

KHẢO SÁT SỐ LƯỢNG NHIỄM SẮC Ở TẾ BÀO THỰC VẬT VÀ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT BẰNG PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐC NHƯỢC TRƯỞNG

Võ Thị Thanh Phương¹

ABSTRACT

*A study of hypotonic shock treatment by trisodium citrate ($C_6H_5Na_3O_7$) 0,4% in 30 – 60 minutes prior to the mitotic peak time of the radicle, rootlet, gemma leaf and young leaf samples of cultivated banana (*Musa paradisiaca* L.), seedless watermelon F1 TN736, *Allium ascalonicum* L., *Allium cepa* L., *Pisum sativum* L. and 9 species of family Araceae were effected. Somatic animal cells as brains and salivary glands of third instar larvae (*Drosophila* sp.) treated by NaCl 0,5% and the grasshopper's testes treated by NaCl 0,5% in 10 minutes before fixation in modified Carnoy's solution and stain in 1% aceto-carmine solution showed high quality mitotic and meiotic chromosome spreads. Chromosome numbers of studied cells were investigated. Over-treatment with hypotonic solution resulted in rupturing of cells, scattering and lossing of chromosomes.*

Keywords: *hypotonic shock, aceto-carmine, modified Carnoy's solution, trisodium citrate, NaCl*

Title: *A study of chromosome number at animal cells and plant cells by hypotonic shock treatment*

TÓM TẮT

*Nghiên cứu xử lý tế bào thực vật bằng citrate natri ($C_6H_5Na_3O_7$) 0,4% trong thời gian 30 - 60 phút (tùy loài) trước thời điểm phân bào tối ưu để thực hiện tiêu bản hiển vi đã có hiệu quả gây sốc nhược trương tế bào rễ non, lá non, rễ mầm và lá mầm của một số thực vật như chuối nhà (*Musa paradisiaca* L.), dưa hấu lai F1 TN736 tiểu hắc long hạt lép, hành ta (*Allium ascalonicum* L.), hành tây (*Allium cepa* L.), đậu Hà lan (*Pisum sativum* L.) và 9 loài thực vật thuộc họ ráy (*Araceae*). Ở tế bào sinh dưỡng của động vật như não, tuyến nước bọt của ấu trùng ruồi giấm (*Drosophila* sp.) được xử lý bằng NaCl 0,5% và tế bào sinh dục của châu chấu đực (*Acrida* Linnaeus, 1758) được xử lý bằng NaCl 0,4% trước khi cố định và nhuộm bằng phẩm nhuộm aceto-carmine 1% trong thời gian 10 phút cũng gây được sốc nhược trương tế bào. Số lượng nhiễm sắc thể của loài nghiên cứu đã được khảo sát. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi gây sốc nhược trương trong dung dịch có nồng độ thấp và thời gian kéo dài làm nhiễm sắc thể biến dạng, tế bào vỡ và lạc nhiễm sắc thể.*

Từ khóa: *sốc nhược trương, aceto-carmine, Carnoy biến đổi, citrate natri, NaCl*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào mỗi loài sinh vật đều bộ nhiễm sắc thể ổn định và đặc trưng. Tuy nhiên, sự ổn định chỉ mang tính tương đối do có các nhiễm sắc thể bổ sung (B-chromosome), dị bội, hoặc đa bội. Đa bội hoá tự nhiên là xu hướng tiến hóa của thực vật và là một trong các con đường hình thành loài mới. Hiện tượng đa bội thường gặp ở nhiều loài thực vật thuộc họ hòa thảo (Poaceae), ráy (Araceae), chuối (Musaceae) ... nhưng hiếm ở động vật. Gần đây, sự phát triển của kỹ thuật lai

¹ Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

giống, cho phép tạo ra các giống tam bội mới có đặc điểm ưu việt hơn từ cây tứ bội và cây nhị bội.

Việc xác định mức độ sai khác về số lượng nhiễm sắc thể hoặc mức độ đa bội thể của tế bào so với kiểu nhân (karyotype) của loài có thể xác định bằng phương pháp đếm số lượng nhiễm sắc thể, phương pháp đo chỉ số lá, kích thước khí khổng và kích thước hạt phấn. Hiện nay, Flow Cytometry được xem là phương pháp xác định mức bội thể và kích thước genome một cách nhanh chóng, hữu hiệu và chính xác. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ hiệu quả khi đã biết 1 giống đối chứng với mức bội thể đã được xác định thông qua đếm số lượng nhiễm sắc thể.

Kỹ thuật xác định kiểu nhân của các loài liên quan các bước: sử dụng tế bào đang phân chia (hay tế bào nuôi cấy), xử lý sốc nhược trương, làm dừng quá trình nguyên phân ở kỳ giữa, thực hiện tiêu bản hiển vi, chụp hình nhiễm sắc thể và lập kiểu nhân. Ở thực vật, việc khảo sát bộ nhiễm sắc thể để xác định kiểu nhân thường thực hiện ở kỳ giữa của phân bào nguyên nhiễm ở mầm non của lá, đỉnh sinh trưởng của thân, đỉnh rễ non của cây hoặc đỉnh rễ chính của hạt vừa nảy mầm. Bên cạnh đó, người ta còn tiến hành nghiên cứu bộ nhiễm sắc thể ở kỳ giữa của quá trình phân bào giảm nhiễm (Nguyễn Nghĩa Thìn, 2008). Tuy nhiên, việc đếm nhiễm sắc thể thường gặp trở ngại lớn ở loài có số lượng nhiễm sắc thể lớn hoặc nhiễm sắc thể có kích thước lớn nên xử lý nhược trương làm nhiễm sắc thể phân tán trong tế bào, xử lý để nhiễm sắc thể rút ngắn chiều dài hoặc xử lý để tế bào ngừng phân chia ở kỳ giữa là cần thiết. Mục tiêu của nghiên cứu là xác định phương pháp xử lý sốc nhược trương ở tế bào thực vật và tế bào động vật và ứng dụng việc xử lý sốc nhược trương để đếm số lượng nhiễm sắc thể ở tế bào thực vật và tế bào động vật.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chuẩn bị mẫu vật

Rễ mầm: hạt giống dưa hấu lai F₁ TN 736 tiểu hắc long hạt lép ủ nảy mầm đến khi rễ mầm dài 2-3 cm

Lá mầm: hạt giống đậu Hà lan (*Pisum sativum* L.) ủ cho ra lá mầm

Rễ non: củ, cây con hoặc thân của hành tây (*Allium ascalonicum* L.), hành tây (*Allium cepa* L.) và các cây thuộc họ ráy (Araceae) ngâm trong cát ẩm cho ra rễ non đến khi có độ dài 2-3 cm

Lá non: phần lá non nhất ở bên trong thân cây chuối non (*Musa paradisiaca* L.)

Tuyển nước bọt của ấu trùng ruồi giấm: Thu nhận và nuôi ruồi giấm (*Drosophila sp.*) trong môi trường khóm và chuối chín. Đến ngày thứ 4, ấu trùng đã phát triển sang giai đoạn dòi III. Thu dòi III để tách tuyển nước bọt (gồm 2 thùy trong suốt và nối với nhau bằng 1 ống chung) trong dung dịch NaCl 0,75%.

Não của ấu trùng ruồi giấm (*Drosophila sp.*): Trước khi tách não, cho dòi III vào đĩa đồng hồ có nằm men bánh mì với tỉ lệ (0,1g/1ml) trong 15 phút. Dòi III sau khi xử lý, được sử dụng để tách não (khối màu trắng ở phần đầu) trong dung dịch NaCl 0,75%.

Tuyển tinh của châu chấu (*Acrida Linnaeus, 1758*): Châu chấu được bắt ở các đám cỏ, ruộng lúa. Giải phẫu và tách đôi tuyển tinh hình chùm lẫn thể mỡ màu vàng, nằm ở khoảng đốt bụng thứ 3.

2.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Xử lý sốc nhược trương và thực hiện tiêu bản hiển vi tạm thời để khảo sát số lượng nhiễm sắc thể ở tế bào thực vật

Xác định thời điểm phân bào tối ưu: Cố định mẫu vật trong Carnoy biến đổi ở các thời điểm khác nhau vào buổi sáng từ 8 giờ đến 10 giờ trong thời gian 4 giờ. Sau khi cố định, thực hiện tiêu bản hiển vi tạm thời để xác định thời điểm mà các tế bào của mô phân sinh đang phân bào mạnh và trên tiêu bản quan sát có nhiều tiền kỳ giữa (Prometaphase).

Sốc nhược trương: thời gian sốc nhược trương bố trí trước thời điểm phân bào tối ưu. Thu mẫu vào thời điểm từ 8 giờ đến 9 giờ buổi sáng. Cho rễ non, rễ mầm, lá non hoặc lá mầm vào dung dịch nhược trương citrate natri ($C_6H_5Na_3O_7$) với nồng độ 0,6%, 0,5%, 0,4% và 0,3% trong thời gian 30 - 45 phút, 45 - 60 phút.

Cố định mẫu: Mẫu sau khi xử lý sốc nhược trương được cố định bằng dung dịch Carnoy biến đổi trong 4 giờ. Thời điểm cố định mẫu từ 9 giờ đến 10 giờ sáng tùy mẫu vật. Mẫu sau khi cố định được rửa nhiều lần bằng cồn 70° và trữ trong cồn 70° ở nhiệt độ 4-5°C.

Làm mủn và nhuộm mẫu:

- Làm mủn mẫu vật bằng nhiệt: Cho mẫu vào ống nghiệm có sẵn aceto-carmin 1% và ngâm trong thời gian từ 30 phút đến 45 phút, sau đó đun nhẹ từ 5 phút đến 7 phút.
- Làm mủn mẫu vật bằng thủy giải: Cho mẫu vào dung dịch HCl 1N: Methanol với tỉ lệ 1:1 trong thời gian 15 phút - 30 phút cho đến khi rễ mềm. Rửa mẫu bằng nước cất khoảng 15 phút để loại bỏ hết HCl. Nhuộm mẫu vật trong aceto-carmin 1% trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 35° - 45°C.

Thực hiện tiêu bản tạm thời bằng phương pháp ép: Cho mẫu (chóp rễ hoặc lá non) lên lame đã nhỏ một giọt aceto-carmin 1% và đặt lammelle. Ép nhẹ tiêu bản cho các tế bào được dàn đều ra.

Khảo sát số lượng nhiễm sắc thể: chụp ảnh 30 tế bào khác nhau ở kỳ giữa hoặc ở kỳ sau có nhiễm sắc thể phân tán, đếm số lượng nhiễm sắc thể (sử dụng phần mềm photoshop để tăng độ tương phản) và kiểm định giá trị trung bình với độ tin cậy $1-\alpha = 95\%$.

Thí nghiệm 2: Xử lý sốc nhược trương và thực hiện tiêu bản hiển vi tạm thời để khảo sát số lượng nhiễm sắc thể ở tế bào động vật

Tuyển nước bọt của ấu trùng ruồi giấm (*Drosophila sp.*):

Sốc nhược trương: Cho đôi tuyển nước bọt vào dung dịch NaCl 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3% trong 10 phút.

Cố định và nhuộm mẫu: Aceto-carmin 1% được sử dụng vừa là chất cố định vừa là phẩm nhuộm trong thời gian 7 phút ở nhiệt độ 40°C - 45°C.

Đặt lammelle nhẹ nhàng để các tế bào trải đều trên lame (không ép vỡ tế bào)

Não của ấu trùng ruồi giấm (*Drosophila sp.*):

Cho não vào dung dịch NaCl 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3% trong 10 phút. Sau khi sốc nhược trương, não được cố định và nhuộm tương tự như phương pháp thực hiện ở tuyến nước bọt của ấu trùng ruồi giấm.

Tuyến tinh của châu chấu (*Acrida Linnaeus, 1758*):

Sốc nhược trương: Cho tuyến tinh của châu chấu vào dung dịch NaCl 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3% trong thời gian 10 phút.

Cố định: Tuyến tinh sau khi xử lý được cố định trong dung dịch Carnoy biến đổi trong thời gian 4 giờ. Rửa mẫu bằng cồn 70° và trữ trong cồn 70° ở nhiệt độ 4-5°C.

Nhuộm mẫu: ngâm mẫu aceto-carmine 1% trong thời gian 12 phút - 15 phút ở nhiệt độ 35° - 40°C.

Thực hiện tiêu bản tạm thời bằng phương pháp ép.

Thí nghiệm 3: Thực hiện tiêu bản hiển vi cố định

Các tiêu bản hiển vi tạm thời của tế bào động vật và tế bào thực vật có nhiễm sắc thể phân tán trong tế bào được chuyển thành tiêu bản hiển vi cố định qua các giai đoạn: tách lammelle và phân hóa màu, khử nước, làm trong mẫu và dán mẫu. Lame trước khi ép mẫu đã tráng albumine và làm vừa khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 45°-50°C.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xử lý sốc nhược trương và khảo sát số lượng nhiễm sắc thể ở tế bào thực vật

Xác định thời điểm phân bào tối ưu ở các loài

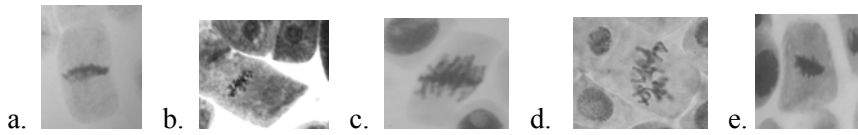
Thời điểm phân bào tối ưu (mật độ tế bào đang phân chia nhiều, có nhiều kỳ khác nhau của quá trình nguyên phân) tùy loại mô phân sinh: rễ mầm đậu Hà Lan (8 giờ 30 - 9 giờ), rễ mầm của dưa hấu hạt lép (9 giờ - 9 giờ 30), lá chuối non (9 giờ 30 - 10 giờ), rễ mầm của hành tây và hành ta và rễ non các cây họ ráy (9 giờ 30 - 10 giờ). Đây cũng là thời điểm cố định mẫu vật trong Carnoy. Theo Trần Tú Ngà (1982), ở thực vật trong đa số trường hợp thời điểm phân chia cực đại vào buổi sáng (khoảng 8 - 9 giờ). Thời gian lấy rễ tốt nhất từ 8 - 10 giờ sáng tùy mùa (Nguyễn Nghĩa Thìn, 2008).

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy:

- Nếu thu mẫu và cố định trước thời điểm phân bào tối ưu: phần lớn tế bào quan sát trên tiêu bản đang ở giai đoạn kỳ trung gian và kỳ trước.
- Nếu thu mẫu và cố định trong thời điểm phân bào tối ưu thì trên 1 tiêu bản có tất cả các giai đoạn của quá trình phân bào, nhiều kỳ giữa và kỳ sau, ít tế bào đang ở giai đoạn kỳ trung gian và kỳ trước.
- Nếu thu mẫu và cố định sau thời điểm phân bào tối ưu: phần lớn tế bào quan sát trên tiêu bản đang ở giai đoạn kỳ cuối và kỳ trung gian.

Xác định nồng độ và thời gian gây sốc nhược trương

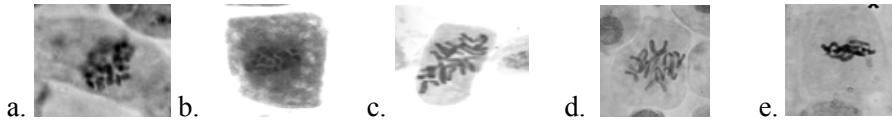
- Khi không xử lý sốc nhược trương, các nhiễm sắc thể ở kỳ giữa tập trung ở mặt phẳng xích đạo, rất ít tế bào có nhiễm sắc thể phân tán ở giai đoạn tiền kỳ giữa (Hình 1).



Hình 1: Tế bào ở kỳ giữa khi không xử lý sốc nhược trương (X1.000)

a. Chuối nhà (*Musa paradisiaca* L.), b. Dừa hấu tiểu hắc long hạt lép, c. Hành ta (*Allium ascalonicum* L.), d. Hành tây (*Allium cepa* L.), e. Đậu Hà lan (*Pisum sativum* L.)

- Trước khi cố định, mẫu vật được xử lý sốc nhược trương với citrate natri ở các nồng độ và thời gian khác nhau. Khi xử lý mẫu bằng citrate natri ở các nồng độ 0,5% và 0,6% trong thời gian 30 phút – 60 phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, kết quả chưa gây sốc nhược trương (nhiễm sắc thể phân tán nhưng còn chồng lên nhau) (Hình 2).



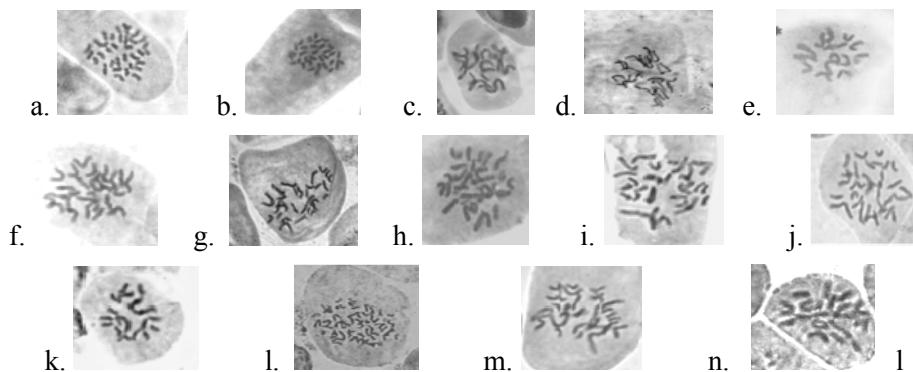
Hình 2: Tế bào chưa gây sốc nhược trương (X1.000)

a. Chuối nhà (*Musa paradisiaca* L.), b. Dừa hấu tiểu hắc long hạt lép, c. Hành ta (*Allium ascalonicum* L.), d. Hành tây (*Allium cepa* L.), e. Đậu Hà lan (*Pisum sativum* L.)

- Xử lý mẫu bằng citrate natri 0,4% trong thời gian 30 phút – 45 phút, ở nhiệt độ phòng thí nghiệm đã gây sốc nhược trương (tế bào trương lên và nhiễm sắc thể phân tán trong tế bào). Ở rễ ráy voi (*Alocasia macrorhiza* (L.) G. Don.), trầu bà vàng (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engler cv. *aureum* Nichols) và chóc bạc (*Syngonium podophyllum* Schott), xử lý sốc nhược trương bằng citrate natri 0,4% trong thời gian là 45 phút - 60 phút cho kết quả tốt hơn 30 phút - 45 phút.

Rễ mầm dừa hấu tiểu hắc long hạt lép và lá mầm đậu Hà lan được xác định có thời điểm phân bào có nhiều tiền kỳ giữa sớm nên thời gian sốc nhược trương khoảng 35- 40 phút trong citrate natri 0,3%.

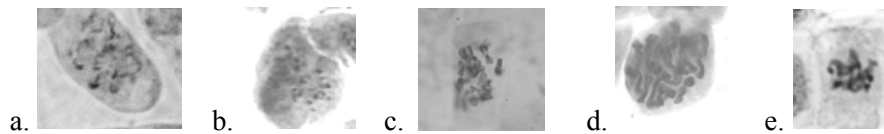
Các tế bào thực vật đã được xử lý sốc nhược trương ở kỳ giữa có các nhiễm sắc thể phân tán ở hình 3:



Hình 3: Tế bào có nhiễm sắc thể phân tán sau khi xử lý sốc nhược trương (X1.000)

a. Chuối nhà (*Musa paradisiaca* L.), b. Dừa hấu tiểu hắc long hạt lép, c. Hành ta (*Allium ascalonicum* L.), d. Hành tây (*Allium cepa* L.), e. Đậu Hà lan (*Pisum sativum* L.), f. Bạc hà (*Alocasia odora* C. Koch), g. Ráy voi (*Alocasia macrorhiza* (L.) G. Don.), h. Môn ngứa (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), i. Khoai môn (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), j. Môn đóm (*Caladium bicolor* (Ait.) Vent.), k. Mái dầm (*Cryptocoryne ciliata* Wydler), l. Trầu bà vàng (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engler cv. *aureum* Nichols), m. Bạch phiến (*Spathiphyllum patinii* N. E. Br.), n. Cây chóc bạc (*Syngonium podophyllum* Schott)

- Mẫu vật trong môi trường nhược trương quá lâu (>90 phút), tế bào trương nhưng khó nhận diện nhân và nhiễm sắc thể (Hình 4).



Hình 4: Tế bào khi xử lý sốc nhược trương quá lâu (X1.000)

a. Chuối nhà (*Musa paradisiaca* L.), b. Dưa hấu tiêu hắc long hạt lép, c. Hành ta (*Allium ascalonicum* L.), d. Hành tây (*Allium cepa* L.), e. Đậu Hà lan (*Pisum sativum* L.)

Theo Trần Công Khánh (1980), khi nghiên cứu tế bào và mô thực vật, cần sử dụng các dung dịch sinh lý để nuôi sống tế bào như dung dịch Knop hoặc các dung dịch dùng cho động vật như Ringer, Locke, Tyrode. Để khảo sát số lượng nhiễm sắc thể, tế bào thực vật được xử lý nhược trương trong KCl 0,075M (Ruiyang *et al.*, 1982) hoặc trong dung dịch nhược trương Ohnuki (55 mM KCl, 55mM NaNO₃ and 55mM NaC₂H₃O₂ tỉ lệ 10:5:2). Trong nghiên cứu này, citrate natri cũng có hiệu quả gây sốc nhược trương ở tế bào thực vật làm nhiễm sắc thể phân tán trong tế bào, tuy nhiên khi gây sốc nhược trương trong dung dịch có nồng độ thấp và thời gian kéo dài làm nhiễm sắc thể biến dạng.

Khảo sát số lượng nhiễm sắc thể ở tế bào thực vật: Số lượng nhiễm sắc thể trong các tế bào khảo sát liệt kê ở bảng 1.

Bảng 1: Số lượng nhiễm sắc thể ở các loài thực vật

Loài	Kết quả	Kết quả trước	Tác giả
Chuối nhà (<i>Musa paradisiaca</i> L.)	2n = 3x= 33,2 ± 0,137	2n = 3x = 33	Ortiz and Vuylsteke, 1994
Dưa hấu Tiêu hắc long hạt lép	2n = 3x = 32,733 ± 0,8		
Hành ta (<i>Allium ascalonicum</i> L.)	2n = 15,733 ± 0,363	2n = 16	Baranyi and Greilhuber, 1999
Hành tây (<i>Allium cepa</i> L.)	2n = 16,066 ± 0,419	2n = 16	Paknia and Karimzadeh, 2010
Đậu Hà lan (<i>Pisum sativum</i> L.)	2n = 14,233 ± 0,260	2n = 14	Murtaza <i>et al.</i> , 2005
Bạc hà (<i>Alocasia odora</i> C. Koch)	2n = 28,3 ± 0,444	2n = 56 2n = 28	Sultana <i>et al.</i> , 2011 Peterson, 1989
Ráy voi (<i>Alocasia macrorhiza</i> (L.) G. Don.)	2n = 27,9 ± 0,214	2n = 28 2n = 26	Sultana <i>et al.</i> , 2011 Mohamed <i>et al.</i> , 2006
Môn ngứa (<i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott)	2n = 28,233 ± 0,423	2n = 28	Nguyen X.V., 1998
Khoai môn (<i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott)	2n = 28,367 ± 0,295	2n = 28 2n = 3x = 42	Kreike <i>et al.</i> , 2004
Môn dóm (<i>Caladium bicolor</i> (Ait.) Vent.)	2n = 27,633 ± 0,652	2n = 28	Sharma and Sarkara, 1964
Mái dầm (<i>Cryptocoryne ciliata</i> Wydler)	2n = 18,067 ± 0,257	2n = 22	Arends <i>et al.</i> , 1982
Trầu bà vàng (<i>Epipremnum pinnatum</i> (L.) Engler cv. <i>aureum</i> Nichols)	2n = 55,533 ± 0,615	2n = 60.2	Marchant, 1970
Bạch phiến (<i>Spathiphyllum patinii</i> N.E. Br.)	2n = 29,633 ± 0,417	2n = 30	Mohamed <i>et al.</i> , 2006
Chóc bạc (<i>Syngonium podophyllum</i> Schott)	2n = 17,933 ± 0,347	2n = 22	Mohamed <i>et al.</i> , 2006

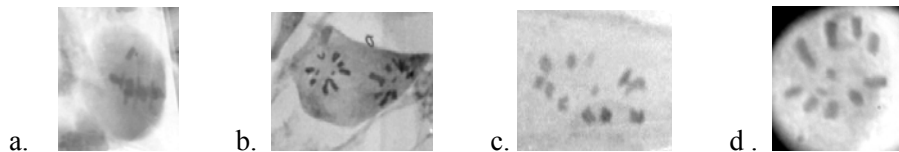
3.2 Xử lý sốc nhược trương ở tế bào động vật và khảo sát số lượng nhiễm sắc thể ở tế bào động vật

3.2.1 Tế bào sinh dục đực châu chấu (*Acrida Linnaeus*, 1758)

Ở tế bào sinh dục đực châu chấu (*Acrida Linnaeus*, 1758) khi cố định ở các thời điểm khác nhau trong ngày đều quan sát được các giai đoạn của quá trình giảm phân.

Theo Sharma (1966), dung dịch NaCl 0,73% môi trường đẳng trương đối với tế bào sinh dục đực của châu chấu. Nếu tách tuyến sinh dục trong môi trường NaCl 0,73% rồi cố định để thực hiện tiêu bản thì các nhiễm sắc thể ở kỳ giữa thường tập trung ở mặt phẳng xích đạo và nhiễm sắc thể giới tính X dạng que không nằm trên mặt phẳng xích đạo (Hình 5a). Đôi khi có tế bào có nhiễm sắc thể phân tán.

- Khi tách tuyến sinh dục châu chấu (*Acrida Linnaeus*, 1758) trong môi trường đẳng trương rồi xử lý nhược trương bằng NaCl 0,6% và 0,5% trong 10 phút trước khi cố định, kết quả cho thấy tế bào trương nhưng không vỡ, các nhiễm sắc thể phân tán trong tế bào nhưng còn chồng nhau.
- Khi tách tuyến sinh dục châu chấu trong môi trường đẳng trương rồi xử lý nhược trương bằng NaCl 0,4% trong 10 phút trước khi cố định, kết quả cho thấy tế bào trương, nhiễm sắc thể phân tán rõ. Ở kỳ sau I, mỗi cực tế bào gồm 11 cặp nhiễm sắc thể thường (2 cặp hình dạng hạt, 9 cặp hình que dài ngắn khác nhau) và 1 nhiễm sắc thể giới tính X dạng que (hoặc không có) (Hình 5b). Ở kỳ giữa II quan sát được 11 cặp nhiễm sắc thể thường và 1 nhiễm sắc thể giới tính X dạng que (Hình 5c). Ở kỳ sau II, tại mỗi cực tế bào quan sát 11 nhiễm sắc thể đơn hoặc 12 nhiễm sắc thể đơn (Hình 5d).



Hình 5: Tế bào và nhiễm sắc thể của châu chấu (*Acrida Linnaeus*, 1758) (X1.000)

a. Tế bào khi không xử lý nhược trương, b. Tế bào ở sau I, c. Tế bào ở kỳ giữa II, d. 1 cực tế bào ở kỳ sau II (11 nhiễm sắc thể đơn)

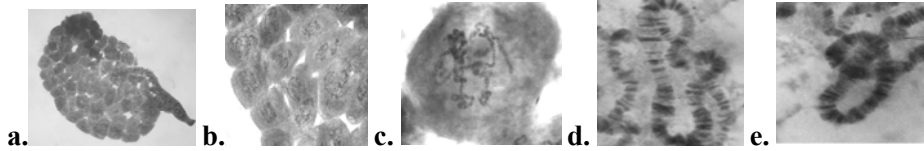
- Khi tách tuyến sinh dục châu chấu trong môi trường đẳng trương rồi xử lý nhược trương bằng NaCl 0,3%, kết quả cho thấy nhiều tế bào vỡ ra, gây lạc nhiễm sắc thể.

3.2.2 Tế bào tuyến nước bọt ruồi giấm (*Drosophila sp.*)

Theo Sharma (1966), dung dịch đẳng trương ở ấu trùng ruồi giấm (*Drosophila sp.*) là NaCl 0,7% hoặc dung dịch Ringer của ruồi giấm gồm 860 mg NaCl, 30 mg KCl, 35 mg CaCl₂ trong 100ml nước cất. Khi tách tuyến nước bọt trong môi trường này rồi cố định và thực hiện tiêu bản, kết quả cho thấy muốn quan sát rõ hình dạng nhiễm sắc thể cần phải ép vỡ tế bào.

- Nếu tách tuyến nước bọt trong môi trường đẳng trương NaCl 0,73% rồi xử lý nhược trương trong NaCl 0,6% trước khi cố định rồi thực hiện tiêu bản, kết quả cho thấy tế bào trương lên nhưng chưa quan sát rõ hình dạng của nhiễm sắc thể trong tế bào.

- Khi tách tuyến nước bọt trong môi trường đẳng trương NaCl 0,73% rồi xử lý nhược trương trong NaCl 0,5% trong 10 phút trước khi cố định rồi thực hiện tiêu bản, kết quả cho thấy tế bào trương lên và quan sát được hình dạng của 1 nhiễm sắc thể khổng lồ trong mỗi tế bào không bị vỡ. Mỗi nhiễm sắc thể khổng lồ có các dây tỏa ra ở vùng tâm động (có thể quan sát 5 dây dài và 1 dây ngắn). Trên mỗi dây nhiễm sắc thể có vùng dị nhiễm sắc xen lẫn vùng đồng nhiễm sắc và vùng búp hóa (Hình 6). Kết quả tương tự nhiễm sắc thể khổng lồ như Nguyễn Như Hiền (2006) đã mô tả.



Hình 6: Tuyến nước bọt và nhiễm sắc thể khổng lồ trong mỗi tế bào của tuyến nước bọt (X1.000)

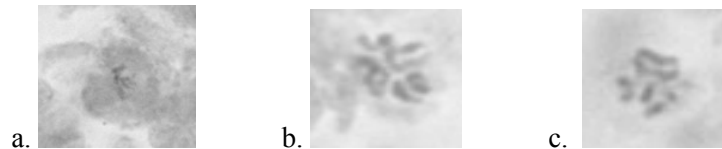
a. Tuyến nước bọt, b. Các tế bào của tuyến nước bọt, c. Nhiễm sắc thể khổng lồ trong 1 tế bào, d. Vùng đồng nhiễm sắc và vùng dị nhiễm sắc của nhiễm sắc thể khổng lồ, e. Vùng búp hóa

- Khi tách tuyến nước bọt trong môi trường đẳng trương NaCl 0,73% rồi xử lý nhược trương trong NaCl 0,3 % trong 10 phút, kết quả quan sát cho thấy nhiều tế bào vỡ ra.

3.2.3 Tế bào não của ấu trùng ruồi giấm (*Drosophila sp.*)

Đối với mẫu não của ấu trùng ruồi giấm (*Drosophila sp.*), trước khi lấy tách não, cho dòi III được xử lý trước trong thời gian 15 phút với nấm men bánh mì để kích thích phân bào nguyên nhiễm (cho dòi III vào 0,1g nấm men /1 ml nước cất).

- Khi tách não trong môi trường đẳng trương NaCl 0,73% rồi xử lý nhược trương trong NaCl 0,6% trong 10 phút, kết quả cho thấy nhiễm sắc thể chưa phân tán (Hình 7a).
- Khi tách não trong môi trường đẳng trương NaCl 0,73% rồi xử lý nhược trương trong NaCl 0,5% trong 10 phút, kết quả cho thấy nhiễm sắc thể phân tán trong tế bào.



Hình 7: Tế bào chưa gây sốc nhược trương (X1.000)

a. Tế bào não ấu trùng ruồi giấm (*Drosophila sp.*) khi xử lý NaCl 0,6%, b và c). Tế bào não ấu trùng ruồi giấm khi xử lý NaCl 0,5%

Ở ruồi giấm, số nhiễm sắc thể trong tế bào thay đổi tùy loài. Ở *Drosophila melanogaster* bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội $2n = 8$. Theo Watabe *et al.* (1997), bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội của *Drosophila gani* là $2n = 12$ và ở *Drosophila okadai* $2n = 12$. Kết quả quan sát tiêu bản ở ruồi giấm thu trong môi trường tự nhiên (*Drosophila sp.*) này có bộ nhiễm sắc thể $2n = 8$. Để khảo sát hình dạng của nhiễm sắc thể cần nhuộm nhiễm sắc thể theo phương pháp nhuộm C-band.

- Khi tách não trong môi trường đẳng trương NaCl 0,73% rồi xử lý sốc nhược trương trong NaCl 0,4% và 0,3% trong 10 phút kết quả cho thấy tế bào bị vỡ, nhiễm sắc thể bị lác.

Ở tế bào động vật, theo các nghiên cứu khác, các loại hóa chất được sử dụng gây sốc nhược trương ở là citrate natri (Meredith, 1996) hoặc KCl (Mesa *et al.*, 1990). Trong nghiên cứu này, NaCl được sử dụng để gây sốc nhược trương cũng có hiệu quả làm phân tán nhiễm sắc thể trong tế bào.

3.3 Thực hiện tiêu bản cố định

Tách lammelle và phân hóa màu

Tách lammelle bằng axit acetic: úp ngược tiêu bản tạm thời vào dung dịch axit acetic 30%. Khi lammelle đã tách ra, tiêu bản được ngâm thêm 30 giây nữa để làm tăng độ tương phản.

Tách lammelle bằng đá CO₂: đặt tiêu bản tạm thời lên vĩ đá CO₂ trong ngăn đá tủ lạnh trong thời gian từ 12 - 24 giờ. Tách lammelle ra khỏi lame. Cho lame đã tách lammelle vào dung dịch acid acetic 30% trong thời gian 30 giây để phân hóa màu.



Hình 8: Tách lammelle bằng acid acetic (a) và bằng đá CO₂ (b)

Khử nước: Lame có mẫu vật sau khi đã tách lammelle được chuyển qua các lọ cồn có nồng độ tăng dần (30°, 50°, 60°, 70°, 75°, 80°, 85°, 90°, cồn tuyệt đối) để khử nước. Thời gian giữ mẫu qua các lọ cồn thay đổi tùy loại mẫu vật để mẫu không mất màu nhanh (khử chưa hết nước) hoặc tế bào bị teo (khi khử nước nhiều quá).

Làm trong mẫu: Chuyển lame có mẫu đã khử nước qua xylene I và xylene II hoặc chuyển lame có mẫu đã khử nước qua n-butanol và xylene. Tiêu bản cố định cần đạt về yêu cầu: tế bào không teo, màu tương phản, giữ màu lâu, quan sát được nhiễm sắc thể.

Bảng 2: Thời gian khử nước trong cồn (giây)

	Chuối	Dưa hấu	Hành tây	Hành ta	Đậu hà lan	Châu chấu	Não	Tuyến nước bọt
Cồn 30°						5	5	5
Cồn 40°						5	5	5
Cồn 50°	30	20	18	17	20	5	5	5
Cồn 60°	30	20	18	17	20	5	5	5
Cồn 70°	30	17	18	17	17	5	5	5
Cồn 80°	30	17	18	17	17	5	5	5
Cồn 90°	25	17	18	17	17	5	5	5
Cồn 99°5	20	10	15	10	10	5	5	5
n- Butanol		10	10	10				
Xylen I	15	5	5	5	15	7 phút	5 phút	5 phút
Xylen II	15				15	7 phút	5 phút	5 phút

Dán mẫu: Mẫu sau khi khử nước được đập và dán lammelle bằng Baume canada

4 KẾT LUẬN

Ở tế bào thực vật (rễ non, lá non, rễ mầm và lá mầm) của hành ta (*Allium ascalonicum* L.), hành tây (*Allium cepa* L.), đậu hà lan (*Pisum sativum* L.), dưa hấu lai F1 TN736 tiểu hắc long hạt lép, chuối nhà và 9 loài thực vật thuộc họ ráy (Araceae) khi được xử lý bằng citrate natri ($C_6H_5Na_3O_7$) 0,4% trong thời gian 30 - 60 phút (tùy loài) trước khi cố định để thực hiện tiêu bản hiển vi đã gây được sốc nhược trương tế bào. Ở tế bào sinh dưỡng của động vật như não, tuyến nước bọt của ấu trùng ruồi giấm (*Drosophila sp.*) được xử lý bằng NaCl 0,5% và tế bào sinh dục của châu chấu đực (*Acrida* Linnaeus, 1758) được xử lý bằng NaCl 0,4% trong thời gian 10 phút trước khi cố định cũng gây được sốc nhược trương. Sốc nhược trương ý nghĩa trong việc làm phân tán nhiễm sắc thể nhưng cũng có khuynh hướng làm tế bào và nhiễm sắc thể tổn thương. Số lượng nhiễm sắc thể của các loài nghiên cứu đã được khảo sát. Quy trình thực hiện tiêu bản hiển vi tạm thời và cố định của tế bào động vật và tế bào thực vật đã được sốc nhược trương cũng được xác định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arends, J.C., J.D. Bastmeijer & N. Jacobsen. 1982. Chromosome Numbers and Taxonomy in Cryptocoryne (Araceae).II. *Nord. J. Bot.* 2 : 453-463
- Baranyi, M. and J. Greilhuber. 1999. Genome Size in Allium: In Quest of Reproducible Data. *Annals of Botany*, 83: 687-695
- Cao, L. M and C. L. Long. 2003. Colocasia Bicolor (Araceae), a New Species from Yunan, China. *National Natural Science Foundation of China*, 40: 283 – 286
- Kreike, C. M., H. J. Van Eck and V. Lebot. 2004. Genetic Diversity of Taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott, in Southeast Asia and the Pacific. *Theor Appl Genet*, 109: 761–768
- Marchant C. J. 1970. Chromosome Variation in Araceae I: *Potheae* to *Stylochitonae*. *Knew bull*, 24(5): 315-322
- Meredith, R. 1996. A Simple Method for Preparing Meiotic Chromosomes from Mammalian Testis. *Chromosoma (Berl.)*. 26: 254-256
- Mesa, A., C. S. Fontanelti and H. Costa. 1990. The Karyotype of Grasshopper *Spathalium helios* Rehn 1918 (Orthoptera, Acridoidea, Ommexechidea. *Rev Brazil Genet*, 13(4): 705-710
- Mohamed, T. R., S. F. Khalifa and R. M. Salah El - Dine. 2006. Leaf Protein Electrophoretic Profiles and Chromosome Numbers of Some Araceae. *International Journal of Agriculture & Biology*, 08(2): 231–234
- Murtaza, G., N. Ahmed and S. A. Majid. 2005. Karyotype Analysis of *Pisum sativum* L.. *International Journal of Agriculture & Biology*, 07(1): 118–120
- Nguyễn Như Hiền. 2006. *Sinh học tế bào*. NXB Giáo dục.
- Nguyễn Nghĩa Thìn. 2008. *Các phương pháp nghiên cứu thực vật*. NXB Đại học quốc gia Hà Nội.
- Nguyen Xuan Viet, H. Yoshino, M. Tahara. 1998. Genetic Control of for Enzymes in Diploid Taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott. *Breeding Science*, 48: 273 - 280
- Ortiz, R. and D. R. Vuylsteke. 1994. Genetics of Apical Dominance in Plantain (*Musa* spp., AAB Group) and Improvement of Suckering Behavior. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(5): 1050–1053.
- Paknia, R. and G. Karimzadeh. 2010. Karyotypic Study in Some Iranian Local Onion Populations. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 1(1): 49-56

- Ruiyang, C. , S. Wenqin and L. Xiulan. 1982. Wall Degradation Hypotonic Method of Preparing Chromosome Samples in Plant and Its Significance in the Cytogenetics. *JGG*, 9(2): 151-159
- Sharma, A. K. 1965. *Chromosome Techniques Theory and Practice*. London butterworths.
- Sultana, S. S. , H. Ara and S. S. Alam. 2011. Karyotype Analysis with Orcein and CMA in Two Species of *Alocasia* (Schott) G. Don (Araceae). *Bangladesh J. Bot.* 40(1): 53-56
- Trần Tú Ngà. 1982. *Giáo trình thực tập di truyền học và chọn giống*. NXB Nông nghiệp Hà Nội.
- Trần Công Khánh. 1980. *Kỹ thuật hiển vi dùng trong nghiên cứu y học và dược liệu*. NXB Y học Hà Nội.
- Watabe, H., J. Park and T. Aotsuka. 1997. A Karyotype Study on the *Drosophila rohusta* Species-Group (Diptera: Drosophilidae). *Zoological Science*. 14(5): 855-858.