SỰ CÔ LẬP VÀ NUÔI CẤY TẾ BÀO TRẦN TỪ LÁ KHOAI TÂY

(*Solanum tuberosum* L.)

Nguyễn Thị Huệ - Phan Ngô Hoang - Bùi Trang Việt
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên
(Bài nhận ngày 24/06/1999)

TÓM TẮT : *Lá của Khoai tây (Solanum tuberrosum L.) dòng $AVRDC_{1297.19}$ 3-4 tuần tuổi trong ống nghiệm, được dùng để cô lập tế bào trần, bằng cách dùng hỗn hợp enzym thủy giải vách tế bào cellulase 0,05% (Sigma) và pectolyase 0,025% (Sigma) dung dịch sorbitol 6%. Sau đó, tế bào trần được đặt trong môi trường lỏng có bổ sung polyethylen glycol (PEG, PM 6000) 250 mg/l, benzyl adenine (BA) 0,05mg/l, α-naphthalene acetic acid (NAA) 1mg/l, và 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0,02mg/l, trong tối, ở 27°C. Tế bào trần tái tạo vách trong vòng 2-4 ngày và phân chia để tạo những nhóm tế bào nhỏ trong vòng 07 ngày. Để kích thích sự tăng trưởng mô sẹo, các nhóm tế bào nhỏ được chuyển vào các môi trường nuôi cấy khác nhau, dưới ánh sáng 2500 – 3000 lux, 16 giờ sáng mỗi ngày, ở 27°C. Những nhóm mô hình cầu nhỏ thành lập trên môi trường MS không có Hormon.*

MỞ ĐẦU

Sự nuôi cấy tế bào trần cần thiết cho việc áp dụng các công nghệ sinh học, đặc biệt là kỹ thuật dung hợp tế bào trần và thu nhận các cây lai thể hệ. Trong khảo cứu này, chúng tôi thực hiện những thí nghiệm sơ khởi nhằm tìm hiểu khả năng cô lập và nuôi cấy tế bào trần từ lá Khoai tây.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây Khoai tây *Solanum tuberosum*, dòng $AVRDC_{1297.19}$ được trồng trong ống nghiệm với môi trường MS (Murashige and Skoog 1962), ở nhiệt độ 20 ± 2°C.

PHƯƠNG PHÁP

Cô lập tế bào trần

Lá Khoai tây từ các cây 3-4 tuần tuổi trong ống nghiệm được cắt thành từng mảnh nhỏ khoảng 1 mm^2. Các mảnh nhỏ lá được ngâm trong dung dịch sorbitol 6% có chứa hỗn hợp enzym cellulaz 0,05% và pectolyaz 0,025%. Xử lý enzym được thực hiện trong tối, trong 24 giờ, ở 27 ± 2°C. Sau đó, tế bào trần được thu nhận bằng cách lọc (qua rây có lỗ 400µm), ly tâm ở 500 vòng/phút (5 phút), và rửa với dung dịch sorbitol 6%.

Nuôi cấy tế bào trần

Tế bào trần được nuôi cấy lần lượt trên các môi trường và điều kiện nuôi cấy khác nhau (cải tiến theo Sihachakr and Ducreux 1987):

- Một tuần trong môi trường lỏng MS có chứa BA 0,05mg/l, NAA 1mg/l, 2,4-D 0,2mg/l, PEG (Poly ethylen glycol PM 6000, Sigma) 250mg/l, và glucoz 6%, trong tối, ở nhiệt độ 27 ± 2°C (4ml môi trường, ở mật độ 2000 tế bào trần/ml).

- Một tuần, trong cùng môi trường trước, nhưng được lắc vòng (80 vòng/phút) và dưới ánh sáng 2500-3000 lux (16 giờ sáng/8 giờ tối), ở nhiệt độ 27± 2°C.

Sau hai tuần đầu nuôi cấy, tế bào trần tiếp tục được nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng (2500-3000 lux với 16 giờ sáng/8 giờ tối, nhiệt độ 27± 2°C), và trên môi trường được làm rắn với aga 6,5g/l.

- Một tuần trong môi trường MS với BA 2mg/l, NAA 0,5mg/l và 2,4-D 0,1 mg/l. Môi trường này không có PEG và glucoz, nhưng có sacaroz 20g/l.

- Một tuần trong môi trường MS với BA 2mg/l, AIA 0,1mg/l, sacaroz 20mg/l.

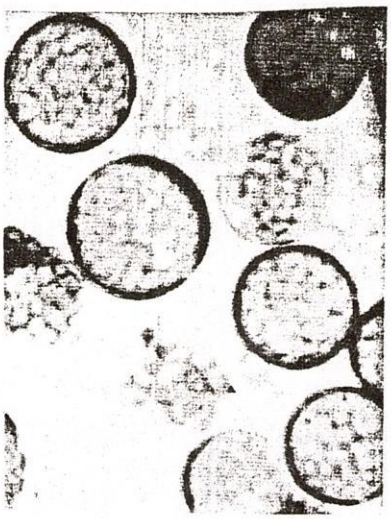
- Một tuần trong môi trường MS (không có chất điều hòa tăng trưởng thực vật).

Tổng cộng quá trình nuôi cấy nầy là 5 tuần.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH 5,8 trước sự hấp vô trùng ở 121°C, 1atm, trong 20 phút.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

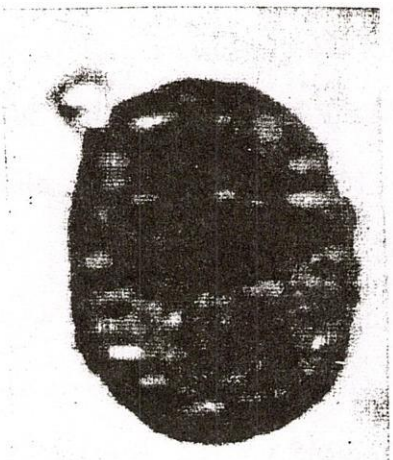
Tế bào trần ngay sau khi được cô lập ở trạng thái trương nước (ảnh 1), vơi mật độ 30.000 tế bào trần/g trọng lượng tươi của lá.



Ảnh 1 : Tế bào trần khoa tây sau khi xử lý enzym (thanh ngang : 30μm)

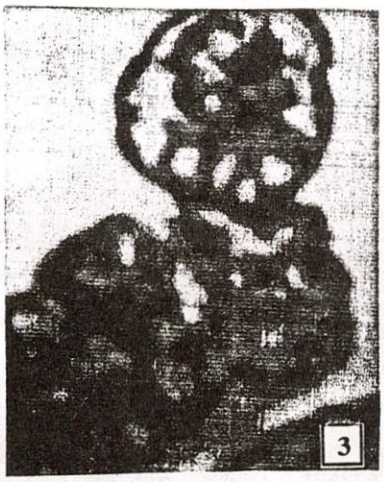
Trong sự nuôi cấy, tế bào trần Khoai tây phát triển qua các giai đoạn như sau:

Trong môi trường lỏng có BA 0,05mg/l, NAA 1mg/l và 2,4-D 0,2mg/l, trong tối, sau 2-4 ngày nuôi cấy, tế bào trần thành lập vách và vào lần phân chia thứ nhất (ảnh 2).



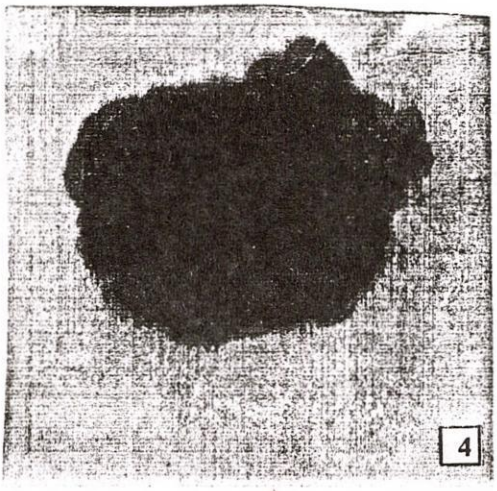
Ảnh 2 : Sự phân chia lần thứ nhất của tế bào trần khoai tây sau 04 ngày nuôi cấy (thanh ngang : : 8 μm)

Trong tuần thứ 2, với cùng môi trường nuôi cấy, nhưng được lắc, và trong điều kiện chiếu sáng, những nhóm tế bào xuất hiện (ảnh 3).



Ảnh 3 : Nhóm tế bào hình thành từ tế bào trần khoai tây sau 10 ngày nuôi cấy (thanh ngang : 20μm)

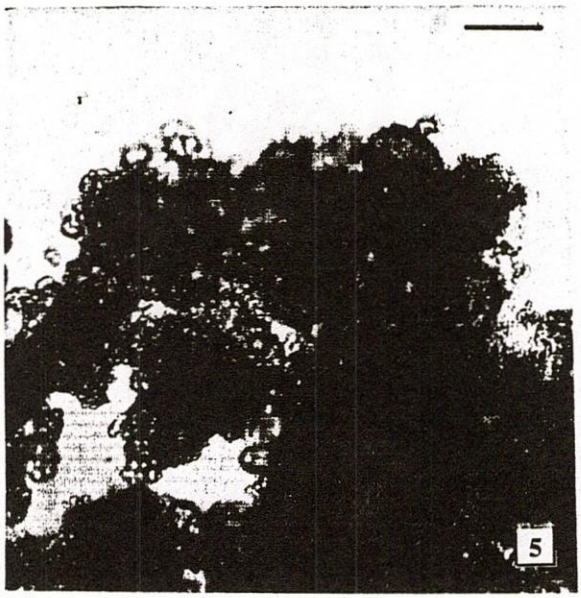
Trong tuần thứ 3, trên môi trường rắn với BA 2mg/l, 2,4-D 0,1mg/l, và NAA 0,5mg/l, mô sẹo phát triển mạnh (ảnh 4).



Ảnh 4 : Mô sẹo hình thành từ tế bào trần khoai tây sau 20 ngày nuôi cấy (thanh ngang : 2mm)

Trong tuần thứ 4, trên môi trường chứa BA 2mg/l và AIA 0,1 mg/l, mô sẹo tiếp tục phát triển mạnh.

Sau cùng, khi được chuyển sang môi trường không có chất điều hòa tăng trưởng thực vật, các nốt tế bào hình cầu, với biểu bì bao bọc xuất hiện, các nốt tế bào này nhô lên trên mô sẹo (ảnh 5).



Ảnh 5 : Nốt tế bào hình cầu trên môi trường hkông có chất điều hòa tăng trưởng thực vật (thanh ngang : 0,6mm)

Kết quả được trình bày cho thấy tế bào trần từ lá Khoai tây có thể tạo được vách và vào các lần phân chia liên tiếp trong môi trường có auxin kết hợp với cytokinin. Giai đoạn tối, một tuần sau cô lập, cần thiết cho sự phát triển tế bào trần, nhưng ý nghĩa của giai đoạn tối duy nhất của quá trình nuôi cấy tế bào trần chưa được hiểu rõ (Sihachakr and Ducreux 1987). Sự tăng nồng độ BA và giảm nồng độ auxin trong quá trình nuôi cấy nhằm tạo điều kiện sự tạo phôi từ tế bào thể hệ (Ahloowalia 1991, Komamine *et al.* 1992), tuy nhiên sự phân hóa ở các nốt tế bào hình cầu trong khảo cứu này chưa dẫn tới sự tạo phôi thể hệ. Vấn đề này chúng tôi sẽ tiếp tục tìm hiểu.

KẾT LUẬN

1. Có thể cô lập tế bào trần từ lá Khoai tây được nuôi cấy *in vitro* với hỗn hợp enzym phân hủy vách tế bào thực vật cellulaz 0,05% và pectolyaz 0,025% trong dung dịch sorbitol 6%.

2. Mô sẹo phát triển từ tế bào trần trên các môi trường có auxin và cytokinin tạo nên một hệ thống tế bào sẵn sàng cho sự tạo phôi thể hệ từ tế bào trần.

Trong thời gian tới, chúng tôi sẽ tìm cách thu nhận phôi thể hệ từ các hệ thống tế bào đạt được.

ISOLATION AND CULTURE OF PROTOPLAST FROM LEAVES OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.)

Nguyen Thi Hue – Phan Ngo Hoang – Bui Trang Viet

ABSTRACT: *Leaves taken from 3-4 week-old cuttings of Solanum tuberosum L. AVRDC$_{1297.19}$ were used as a source for mesophyll protoplast. Protoplasts were prepared by digestion in 0,05% (w/v) cellulase (Sigma) and 0,025% (w/v) pectolyase (Sigma) in 6% sorbitol. Protoplasts were first placed in liquid medium suppplemented with 250mg/l polyethylen glycol (PEG, PM 6000), 0,05mg/l benzyl adenine (BA), 1mg/l α-naphthalene acetic acid (NAA), and 0,02mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), in the dark, at 27^{0}C for 7 days. The protoplasts reformed the cell wall within 2-4 days and underwent sustained divisions leading to the formation of small clusters of cells within 7 days. Afterwords, in order to stimulate the growth of calli, the cultures were trasferred onto different media, at 16-h light regime, 2500-3000 lux, and 27^{0}C. Small granular callus were obtained on hormone-free MS medium.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Ahloowalia B.S. 1991. Somatic embryos in monocots. Their genesis and genetic stability. Rev. Cytol. Biol. Véget. Bot. 14: 223 – 235.

[2] Komamine A., Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Toya T., Fujiwara A., Tsukahara M., Smith J., Ito M., Fukuda H., and Fujimura T. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: Physiology, Biology and Molecular Biology. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 28p: 11 – 14.

[3] Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with *Tobaco* culture. Physiol Plant. 15: 473- 497.

[4] Sihachakr D. and Ducreux G. 1987. cultural behavior of protoplasts from different organs of egg plant (*Solanum melongena* L.), and plant regeneration. Plant Cell Tissue and Organ Culture 11: 179 – 188.