

Sự cô lập và nuôi cấy tế bào trần từ các vật liệu khác nhau của cây chuối Cau Mãn (*Musa spp.*)

- Trần Thanh Hương
- Võ Quốc Cường

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
Email: trthuong@hcmus.edu.vn

(Bài nhận ngày 16 tháng 03 năm 2017, nhận đăng ngày 18 tháng 09 năm 2017)

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme trên khả năng phóng thích tế bào trần từ lá *in vitro*, cụm chồi tăng sinh cao và hoa đực non của cây chuối Cau Mãn được khảo sát. Các tế bào trần thu được từ các vật liệu này được nuôi cấy bằng các kỹ thuật khác nhau. Sự phát triển của tế bào trần được theo dõi nhờ kính hiển vi huỳnh quang. Cường độ hô hấp và hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật của các vật liệu được phân tích. Khả năng phóng thích tế bào trần đạt cao nhất sau 16 giờ xử lý hoa đực non với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,25 % và hemicellulase 0,25 % ($69,5 \times 10^6$ tế bào / g vật liệu). Sự phối hợp kỹ thuật nuôi cấy giọt treo tế

bào (6 ngày đầu) và kỹ thuật lớp nuôi với tế bào nuôi cà rốt, môi trường N_6PKM có bổ sung 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0,2 mg/L, α -naphthalene acetic acid (NAA) 1 mg/L và zeatin 0,5 mg/L thích hợp cho sự phát triển của tế bào trần. Các tế bào trần từ hoa đực non và cụm chồi tăng sinh cao có khả năng tạo vách và phân chia. Đặc biệt, tế bào trần từ hoa đực non có sự phân chia không cân xứng. Sự phát triển của tế bào trần từ hoa đực non chuối Cau Mãn trải qua các giai đoạn: tạo vách (ngày 4), phân chia đầu tiên của tế bào (ngày 6) và hình thành cụm tế bào (ngày 28). Mức độ phân hóa và hoạt động sinh lý của tế bào ban đầu quyết định số lượng và chất lượng của tế bào trần thu được cũng như sự phát triển của các tế bào trần.

Từ khóa: hoa đực non, kỹ thuật nuôi cấy giọt treo tế bào, kỹ thuật lớp nuôi, tế bào trần, *Musa*

MỞ ĐẦU

Chuối là cây ăn trái được ưa chuộng ở nhiều nước trên thế giới. Trong trái chuối có chứa nhiều carbohydrat, potassium (một chất dinh dưỡng khoáng cần cho hoạt động nhịp nhàng của tim), magnesium, potassium, các vitamin như vitamin C, vitamin B6, và đặc biệt là vitamin A, loại vitamin thường thiếu trong các bữa ăn hằng ngày của người dân vùng nhiệt đới. Ngoài ra, trái chuối còn được sử dụng như một nguồn cung cấp năng lượng chính ở một số nước ở Châu Phi và Châu Á [1]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy trong trái chuối (*Musa acuminata*) có chứa Banlec, một protein đặc biệt thuộc nhóm lectin có khả năng làm chậm sự lây lan HIV bằng cách ngăn cản sự xâm nhập của virus này vào cơ thể [2]. Tuy nhiên, việc

sản xuất chuối đang bị đe dọa bởi cây chuối thường dễ bị nhiễm một số bệnh như bệnh đốm lá do nấm *Mycosphaerella fijiensis*, bệnh héo do *Fusarium oxysporum*, các bệnh do virus và các bệnh do côn trùng như giun tròn... [3, 4]. Do đó, việc vi nhân giống và cải tiến giống chuối nhằm thu nhận cây giống có chất lượng tốt, sạch bệnh, năng suất cao, trên qui mô công nghiệp rất được các nhà khoa học cũng như các nhà trồng trọt quan tâm. Vấn đề đặt ra là đa số các giống chuối trồng hiện nay là tam bội, không thụ tinh được. Do đó việc lai tạo và cải tiến giống chuối trồng nhờ các kỹ thuật lai giống truyền thống rất khó thực hiện. Theo Haicour và cộng sự, kỹ thuật nuôi cấy và dung hợp tế bào trần là một trong các kỹ thuật có thể giải quyết vấn đề nêu trên [4]. Tuy nhiên, để

có thể thực hiện được việc này đòi hỏi phải có một hệ thống tế bào trần có khả năng phát triển. Chính vì vậy, sự cô lập và nuôi cấy tế bào trần từ các vật liệu khác nhau của cây chuối Cau Mãn được thực hiện.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các vật liệu khác nhau của chuối Cau Mãn: cây *in vitro* 10 ngày tuổi tăng trưởng trên môi trường MS [5]; cụm chồi tăng sinh cao (CHP, highly proliferating meristem culture) và các nải hoa đực non ở vị trí từ 5 đến 20.

Dịch treo tế bào cà rốt 10 ngày tuổi, hình thành từ mô sẹo có nguồn gốc trụ hạ diệp, tăng trưởng trên môi trường MS có bổ sung 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1,2 mg/L và zeatin 0,5 mg/L.

Các enzyme cellulase (Merck), hemicellulase (Sigma), pectinase (Hiimedia) và macerozyme R10 (Phytotech). Môi trường nuôi cấy tế bào trần: N₆PKM [4] có bổ sung 2,4-D 0,2 mg/L (Merck), NAA 1 mg/L (Merck) và zeatin 0,5 mg/L (Merck) [6].

Khảo sát ảnh hưởng của trạng thái sinh lý của lá trên khả năng phóng thích tế bào trần

Các lá non chưa mở và mở của cây chuối Cau Mãn *in vitro* được cô lập và phân thành 2 nhóm. 1 gam lá (mỗi nhóm) được cắt thành các lát song song, ngang qua gân chính, cách nhau 1 mm. Sau đó, mỗi nhóm lá được cho vào becher 25 mL chứa 5 mL hỗn hợp enzyme gồm cellulase 6 %, pectinase 3 %, hemicellulase 1,5 % [6].

Khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme lên khả năng phóng thích tế bào trần từ lá non chưa mở

1 gam lá non chưa mở của cây chuối Cau Mãn *in vitro* 10 ngày tuổi được cô lập và cắt thành các lát song song, cách nhau 1 mm, ngang qua gân chính. Sau khi cắt, các mẫu lá được cho vào becher

25 mL chứa 5 mL hỗn hợp enzyme với loại và nồng độ khác nhau:

Cellulase 6 %, pectinase 3 % và hemicellulase 1,5 %; cellulase 3 %, pectinase 1 %, hemicellulase 1 % và macerozyme 1 %; cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 % và macerozyme 0,5 %.

Khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme trên khả năng phóng thích tế bào trần từ cụm chồi tăng sinh cao

1 gam cụm chồi tăng sinh cao được cô lập, cắt nhỏ và cho vào becher 25 mL chứa 5 mL 5 hỗn hợp enzyme: cellulase 3 %, pectinase 1 % và hemicellulase 0,5 %; cellulase 2 %, pectinase 1 % và hemicellulase 1 %; cellulase 2 %, pectinase 1 % và hemicellulase 0,5 %; cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 % và hemicellulase 1 %; cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 % và hemicellulase 0,5 %.

Khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme và thời gian xử lý trên khả năng phóng thích tế bào trần từ hoa đực non

Các nải hoa đực non ở vị trí từ 5 đến 20 được cô lập. 1 gam hoa đực non được cắt nhỏ và cho vào becher 25 mL chứa 5 mL 3 hỗn hợp enzyme: cellulase 1,5 %, pectinase 0,25 % và hemicellulase 0,25 %; cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 % và hemicellulase 0,5 %; cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 % và macerozyme 0,5 %.

Các enzyme được hòa trong hỗn hợp dung dịch muối KCl 3 % và CaCl₂ 0,5 %. Tất cả các becher chứa mẫu xử lý được đặt trên máy lắc với vận tốc 80 vòng/phút trong 30 phút, sau đó chuyển sang điều kiện lắc 30 vòng/phút, ở nhiệt độ 27 ± 1 °C, trong tối, ẩm độ 65 ± 5 %. Khả năng phóng thích tế bào trần được theo dõi theo thời gian nhờ kính hiển vi quang học, số tế bào trần phóng thích được xác định bằng buồng đếm hồng cầu.

Thu nhận tế bào trần và khảo sát khả năng phát triển của tế bào trần có nguồn gốc từ các vật liệu khác nhau

Các tế bào trần từ lá non chưa mở của cây *in vitro*, cụm chồi tăng sinh cao và hoa đực non được thu nhận bằng cách lọc qua rây có kích thước lỗ lần lượt là 80 μm và 30 μm , rửa với hỗn hợp dung dịch KCl 3 % và CaCl_2 0,5 %, ly tâm ở vận tốc 650 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi để thu nhận tế bào trần (3 lần) và hòa trong môi trường lỏng N_6PKM [4], có bổ sung 2,4-D 0,2 mg/L, NAA 1 mg/L và zeatin 0,5 mg/L ở mật độ 10^6 tế bào/mL [6].

Tạo lớp tế bào nuôi: dịch treo tế bào cả rễ được chuyển vào môi trường lỏng N_6PKM có bổ sung 2,4-D 0,2 mg/L, NAA 1 mg/L và zeatin 0,5 mg/L. Môi trường đặc có cùng thành phần (được bổ sung 8 g/L agarose) được giữ lỏng ở nhiệt độ 40 °C. Sau đó, vẫn ở 40°C, dịch treo tế bào cả rễ (mật độ 6 % thể tích tế bào lắng/thể tích môi trường) được vùi riêng rẽ vào các môi trường này (theo tỉ lệ 1:1) để có mật độ tế bào sau cùng là 3 % (thể tích tế bào lắng/thể tích môi trường) và được đổ vào đĩa petri (5 mL cho mỗi đĩa có đường kính 5 cm) [6].

Một thể tích 300 μL dịch treo tế bào trần được trải lên petri chứa tế bào lớp nuôi, ngăn cách với các tế bào nuôi nhờ một màng nylon có kích thước lỗ 7 μm .

Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng phát triển của tế bào trần từ hoa đực non

Tế bào trần có nguồn gốc hoa đực non sau khi thu nhận được nuôi cấy theo các cách sau:

Dùng kỹ thuật giọt treo: 300 μL dịch treo tế bào trần được nhỏ trực tiếp lên petri thành 6 giọt (50 μL /giọt). Sau đó lật úp petri lại tạo thành các giọt treo tế bào trần.

Dùng kỹ thuật tế bào lớp nuôi: 300 μL dịch treo tế bào trần được đặt nuôi trong petri chứa tế bào nuôi (1 giọt đường kính 2 cm) và được ngăn cách với các tế bào lớp nuôi nhờ một màng nylon có kích thước lỗ 7 μm .

Phối hợp kỹ thuật giọt treo và lớp nuôi: tế bào trần được nuôi bằng kỹ thuật giọt treo trong 6 ngày, sau đó chuyển sang nuôi cấy bằng kỹ thuật lớp nuôi.

Tất cả các mẫu cấy được đặt nuôi ở 27 ± 1 °C, trong tối. Sự phát triển của tế bào trần được quan sát dưới kính hiển vi quang học theo thời gian. Khả năng sống của tế bào trần được theo dõi nhờ sự nhuộm với 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 1 %. Sự thành lập vách được khảo sát nhờ nhuộm với calcofluor 0,01 % và sự phân chia nhân được khảo sát nhờ nhuộm với 4,6-diamino-2-phenylindol (DAPI) 0,005 %, trong 5 phút ở điều kiện tối. Sau đó, quan sát nhờ kính hiển vi huỳnh quang (Olympus CK41).

Đo cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp (μL oxygen/g trọng lượng tươi / giờ) của lá non chưa mở cây chuối *in vitro* 10 ngày tuổi, cụm chồi tăng sinh cao và các nải hoa đực non được xác định nhờ điện cực oxygen của máy Oxylab Hansatech, ở 25 °C, trong tối. Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Đo hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật auxin, cytokinin, gibberellin và abscisic acid (dạng tự do) có trong các vật liệu được ly trích và phân đoạn nhờ các dung môi hữu cơ, pH thích hợp và thực hiện sắc ký trên bản mỏng silicagel 60 F254 (Merk) ở 25 °C với dung môi di chuyển chloroform: methanol: acetic acid (80:15:5). Vị trí của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được phát hiện nhờ quan sát trực tiếp dưới tia UV ở bước sóng 254 nm so với với indol acetic acid (IAA), zeatin, gibberellic acid (GA_3) và abscisic acid (ABA) tinh khiết (Yokota *et al*, 1980). Hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được đo bằng sinh trắc nghiệm: diệp tiêu lúa (*Oryzasativa* L.) cho auxin và abscisic acid, từ diệp dưa leo (*Cucumissativus* L.) cho cytokinin,

cây mầm xà lách (*Lactucasativa* L.) cho gibberellin [8].

KẾT QUẢ

Ảnh hưởng của trạng thái sinh lý của lá trên khả năng thu nhận tế bào trần

Sự phóng thích tế bào trần từ lá non chưa mở xảy ra sớm hơn so với lá mở. Với lá non chưa mở,

các tế bào trần đầu tiên được quan sát thấy sau 14 giờ. Với lá mở, các tế bào trần đầu tiên được quan sát thấy sau 16 giờ. Khả năng phóng thích tế bào trần đạt cao nhất sau 16 giờ xử lý lá non chưa mở với hỗn hợp enzyme cellulase 6 %, pectinase 3 % và hemicellulase 1,5 % (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của trạng thái sinh lý của lá trên khả năng phóng thích tế bào trần

Trạng thái sinh lý của lá	Thời gian xử lý enzyme (giờ)	Khả năng phóng thích tế bào trần (số tế bào trần x 10 ⁶ /g TLT)
Lá non chưa mở	15	0,43 ± 0,03 ^b
	16	0,50 ± 0,02 ^{ab}
	17	0,53 ± 0,03 ^a
	18	0,20 ± 0,04 ^d
Lá mở	18	0,20 ± 0,04 ^d
	19	0,23 ± 0,02 ^{cd}
	20	0,29 ± 0,01 ^c
	21	0,09 ± 0,02 ^e

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$

Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme lên khả năng phóng thích tế bào trần từ lá non chưa mở

Số tế bào trần phóng thích đạt cao nhất sau 17 giờ xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 %, macerozyme 0,5 %. Sự phóng thích tế bào trần xảy ra sớm nhất khi xử lý với hỗn hợp enzyme

cellulase 6 %, pectinase 3 %, hemicellulase 1,5 % (12 giờ), chậm hơn khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 3 %, pectinase 1 %, hemicellulase 1 %, macerozyme 1 % (13 giờ) và chậm nhất khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 %, macerozyme 0,5 % (14 giờ) (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme lên sự phóng thích tế bào trần từ lá non chưa mở cây *in vitro*

Hỗn hợp enzyme xử lý	Thời gian xử lý (giờ)	Khả năng phóng thích tế bào trần (số tế bào trần x 10 ⁶ /g TLT)
Cellulase 6 %	16	0,50 ± 0,02 ^d
Pectinase 3 %	17	0,53 ± 0,03 ^d
Hemicellulase 1,5 %	18	0,20 ± 0,02 ^d
Cellulase 3 %	15	4,52 ± 0,30 ^c
Pectinase 1 %	16	6,84 ± 0,32 ^b
Hemicellulase 1 %	17	3,97 ± 0,40 ^c
Macerozyme 1 %	16	5,79 ± 0,73 ^b
Cellulase 1,5 %	17	9,76 ± 0,45 ^a
Pectinase 0,5 %	18	8,9 ± 0,12 ^a
Hemicellulase 0,5 %		
Macerozyme 0,5 %		

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme trên khả năng phóng thích tế bào trần từ cụm chồi tăng sinh cao

Khả năng phóng thích tế bào trần xảy ra sớm nhất khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 6 %, pectinase 3 % và hemicellulase 1,5 % (12 giờ), chậm hơn khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 3 %, pectinase 1 %, hemicellulase 1 % và

macerozyme 1 % (13 giờ) và chậm nhất khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 % và macerozyme 0,5 % (14 giờ). Số tế bào trần phóng thích đạt cao nhất sau 17 giờ xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 % và macerozyme 0,5 % (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme trên khả năng phóng thích tế bào trần từ cụm chồi tăng sinh cao

Hỗn hợp enzyme xử lý	Thời gian xử lý (giờ)	Khả năng phóng thích tế bào trần (số tế bào trần x 10 ⁶ /g TLT)
Cellulase 1,5% Pectinase 0,5% Hemicellulase 0,5%	17	11,42 ± 2,30 ^{def}
	18	18,67 ± 1,96 ^a
	19	17,33 ± 0,73 ^{ab}
	20	13,75 ± 0,52 ^{cde}
Cellulase 2% Pectinase 1% Hemicellulase 0,5%	17	6,58 ± 0,22 ^{hi}
	18	12,50 ± 2,17 ^{cdef}
	19	15,42 ± 1,46 ^{bc}
	20	8,33 ± 0,17 ^{gh}
Cellulase 2% Pectinase 1% Hemicellulase 1%	17	6,50 ± 0,14 ^{hi}
	18	14,33 ± 0,74 ^{cd}
	19	11,08 ± 0,65 ^{efg}
	20	9,75 ± 0,76 ^{fg}
Cellulase 3% Pectinase 1% Hemicellulase 0,5%	15	6,42 ± 0,17 ^{hi}
	16	8,17 ± 0,08 ^{gh}
	17	6,25 ± 0,50 ^{hi}
	18	4,58 ± 0,22 ^{ij}

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$

Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme trên khả năng phóng thích tế bào trần từ hoa đực non

Khả năng phóng thích tế bào trần xảy ra sớm nhất khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 %, macerozyme 0,5 (12 giờ), chậm hơn khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,25 %, hemicellulase 0,25 % (13 giờ), hay hỗn hợp

enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 %, macerozyme 0,5 % (13 giờ). Số tế bào trần phóng thích đạt cao nhất sau 16–17 giờ xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,25 % và hemicellulase 0,25 % và sau 17 giờ xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 %, macerozyme 0,5 % (Bảng 4, Hình 1C).

Bảng 4. Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme trên khả năng phóng thích tế bào trần từ hoa đực non

Hỗn hợp enzyme	Thời gian xử lý (giờ)	Khả năng phóng thích tế bào trần (số tế bào trần x 10 ⁶ /g TLT)
Cellulase 1,5% Pectinase 0,25% Hemicellulase 0,25%	15	13,17 ± 0,07 ^e
	16	63,00 ± 4,33 ^a
	17	68,50 ± 1,73 ^a
	18	21,75 ± 8,80 ^{de}
Cellulase 1,5% Pectinase 0,5% Hemicellulase 0,5%	15	33,5 ± 2,60 ^c
	16	30,33 ± 2,62 ^{cd}
	17	69,50 ± 1,15 ^a
	18	45,83 ± 0,44 ^b
Cellulase 1,5% Pectinase 0,5% Hemicellulase 0,5% Macerozyme 0,5	14	16,50 ± 0,86 ^e
	15	18,50 ± 1,73 ^e
	16	17,00 ± 0,58 ^e
	17	13,75 ± 1,87 ^e

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$

Khả năng phóng thích tế bào trần đạt cao nhất với vật liệu hoa đực non khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,25 %, hemicellulase 0,25 % (16 giờ), thấp hơn ở vật liệu cụm chồi tăng sinh cao khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 % (18 giờ), lá non chưa mở khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5 %, pectinase 0,5 %, hemicellulase 0,5 %,

macerozyme 0,5 % (17 giờ) và thấp nhất ở lá mở khi xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 6 %, pectinase 3 %, hemicellulase 1,5 % (20 giờ) cây chuối *in vitro* 10 ngày tuổi (Bảng 5).

Đường kính trung bình của các tế bào trần được cô lập từ lá mở, lá non chưa mở và cụm chồi tăng sinh cao tương đương nhau và lớn hơn rất nhiều so với các tế bào trần được cô lập từ hoa đực non (Bảng 5).

Bảng 5. Khả năng thu nhận tế bào trần từ các loại vật liệu khác nhau

Loại vật liệu	Hỗn hợp enzyme xử lý	Thời gian xử lý (giờ)	Khả năng phóng thích tế bào trần (số tế bào trần x 10 ⁶ /g TLT)	Đường kính trung bình của tế bào (μm)
Lá non chưa mở	Cellulase 1,5% Pectinase 0,5% Hemicellulase 0,5% Macerozyme 0,5%	17	9,76 ± 0,50 ^c	16,80 ± 1,19 ^a
Lá mở	Cellulase 6% Pectinase 3% Hemicellulase 1,5%	20	0,30 ± 0,01 ^d	19,5 ± 1,32 ^a
Cụm chồi tăng sinh cao	Cellulase 1,5% Pectinase 0,5% Hemicellulase 0,5%	18	18,67 ± 1,96 ^b	17,9 ± 0,59 ^a
Hoa đực non	Cellulase 1,5% Pectinase 0,25% Hemicellulase 0,25%	16	69,50 ± 1,15 ^a	8,75 ± 0,84 ^b

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Cường độ hô hấp và hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật của các vật liệu dùng cô lập tế bào trần

Cường độ hô hấp đạt cao nhất ở các nải hoa đực non, giảm mạnh ở cụm chồi tăng sinh cao và thấp nhất ở lá non chưa mở của cây chuối *in vitro* 10 ngày tuổi (Bảng 6).

Hoạt tính IAA và zeatin cao ở các nải hoa đực non, thấp ở cụm chồi tăng sinh cao và lá non chưa mở. Hoạt tính gibberellin cao nhất ở lá non chưa mở, thấp ở cụm chồi tăng sinh cao và hoa đực non. Hoạt tính abscisic acid cao nhất ở lá non chưa mở, giảm mạnh ở cụm chồi tăng sinh cao và thấp nhất ở hoa đực non (Bảng 6).

Bảng 6. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong các vật liệu dùng cô lập tế bào trần

Vật liệu	Cường độ hô hấp ($\mu\text{l O}_2/\text{g TLT}/\text{giờ}$)	Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật (mg/L)			
		IAA	Zeatin	Gibberellin	Abscisic acid
Lá non chưa mở cây <i>in vitro</i>	218,03 \pm 7,50 ^c	0,13 \pm 0,01 ^b	0,93 \pm 0,32 ^b	0,14 \pm 0,01 ^a	6,78 \pm 0,19 ^a
Cụm chồi tăng sinh cao	288,35 \pm 11,64 ^b	0,12 \pm 0,01 ^b	0,89 \pm 0,20 ^b	0,10 \pm 0,01 ^b	3,41 \pm 0,29 ^b
Hoa đực non	517,76 \pm 5,42 ^a	0,31 \pm 0,03 ^a	3,89 \pm 0,68 ^a	0,08 \pm 0,01 ^b	2,30 \pm 0,35 ^c

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Khả năng phát triển của tế bào trần từ các loại vật liệu khác nhau

Sau 6 ngày nuôi cấy trên môi trường N₆PKM có bổ sung 2,4-D 0,2 mg/L, NAA 1 mg/L và zeatin 0,5 mg/L bằng kỹ thuật lớp nuôi, các tế bào trần từ lá non chưa mở không có sự phát triển, không chuyển màu hồng khi nhuộm với TTC 1% (Hình 2). Các tế bào trần được cô lập từ cụm chồi tăng sinh cao hay hoa đực non có khả năng sống, chuyển màu hồng khi nhuộm với TTC 1% và phát triển với sự hiện diện của tế bào đang ở trạng thái phân chia (Hình 3). Các tế bào có nguồn gốc từ cụm chồi tăng sinh cao phân chia tương đối đồng đều (Hình 3) trong khi các tế bào từ hoa đực non có sự phân chia không cân xứng (Hình 4).

Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên sự phát triển của tế bào trần từ hoa đực non

Trong cả hai trường hợp nuôi cấy bằng kỹ thuật giọt treo hay lớp nuôi, các tế bào trần từ hoa đực non đều có sự thành lập vách sau 4 ngày nuôi cấy (Hình 2) và phân chia sau 6 ngày nuôi cấy (Hình 3-5). Tuy nhiên, các tế bào không có khả năng phát triển (tạo cụm) nếu tiếp tục duy trì ở điều kiện giọt treo hay lớp nuôi. Sự hình thành cụm tế bào chỉ xảy ra khi tế bào được nuôi cấy nhờ

kỹ thuật giọt treo trong 6 ngày được chuyển sang nuôi cấy nhờ kỹ thuật lớp nuôi (Hình 6).

THẢO LUẬN

Ở chuối Cau Mãn, khả năng phóng thích tế bào trần đạt cao nhất ở hoa đực non, giảm dần ở cụm chồi tăng sinh cao, lá non chưa mở và thấp nhất ở lá mở cây chuối *in vitro* 10 ngày tuổi. Có lẽ chính mức độ phân hóa tế bào trong các vật liệu sử dụng là yếu tố dẫn đến sự khác biệt về độ nhạy của các vật liệu này với enzyme. Thật vậy, đa số các lá tiết nhiều hợp chất thứ cấp khi bị tổn thương như lá chuối thường được cấu tạo bởi lớp cutin dày, các chất nhầy (mucilage) và đặc biệt là phần vách tế bào khá rắn chắc. Các lá càng già, mức độ rắn chắc của vách tế bào càng cao [9, 10]. Do đó, khả năng phóng thích tế bào trần từ lá non chưa mở cao hơn so với lá mở. Trong khi đó, hoa đực non và cụm chồi tăng sinh cao chứa các tế bào mô phân sinh ngọn chồi với kích thước tế bào nhỏ, đẳng kính, vách mỏng, có khả năng phân chia và hoạt động không giới hạn. Chính vì vách tế bào mỏng nên các tế bào này đáp ứng tốt hơn với các enzyme phân hủy vách tế bào. Do đó, khả năng phóng thích tế bào trần từ hoa đực non và cụm chồi tăng sinh cao cao hơn so với lá (Bảng 1-5). Nếu như các hoa đực non hầu như chỉ bao gồm các tế bào

mô phân sinh (số liệu chưa công bố), các cụm chồi tăng sinh cao tại thời điểm 4 tuần tuổi đã có sự hình thành các phát thể lá. Sự hình thành các phát thể lá cho thấy mức độ phân hóa của tế bào trong cụm chồi cao hơn so với hoa đực non. Điều này dẫn đến khả năng phóng thích tế bào trần từ hoa đực non cao hơn so với cụm chồi tăng sinh cao (Bảng 5). Theo các nghiên cứu về sự cô lập tế bào trần ở chuối nói riêng hay các đơn tử diệp khác như lúa, bắp và lúa mì, dịch treo tế bào là vật liệu chủ yếu để cô lập và nuôi cấy tế bào trần [11, 12]. Mức độ phân hóa tế bào của vật liệu cũng ảnh hưởng đến mức độ đồng nhất của tế bào trần thu nhận được. Lá có mức độ phân hóa cao nhất với sự hiện diện của nhiều loại tế bào bao gồm: các tế bào biểu bì, nhu mô libe, nhu mô diệp lục... với kích thước khác nhau. Trong khi đó, các mô phân sinh (ngọn chồi và hoa) chứa các tế bào có kích thước tương đối đồng nhất. Đặc biệt, các tế bào mô phân sinh hoa đang ở trạng thái phân chia mạnh để chuyển từ trạng thái không hạn định (mô phân sinh chồi) sang hạn định (mô phân sinh hoa) [11, 13] nên có kích thước rất nhỏ (Bảng 5, Hình 1).

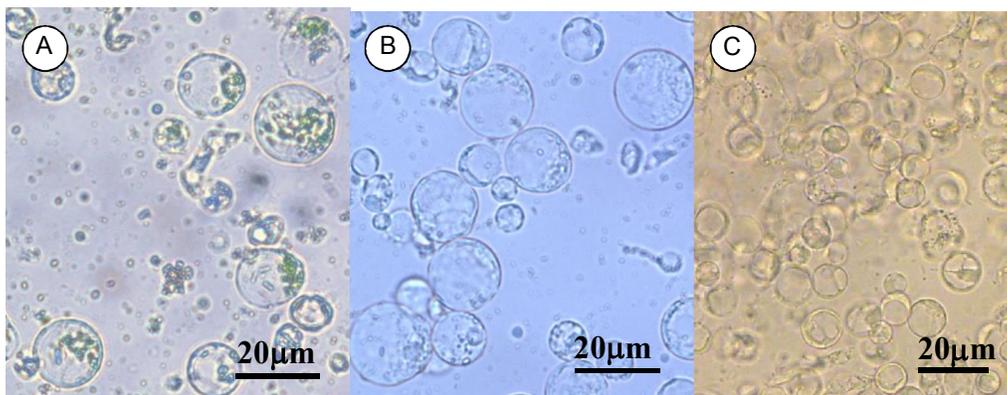
Vai trò tổ chức của các tế bào mô phân sinh, cường độ hô hấp, hoạt tính IAA và zeatin cao trong tế bào ban đầu là yếu tố quyết định sự phát triển của các tế bào trần. Biểu hiện đầu tiên cho thấy sự nuôi cấy tế bào trần thành công là sự tái tạo lại vách tế bào (Hình 2). Sau đó là sự phân chia tế bào để tạo nhóm tế bào. Hoa đực non và cụm chồi tăng sinh cao chứa các tế bào đang ở trạng thái phân chia mạnh nên có cường độ hô hấp mạnh, hoạt tính auxin và cytokinin cao hơn rất nhiều so với lá non chưa mở (Bảng 6). Auxin có vai trò kích thích sự tạo vách tế bào. Auxin làm gia tăng cường độ hô hấp bằng cách trực tiếp huy động chất dự trữ tạo nguồn nguyên liệu cho hô hấp tế bào. Sự hiện diện và hoạt động phối hợp của auxin và cytokinin giúp gia tăng kích thước tế bào đồng thời tác động lên cả hai bước của quá trình phân chia tế bào (phân nhân và phân bào) [11]. Chính vì vậy, sau 6 ngày nuôi cấy trong

môi trường N₆PKM có bổ sung 2,4-D 0,2 mg/L, NAA 1 mg/L và zeatin 0,5 mg/L, các tế bào từ hoa đực non và cụm chồi tăng sinh cao đã có sự tái tạo vách và thực hiện sự phân chia đầu tiên (Hình 3-5). Đặc biệt, các tế bào trần từ hoa đực non có sự phân chia bất đối xứng tương tự như bước đầu tiên trong sự hình thành soma (Hình 4). Trong khi đó, các tế bào trần từ lá non chưa mở không có sự phát triển sau 6 ngày nuôi cấy, không chuyển sang màu hồng khi nhuộm với TTC 1%. Theo Davey và cộng sự [14], tế bào trần cũng như tất cả các tế bào thể hệ khác, đều có tính toàn năng và có khả năng tái sinh thành cây một cách trực tiếp hay gián tiếp qua con đường sinh phôi thể hệ nhưng trong thực tế điều đó tùy thuộc vào điều kiện môi trường. Thông thường, vào giai đoạn đơn bào, nếu tế bào trần không được tiếp xúc với các ảnh hưởng ổn định và không được cảm ứng từ các tế bào lân cận, chúng có thể đánh mất khả năng tái sinh. Bên cạnh đó, ở đơn tử diệp, kỹ thuật “lớp nuôi” thường được dùng như một tác nhân kích thích sự tăng trưởng của tế bào trần [4, 11]. Chính vì vậy, môi trường N₆PKM (giàu vitamin, chất hữu cơ) có sự phối hợp bổ sung auxin, cytokinin và đặc biệt là tế bào nuôi cả rất đã giúp tái tạo vách cho tế bào trần và kích thích phân chia đầu tiên. Tuy nhiên, không chỉ thành phần môi trường quyết định sự nuôi cấy tế bào trần thành công mà kỹ thuật nuôi cấy cũng rất quan trọng. Khi nuôi cấy bằng kỹ thuật giọt treo, các tế bào tiếp xúc trực tiếp với không khí nên hoạt động hô hấp tế bào diễn ra mạnh giúp tế bào dễ dàng phân chia, đặc biệt là phân chia không cân xứng (Hình 4, 5), chuẩn bị cho sự tạo các nhóm nhỏ tế bào. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là thể tích môi trường ít (50 µL), môi trường lỏng dễ bay hơi, các tế bào sẽ không phát triển nếu tiếp tục được nuôi cấy ở điều kiện này. Chính vì vậy, việc chuyển tế bào sang nuôi cấy trong điều kiện có sự hiện diện của lớp tế bào nuôi là cần thiết để các tế bào tiếp tục phân chia và tạo cụm sau 28 ngày nuôi cấy (Hình 6).

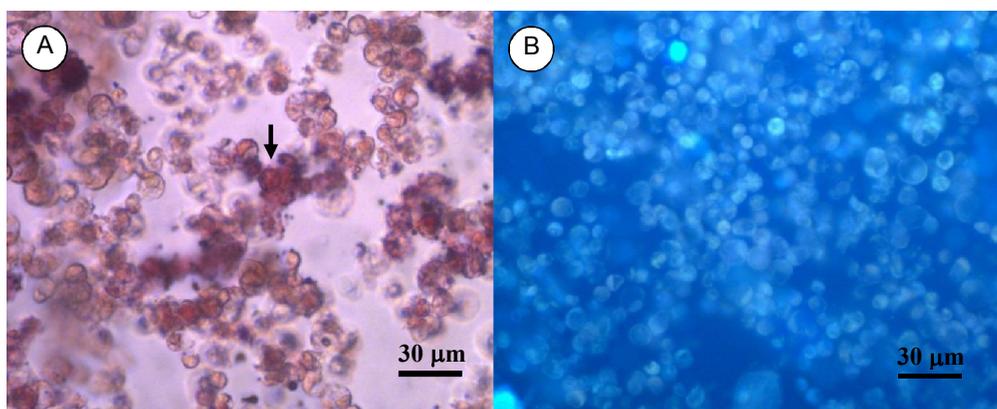
KẾT LUẬN

Ở chuối Cau Mãn, sự cô lập và nuôi cấy tế bào trần có thể được thực hiện từ cụm chồi tăng sinh cao và hoa đực non. Mỗi loại vật liệu cần loại, nồng độ enzyme và thời gian xử lý thích hợp. Hoa đực non cho hiệu suất thu nhận tế bào trần cao nhất sau 16 giờ xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5

%, pectinase 0,25 % và hemicellulase 0,25 %. Điều kiện thích hợp cho sự phát triển của tế bào trần là: dùng môi trường N₆PKM có bổ sung 2,4-D 0,2 mg/L, NAA 1 mg/L và zeatin 0,5 mg/L; nuôi cấy nhờ kỹ thuật giọt treo trong 6 ngày, sau đó chuyển sang nuôi cấy nhờ kỹ thuật lớp nuôi với tế bào nuôi cà rốt.



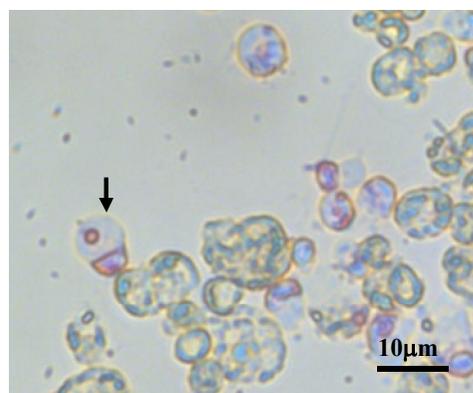
Hình 1. Các tế bào trần từ các vật liệu khác nhau sau khi xử lý với hỗn hợp enzyme (A), Các tế bào trần từ lá non chưa mỡ cây *in vitro* sau 17 giờ xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5%, pectinase 0,5%, hemicellulase 0,5% và macerozyme 0,5%. (B), Các tế bào trần từ cụm chồi tăng sinh cao sau 18 giờ xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5%, pectinase 0,5% và hemicellulase 0,5%. (C), Các tế bào trần từ hoa đực non sau 16 giờ xử lý với hỗn hợp enzyme cellulase 1,5%, pectinase 0,25% và hemicellulase 0,25%.



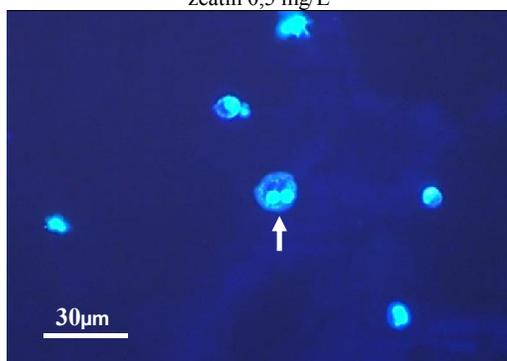
Hình 2. Các tế bào phát triển từ tế bào trần có nguồn gốc hoa đực non sau 4 ngày nuôi cấy bằng kỹ thuật giọt treo, trong môi trường N₆PKM có bổ sung 2,4-D 0,2 mg/L, NAA 1 mg/L và zeatin 0,5 mg/L. Mẫu được nhuộm với TTC 1% (A) và calcofluor 0,01% (B).



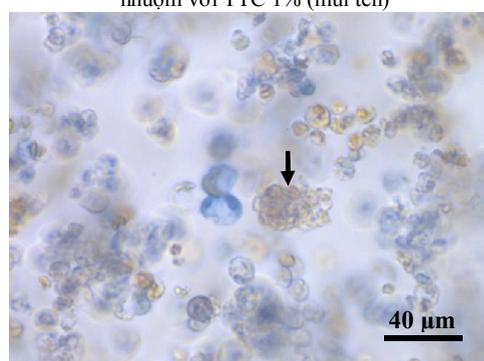
Hình 3. Tế bào có nguồn gốc từ cụm chồi tăng sinh cao giống chuối Cau Mãn sau 6 ngày nuôi trên môi trường N₆PKM có bổ sung 2,4-D 0,2 mg/L, NAA 1 mg/L và zeatin 0,5 mg/L



Hình 4. Các tế bào có nguồn gốc từ hoa đực non sau 6 ngày nuôi cây trên môi trường N₆PKM có bổ sung 2,4-D 0,2 mg/L, NAA 1 mg/L và zeatin 0,5 mg/L khi được nhuộm với TTC 1% (mũi tên)



Hình 5. Tế bào phát triển từ tế bào trần có nguồn gốc hoa đực non đang ở trạng thái phân chia (mũi tên) sau 6 ngày nuôi cây bằng kỹ thuật giọt treo. Mẫu được nhuộm với calcofluor 0,01 % và DAPI 0,0005 %.



Hình 6. Cụm tế bào hình thành từ tế bào trần có nguồn gốc hoa đực non sau 28 ngày nuôi cây (6 ngày bằng kỹ thuật giọt treo và 22 ngày bằng kỹ thuật lớp nuôi).

Protoplast isolation and culture from different explants of *Musa* spp. Cau Man

- Tran Thanh Huong
- Vo Quoc Cuong

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

In this paper, the roles of type and concentration of enzymes on protoplast isolation from in vitro leaves, multi-scalps (highly proliferating meristem culture), and young male flower of banana cv. Cau Man were studied. Respiration rate and content of plant hormones of these materials were analysed. Different

techniques were used to culture these protoplasts. The development of protoplasts was observed under fluorescence microscope. The highest yield of protoplast (69.5×10^6 protoplasts / g fresh weight) was obtained from young male flowers after 16 hours treatment with 1.5 % cellulase, 0.25 % pectinase and 0.25 % hemicellulase. The

combination of hanging drop cell technique (in 6 days), and carrot feeder layer cells in N6PKM medium supplemented with 0.2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 mg/L α -naphthalene acetic acid (NAA), and 0.5 mg/L zeatin are suitable for protoplast development. Protoplasts that were isolated from multi-scalps and young male flowers created the wall and divided when cultured by this method. The

Keywords: feeder layer, hanging drop cell culture, *Musa*, protoplast, young male flower

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. G. Aurore, B. Parfait, L. Fahrasmene, Bananas, raw materials for making processed food products, *Trends Food Science. Technology*, 20, 78–91 (2009).
- [2]. A.C.M.B. Sansone, M. Sansone, C.T. dos Santos Dias, J.R.O. do Nascimento, Oral administration of banana lectin modulates cytokine profile and abundance of T-cell populations in mice, *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 19–24 (2016).
- [3]. N. Roux, F.C. Baurens, J. Doležel, E. Hřibová, P. Heslop-Harrison, C. Town, T. Sasaki, T. Matsumoto, R. Aert, S. Remy, M. Souza, P. Lagoda, Genomics of banana and plantain (*Musa* spp.), major staple crops in the tropics, In: *Genomics of Tropical Crop Plants*. Moore P.H. and Ming R. (eds.), Springer, 83–111 (2008).
- [4]. R. Haicour, A. Assani, V. Bui Trang, A. Guedira, Protoplast isolation and culture for banana regeneration via somatic embryogenesis, *Fruit*, 64, 261–269 (2009).
- [5]. T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiol.*, 15, 3, 473–497 (1962).
- [6]. Trần Thanh Hương, Bùi Trang Việt, Sự cô lập và nuôi cấy tế bào trần cây chuối cau mắn, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 51(5B), 139–144 (2013).
- [7]. H. Meidner, *Class experiments in Plant Physiology*, George Allen and Unwin, London, 180 (1984).
- [8]. T. Yokota, N. Murofushi, N. Takahashi, Extraction, purification, and identification, Hormonal regulation of development. Part I Molecular aspects of plant hormones, *J. MacMillan - Encyclopedia of plant physiology*, New series, *Springer New York*, 9, 113–201 (1980).
- [9]. Trương Thị Đẹp, *Thực vật dược*, Nhà xuất bản Y học, pp. 311 (2007).
- [10]. J.K.C. Rose, *The plant cell wall*, Wiley Blackwell Publishing, pp. 400 (2003).
- [11]. Bùi Trang Việt, *Sinh lý thực vật đại cương*. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên -Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 753 (2016).
- [12]. A. Assani, R. Haicour, G. Wenzel, B. Foroughi-Wehr, F. Bakry, F. Côté, G. Ducreux, A. Ambroise and A. Grapin, Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.), *Plant Science*, 162, 3, 355–362 (2002).
- [13]. R.F. Evert, *Esau's Plant Anatomy: Meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*, John Wiley and Sons, pp. 601 (2006).
- [14]. M.R. Davey, P. Anthony, *Plant Cell Culture*, John Wiley and Sons, pp.341 (2010).