 13,333 ^a
	15	43,333 ± 3,333 ^a
	20	53,333 ± 8,819 ^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

Vi ống là thành phần quan trọng của tế bào. Trong quá trình phân chia của tế bào thực vật, vi ống có vai trò rất quan trọng trong interphase, trong sự thành lập thoi vô sắc, sự di chuyển của nhiễm sắc thể về hai cực của tế bào và hình thành phragmoplast. Ngoài ra vi ống còn tham gia vào việc định hướng cho sự sắp xếp của các vi sợi cellulose tạo nên vách tế bào [13]. Taxol ức chế sự phân chia tế bào trong quá trình tạo phác thể rễ, làm giảm đáng kể sự hình thành phác thể rễ so với khi không có taxol (bảng 1). Tuy nhiên, tác động ức chế sự phân chia tế bào của taxol hoàn toàn bị đẩy lùi bởi sự hiện diện của 2,4-D 0,05 mg/l trong môi trường nuôi cấy. Taxol bám ở mặt trong của thành vi ống ở vị trí β -tubulin, tạo mối liên kết chặt chẽ giữa các dimer, ngăn ức chế sự khử trùng hợp của vi ống [8]. Thoi nguyên phân và phragmoplast không được thành lập, hoạt động phân chia của tế bào bị ức chế [1,7]. Taxol kết dính vi ống cô lập từ tế bào cây hoa hồng hiệu quả nhất ở nồng độ 0,21 mg/l [6].

Phác thể rễ từ trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh hình thành từ sự phân chia có định hướng của các tế bào giữa bó mạch (ảnh 2), sẽ tiếp tục phân chia và kéo dài tế bào để trở thành rễ thực sự. Sự hiện diện của taxol trong môi trường nuôi cấy ngăn ức chế sự tiếp tục phân chia tế bào của phác thể rễ do đó số lượng phác thể rễ kéo dài thành rễ ít hơn khi không có taxol (bảng 2). Như vậy, ngoài tác động ức chế sự cảm ứng tạo rễ, taxol còn ức chế sự kéo dài của rễ. Colchicine tác động trên vi ống ngược lại với taxol. Colchicine bám vào dimer tubulin, ngăn ức chế sự trùng hợp của các dimer này thành vi ống [12]. Sự có mặt của colchicine trong môi trường tạo rễ giúp sự phân chia và

kéo dài tế bào phác thể rễ để trở thành rễ thực sự (bảng 3), đặc biệt với colchicine 15 mg/l. Trong môi trường có sự hiện diện đồng thời của taxol và colchicine, số lượng rễ thực sự nhiều hơn khi chỉ có taxol.

Mô sẹo là đám tế bào không phân hoá, có đặc tính phân chia mạnh, hình thành từ sự phân chia vô tổ chức của tế bào. Sự tạo mô sẹo *in vitro* dưới tác động của auxin xảy ra theo một trong ba quá trình: (1) sự phân phân hoá của tế bào nhu mô; (2) sự phân chia của tế bào tương tầng; (3) sự xáo trộn của các mô phân sinh sơ khởi [4]. Quá trình phân chia không định hướng của tế bào nhu mô vô thân trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh dưới tác động của 2,4-D 0,1 mg/l bị hạn chế khi có taxol trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, sự tạo sẹo trong môi trường có 2,4-D 0,2 mg/l không hoàn toàn không bị ảnh hưởng bởi taxol, có lẽ bởi sự hiện diện của auxin nồng độ cao. Colchicine không có tác động đẩy lùi ảnh hưởng của taxol trong quá trình tạo sẹo có thể do 2,4-D là tác nhân cảm ứng mạnh sự phân chia của tế bào trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh.

5. KẾT LUẬN

Sự phân chia tế bào thực vật trong quá trình tạo phác thể rễ và sự tạo mô sẹo từ trụ hạ diệp cây mầm đậu xanh bị ức chế bởi taxol. Nồng độ taxol càng cao, tác động ức chế càng mạnh. Colchicine có vai trò hạn chế tác động ức chế sự phân chia tế bào của taxol trong quá trình tạo rễ nhưng lại không có hiệu quả trong sự tạo mô sẹo.

Thí nghiệm này được thực hiện với mục đích xây dựng một hệ thống sinh trắc nghiệm nhằm đánh giá hoạt tính của taxol trong các hệ thống tế bào *Taxus in vitro* trước khi định lượng chính xác bằng các phương pháp phân tích hiện đại.

INHIBITION OF TAXOL ON THE DIVISION OF GREEN BEAN (*PHASEOLUS AUREUS* ROXB.) HYPOCOTYL CELLS

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

(1)University of Technology, VNU-HCM

(2)University of Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: *Taxol inhibited plant cell division. This was demonstrated by the inhibition of root primordia and callus initiation from mungbean's hypocotyls. The initiation of root primordia and roots elongation were prevented by 1mg/l taxol. Colchicine (15mg/l) decreased effect of taxol in root primordia but not in callus initiation.*

Key words: *callus, colchicine, crown of root, hypocotyl, root primordia, taxol, Taxus sp.,*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. David H. B. and Ye Z-H. Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *The Plant Cell* 14: 2145–2160 (2002).
- [2]. Gamborg O. L., Miller R. A. and Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**, 151-158 (1968).
- [3]. Horwitz, S. B., Lothsteria, L., Manfredi, J. J., Mellado, W., Parness J., Roy, S. N., Schiff P. B., Sorbara, L. and Zeheb, R. Taxol: mechanism of action and resistance. *Annu. NY Acad. Sci.*, 466: 733 – 744 (1986).
- [4]. Hunault G. Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivés *in vitro*. *Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot.*, 2: 231-287 (1979).
- [5]. Mai Trần Ngọc Tiếng, Nguyễn Thị Ngọc Lang, Đặng Vĩnh Thanh, Nguyễn Du Sanh và Bùi Trang Việt. Kích thích tổ giâm cành (phần 2). *Thông báo khoa học, Đại học Tổng hợp Thành phố Hồ Chí Minh*, 4: 93-98 (1980).
- [6]. Morejohn L. C. and Fosket D. E. Taxol-induced rose microtubule polymerization *in vitro* and its inhibition by colchicine. *The Journal of Cell Biology*, 99: 141-147 (1984).
- [7]. Nishihama R. and Machida Y. Expansion of the phragmoplast during plant cytokinesis: a MAPK pathway may MAP it out. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(6):507–512 (2001).
- [8]. Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, M. A. and Downing, K. H. High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell*, 96: 79–88 (1999).
- [9]. Ross, J. L., Fygenson, D. K. Mobility of taxol in microtubule bundles. *Biophysical Journal*, 84: 3959–3967 (2003).
- [10]. Salisbury F. B., Ross C. W. Plant physiology. *Wadsworth Publishing Company – Belmont, California* (1992).
- [11]. Schiff P. B., Fant, J. and Horwitz, S. B. Promotion of microtubules assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 277: 665 – 667 (1979).
- [12]. Sherline P., Joyce T. Leung, and David M. Kipnis. Binding of colchicine to purified microtubule protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 250 (14): 5481-5486 (1975).
- [13]. Whitney E. H., Sherryl R. B., Darryl L. K. To shape a plant—the cytoskeleton in plant morphogenesis. *The Plant Cell*, 10: 1772 – 1774 (1998).