

NGHIÊN CỨU SỰ PHÁT SINH HÌNH THÁI TRONG NUÔI CẤY LỚP MỎNG TẾ BÀO (Thin Cell Layer) LÁ Ở CÂY HỒ TIÊU (*Piper nigrum* L.)

Đỗ Đăng Giáp, Thái Xuân Du, Đoàn Thị Ái Thuyền
Viện Sinh học nhiệt đới

TÓM TẮT: Sự phát sinh mô sẹo từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào mảnh lá (transverse Thin Cell Layer - tTCL) ở cây hồ tiêu đã được ghi nhận. Sự phát sinh cơ quan chồi từ nuôi cấy mô sẹo có nguồn gốc từ nuôi cấy tTCL mảnh lá đã được mô tả. Những đám tế bào chưa phân hóa trong khối mô sẹo được hình thành từ nuôi cấy tTCL có nguồn gốc tế bào nhu mô của mô thịt lá qua nuôi cấy tTCL đã được định hướng thành những cơ quan đỉnh sinh trưởng và chồi hoàn chỉnh. Những chồi tái sinh từ nuôi cấy mô sẹo có nguồn gốc từ tTCL mảnh lá phát triển bình thường trên môi trường MS.

Chữ viết tắt: BAP – N6-benzyladenin; IAA – 3-indoleacetic acid; IBA – indole -3-butyric acid; MS – Murashige and Skoog medium (1962); TCL – Thin cell layer; 2,4-D – 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid.

Từ khóa: Thin Cell Layer, Hồ tiêu, *Piper nigrum* L., Morphogenesis.

1. MỞ ĐẦU

Cây hồ tiêu được du nhập vào nước ta từ cuối thế kỷ XIX, và được trồng nhiều ở các vùng đất bazan từ Quảng Trị trở vào đến các tỉnh Tây Nguyên, Đông Nam Bộ và một số tỉnh Tây Nam Bộ như Kiên Giang. Hạt hồ tiêu có giá trị cao trong xuất khẩu. Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu in vitro cây hồ tiêu thành công đã được ghi nhận như nuôi cấy từ đỉnh chồi (Nazeem và cs, 1992; Philip và cs, 1992; Bacu và cs, 1993; Joshep và cs, 1996); nuôi cấy protocom từ mô sẹo lá (Bacu và cs, 1993; Naneem và cs, 1993); nghiên cứu phát sinh hình thái từ mô sẹo (Sujatha và cs, 2003). Hầu hết các thí nghiệm đều sử dụng môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật: auxin, cytokinin. Nguồn auxin có thể là IBA, NAA, IAA và nguồn cytokinin gồm BA, kinetin. Năm 2003, Sujatha và Bacu đã tiến hành nghiên cứu phát sinh hình thái bằng nuôi cấy mảnh lá cây hồ tiêu với môi trường MS có bổ sung IAA và BA.

Trong bài này chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu sự phát sinh hình thái bằng hệ thống nuôi cấy lớp mỏng tế bào lá cây hồ tiêu in vitro.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Cây hồ tiêu *Piper nigrum* L. giống Vĩnh Linh (Việt Nam) in vitro do Phòng Công Nghệ

Tế Bào Thực Vật - Viện Sinh Học Nhiệt Đới cung cấp. Thí nghiệm được khảo sát với loại mô cấy: lớp mỏng tế bào lá. Vật liệu được sử dụng là mảnh lá cây in vitro từ cặp lá thứ 2 tính từ ngọn cây xuống, cắt lớp mỏng theo chiều ngang (transverse thin cell layer - tTCL) kích thước 0,5mm x 10mm.

Môi trường được sử dụng để khảo sát sự tạo mô sẹo là môi trường MS (1962) bổ sung vitamin Morel, sucroze 30g/l, agar 7g/l, pH 5,8 - 5,9. Sử dụng môi trường M1 (MS bổ sung tổ hợp 0,5 mg/L 2,4-D và 5 mg/L BA) để nghiên cứu sự phát sinh mô sẹo từ nuôi cấy tTCL mảnh lá. Sử dụng môi trường M2 (MS bổ sung 5 mg/L BA) để nghiên cứu sự phát sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ nuôi cấy tTCL mảnh lá trên môi trường sau 21 ngày sau đó cấy chuyển sang môi trường M2.

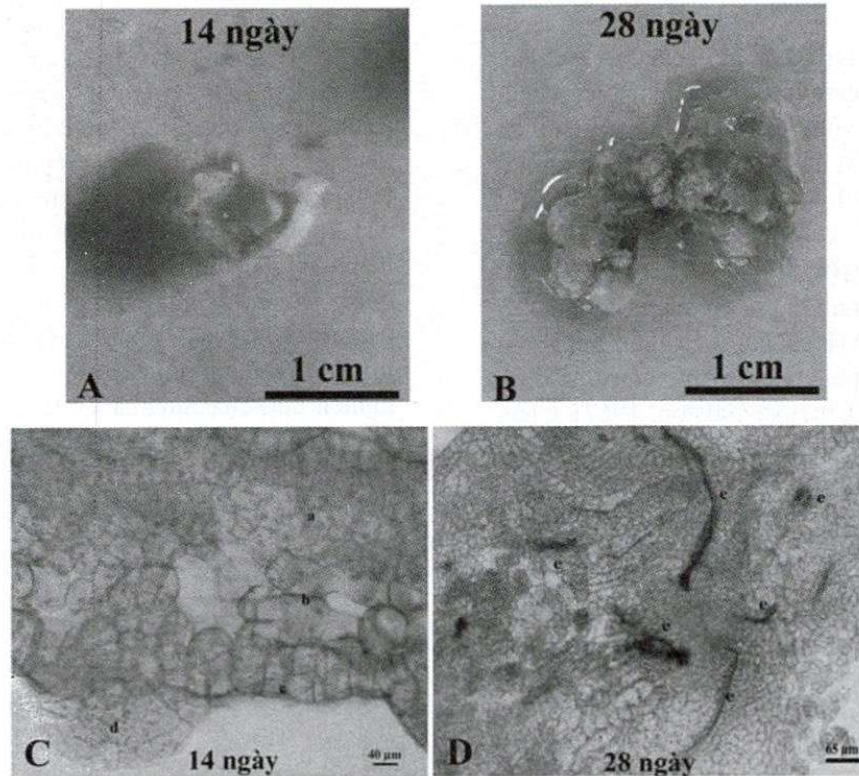
Môi trường (10-15 mL) được chứa trong đĩa petri và được khử trùng ở 121 °C trong 20 phút. Tế bào lớp mỏng mảnh lá ban đầu được nuôi trong tối (3 ngày) sau đó được nuôi cấy trong điều kiện có chế độ ánh sáng 30-35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Mỗi thí nghiệm thực được thử nghiệm trên 5 mẫu, lặp lại 3 lần. Thí nghiệm được đặt nhiệt độ 27°C \pm 2, cấy chuyển 2 tuần/lần.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Những kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu cấy tTCL mảnh lá dễ dàng hình thành mô sẹo trên

môi trường M1. Chúng tôi ghi nhận được sự đáp ứng rất sớm của mẫu cấy đối với môi trường nuôi cấy. Phân tích cấu trúc giải phẫu cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, vùng tế bào nhu mô của mô thịt lá đã phân chia sớm có thể phát triển thành những tế bào khử phân hóa. Sau 14 ngày, sự phân chia mạnh ở vùng nhu mô thịt lá thành những tế bào nhỏ dần, đồng dạng và hình thành các khối u nhỏ phát triển ra ngoài lớp biểu bì, có thể đây là bước chuyển tiếp từ tế bào ở trạng thái những tế bào phân hóa sang trạng thái những tế bào giống như mô phân sinh có khả năng sinh cơ

quan (hình 1A; 1C). Sau 28 ngày, cấu trúc giải phẫu bên trong mô cấy lớp mỏng lá hồ tiêu cho thấy có sự phân lớp từ ngoài vào trong mẫu cấy, bên ngoài là những đám tế bào nhỏ, đồng dạng, bên trong xuất hiện các bó mạch, có thể sự xuất hiện các bó mạch chính là cấu trúc hình thành nên các mạch của chồi về sau (hình 1B; 1D). Tuy nhiên, chúng tôi không ghi nhận được sự hình thành chồi khi nuôi cấy lớp mỏng lá hồ tiêu trên môi trường có 2,4-D, nếu nuôi cấy tiếp tục mẫu cấy khối mô sẹo sẽ dần hóa nâu và chết.



Hình 1. Mô sẹo hình thành từ nuôi cấy tTCL lá trên môi trường M1

A. Hình thái mô sẹo sau 14 ngày; C. Cấu trúc giải phẫu khối mô sẹo sau 14 ngày có sự phân chia mạnh tế bào ở vùng nhu mô thịt lá, hình thành các khối u nhỏ những tế bào đồng đều phát triển khỏi lớp biểu bì. a: vùng nhu mô; b: tế bào nhu mô đang phân chia mạnh; c: lớp biểu bì; d: vùng tế bào nhỏ đồng dạng tạo các khối u; B. Hình thái mô sẹo sau 28 ngày; D. Cấu trúc giải phẫu khối mô sẹo sau 14 ngày có sự phân chia mạnh tế bào và xuất hiện các bó mạch. e: các vùng hình thành mạch.

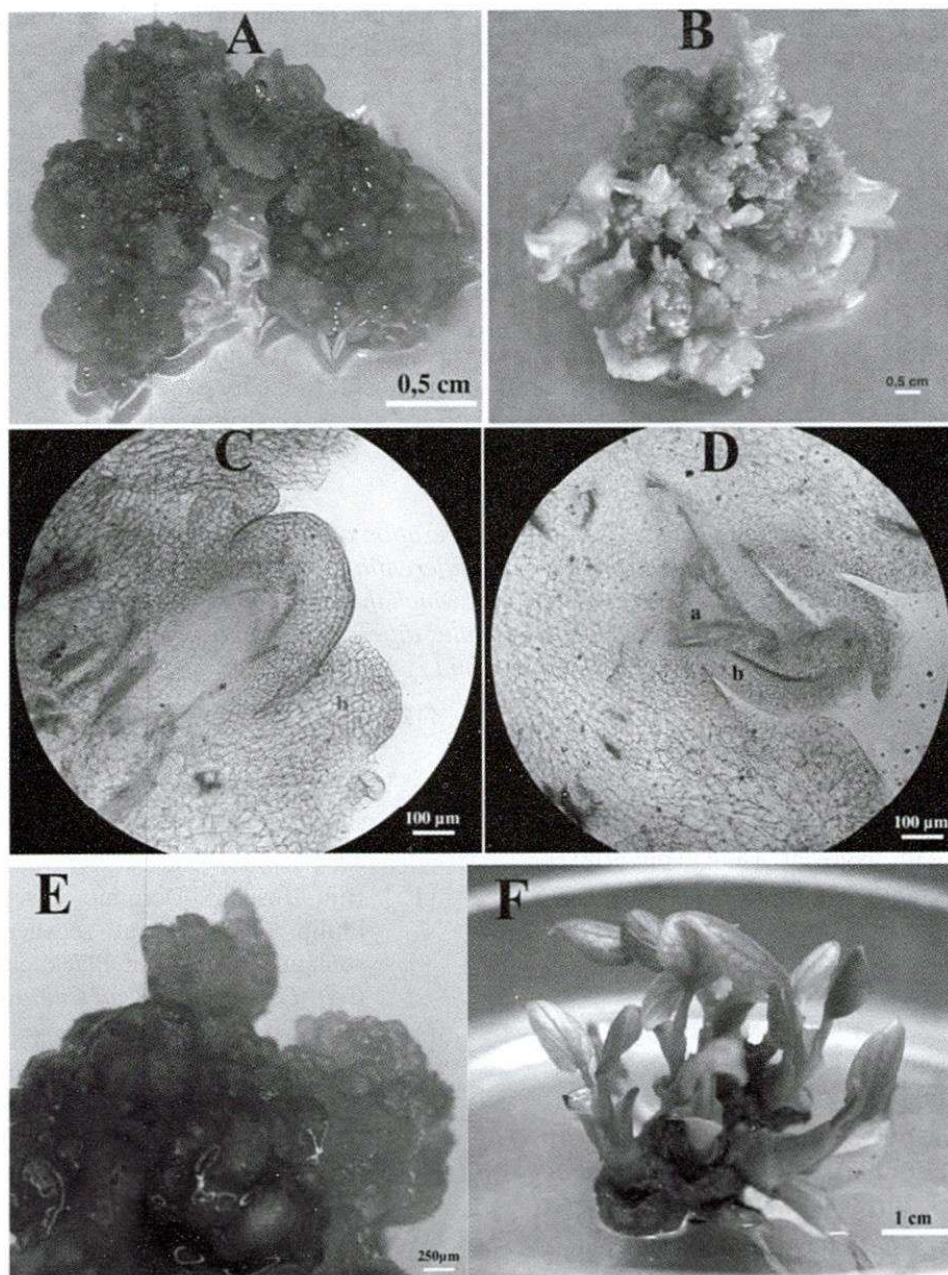
Sau thời gian 21 ngày các mẫu cây lớp mỏng lá hồ tiêu được nuôi cấy trên môi trường M1, được cấy chuyển sang môi trường M2 để kích thích phát sinh cơ quan. Sau 7 ngày nuôi cấy, mô cấy là những mô sẹo tăng sinh mạnh, ở những vùng có nốt sần của mô sẹo cũ cấy chuyển qua môi trường mới không có auxin (2,4-D). Sau 14 ngày nuôi cấy, khối mô sẹo tăng sinh tế bào mạnh cả về kích thước và số lượng tạo nên một khối mô dày và tạo nhiều những nốt sần trên bề mặt mô cấy có cấu trúc như những sơ khởi chồi (hình 2A). Sau 28 ngày nuôi cấy, trên bề mặt các nốt sần xuất hiện các chồi, trung bình có khoảng $67,89 \pm 2,43\%$ mẫu cấy hình thành chồi và số chồi này hình thành từng các cụm chồi trên khối mô sẹo, trung bình có khoảng $15,20 \pm 1,51$ chồi/mẫu cấy (hình 2B).

Cấu trúc giải phẫu của mẫu cấy sau 14 ngày nuôi cấy này rất phức tạp, có sự phân chia mạnh ở các nốt sần của vùng tế bào ở bề mặt trên mẫu cấy và rất nhiều bó mạch nằm rải rác bên trong, bề mặt nốt sần hình thành cấu trúc sơ khởi chồi (hình 2C). Sau 21 ngày nuôi cấy, đã thấy rõ cấu trúc giải phẫu của chồi (hình 2D).

Sự hình thành những nốt mạch trong mô sẹo trên môi trường M1 có thể biểu hiện hoặc dấu hiệu sớm của sự phát triển những cấu trúc đỉnh sinh trưởng chồi (Chen và Galston, 1967). Chen và Galston (1967), Cassels (1979) cũng ghi nhận sự xuất hiện những nốt mạch mọc trong mô sẹo cây *Pelargonium* báo hiệu sự phát triển cấu trúc

chồi khi chuyển mẫu cấy mô sẹo này vào môi trường không có auxin ngoại sinh. Ở cây hồ tiêu *Piper nigrum* L., chúng tôi nhận thấy khi chuyển những mô sẹo được nuôi trên môi trường có auxin M1 sang môi trường M2 không có auxin 2,4-D đã hình thành những sơ khởi chồi sau 14 ngày nuôi cấy và phát triển thành cấu trúc chồi hoàn chỉnh sau 21 ngày nuôi cấy tiếp theo (hình 2F). Như vậy, có thể chính sự hình thành các nốt mạch trong khối mô sẹo tạo tiền đề cho sự hình thành mạch chồi và kích thích phát sinh cơ quan chồi khi chuyển sang môi trường không có auxin.

Theo kết quả nghiên cứu của Sujatha và Bacu (2003), đã tiến hành nghiên cứu phát sinh hình thái bằng nuôi cấy mảnh lá cây Hồ tiêu với môi trường MS có bổ sung IAA và BA. Kết quả cho thấy các mô sẹo đầu tiên hình thành từ tế bào nhu mô (*Parenchyma cell*) của mô thịt lá (diệp nhục - *mesophyll tissue*) gần với những bó mạch lá định hướng phát triển thành những khối tế bào khử biệt hóa. Sự phân chia và phát triển của khối tế bào này xảy ra nhiều lần và hình thành những khối tế bào có khả năng sinh cơ quan tương tự như những tế bào ở đỉnh sinh trưởng. Như vậy, những kết quả nghiên cứu trong này cũng phù hợp với những kết quả nghiên cứu của Sujatha và Bacu (2003), chúng tôi ghi nhận nguồn gốc ban đầu của những tế bào có khả năng phát sinh hình thái chồi ở mô lá cây hồ tiêu là tế bào nhu mô thịt lá.



Hình 2. Hình thái mẫu cây khi nuôi cấy mô sẹo có nguồn gốc từ tTCL lá trên môi trường M2

A. Hình thái mô sẹo sau 14 ngày; B. Hình thái chồi sau 21 ngày; C. Cấu trúc sơ khởi chồi ở mô cây sau 14 ngày: a. sơ khởi chồi, b. đám tế bào có khả năng sinh lá, c. bó mạch kích thích sự hình thành sơ khởi chồi; D. Cấu trúc chồi hoàn chỉnh ở mô cây sau 21 ngày: a. đỉnh sinh trưởng, b. lá; E. Cấu trúc chồi thấy rõ dưới kính lúp soi nổi hình thành trên khối u ở mẫu cây sau 21 ngày. F. Cụm chồi hoàn chỉnh sau 56 ngày.

4. KẾT LUẬN

Những đám tế bào mô sẹo khử biệt hóa được hình thành qua nuôi cấy tTCL mảnh lá có nguồn gốc từ những tế bào biệt hóa nhu mô thịt lá.

Sự xuất hiện những mô mạch trong khối mô sẹo đã định hướng cho sự phát sinh chồi bất định khi chuyển những khối mô sẹo từ môi trường M1 sang môi trường M2.

STUDY ON MORPHOGENESIS OF BLACK PEPPER (*PIPER NIGRUM* L.) IN LEAF THIN CELL LAYER CULTURE

Do Dang Giap, Thai Xuan Du, Doan Thi Ai Thuyen
Institute of Tropical Biology HoChiMinh City

ABSTRACT: A histological study of callus regeneration of black pepper using leaf transverse thin cell layer (tTCL) explants was accomplished. The undifferentiated cells culture of callus were found to differentiate into vascular nodules called meristemoids, which then develop into xylem elements, especially tracheids. Culturing in the shooting medium, these nodules differentiated into shoot apical meristem.

Từ khóa: Thin Cell Layer, Hồ tiêu, *Piper nigrum* L., Morphogenesis

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [10]. Đoàn Thị Ái Thuyền, Thái Xuân Du, Đỗ Đăng Giáp, Nguyễn Tăng Tôn (2005). *Bước đầu nghiên cứu nhân giống in vitro một số giống Hồ tiêu (Piper nigrum L.) sạch virút.* Tạp chí Sinh học. 27(3), tr. 39-45.
- [11]. Kanta K (1962) Morphology and embryology of *Piper nigrum* L. *Phytomorphology* 12: 207-211.
- [12]. Mathews VH & Rao PS (1984) *In vitro* responses of black pepper (*Piper nigrum*). *Cnrr. Sci.* 20:183-185.
- [13]. Murashige T, Skoog F (1962). *Arevised medium for a rapid growth and biossay with tobacco tissue culture.* *Physiology Plants.* 15. 473-497.
- [14]. Philip V J, Joseph D, Triggs GS & Dickinson NM (1992) Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* L.) through shoot tip cultures. *Plant Cell Rep.* 12:41-44.
- [15]. Biju Joseph, Dominic Joseph & V.J. Philip (1996) Plant regeneration from somatic embryos in black pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 87-90.
- [16]. R. Sujatha, Luckin C. Babu and P. A. Nazeem (2003) Histology of organogenesis from callus cultures of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Tropical Agriculture* 41 (2003): 16-19.