

VAI TRÒ CỦA AUXIN TRONG SỰ HÌNH THÀNH PHÔI THỂ HỆ LÚA (*Oryza sativa* L.)

Cao Minh Phương, Phan Ngô Hoang và Bùi Trang Việt

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 15 tháng 10 năm 2002, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 03 tháng 12 năm 2002)

TÓM TẮT: Hạt lúa trưởng thành *Oryza sativa* L. cv. VND 95-20 được dùng làm vật liệu. Mô sẹo được tạo trên môi trường MS chứa 2,4-D 2mg/l, NAA 1mg/l và BA 0,5mg/l. Mô sẹo sau đó được chuyển sang môi trường MS không hormon cho sự sinh phôi thể hệ. Sự di chuyển hữu cực của auxin có vai trò điều hòa quan trọng sự sinh phôi thể hệ. Để nghiên cứu sự di chuyển của auxin, chúng tôi ước lượng auxin trong nửa trên và nửa dưới của mô sẹo. Các phương pháp sắc ký trên giấy, sinh trắc nghiệm diệp tiêu *Oryza*, và trắc nghiệm Salkowsky được dùng để chứng minh và cô lập auxin.

Từ khóa: auxin, di chuyển hữu cực, mô sẹo, *Oryza sativa*, sinh phôi thể hệ.

MỞ ĐẦU

Trong các bài báo trước, chúng tôi đã trình bày kết quả về sự tạo mô sẹo từ hạt lúa trưởng thành và thu nhận phôi thể hệ từ mô sẹo, sự tạo dịch treo tế bào từ mô sẹo và thu nhận phôi thể hệ từ dịch treo tế bào (Trần Thị Bích Trinh và csv. 2000, Đoàn Thị Phương Thùy và csv. 2002). Trong bài này, chúng tôi tìm hiểu sâu hơn về hoạt động của auxin trong quá trình sinh phôi thể hệ lúa từ mô sẹo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mô sẹo 2 tuần tuổi được tạo từ hạt lúa VND 95-20 trên môi trường: MS với 2,4-D 2mg/l, NAA 1mg/l và BA 0,5mg/l.

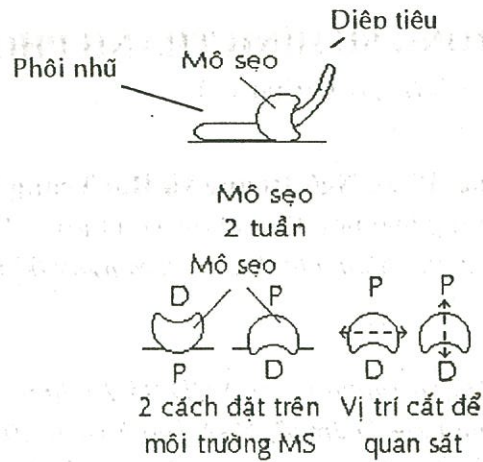
Phương pháp

Sự thu nhận phôi thể hệ

Mô sẹo 2 tuần tuổi được đặt trên môi trường MS (Murashige and Skoog 1962), không có chất điều hòa tăng trưởng thực vật hoặc theo chiều diệp tiêu – phôi nhũ (D → P), hoặc theo chiều phôi nhũ – diệp tiêu (P → D) (hình 1). Sự nuôi cấy được thực hiện ở điều kiện: nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng $2500 \pm 500\text{lux}$ (12 giờ/ngày) và ẩm độ: 72%.

Quan sát hình thái giải phẫu

Thực hiện các lát cắt ngang và dọc qua khối sẹo, theo thời gian kể từ khi chuyển khối sẹo sang môi trường MS (theo hướng P → D) (hình 1). Các lát cắt được nhuộm 2 màu (đỏ carmin và xanh iode) và quan sát dưới kính hiển vi.



Hình 1: Các kiểu đặt mô sẹo trên môi trường MS và các kiểu cắt ngang và dọc qua mô sẹo để quan sát.

Đo hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được ly trích và phân đoạn bằng phương pháp sắc ký trên giấy Whatman số 1 (12x24cm), dung môi di chuyển isopropanol:amoniac:nước theo tỉ lệ thể tích 10:1:1. Hoạt tính auxin và acid abscisic được xác định nhờ sinh trắc nghiệm khúc cắt diệp tiêu, cytokinin nhờ sinh trắc nghiệm tử diệp dưa chuột và giberelin nhờ sinh trắc nghiệm trụ hạ diệp xà lách (Bùi Trang Việt 1992).

Xác định vị trí của 2,4-D, NAA và IAA trên giấy sắc ký

10ml dung dịch 2,4-D 0,2mg/l hoặc NAA 2mg/l (dựa theo thí nghiệm sơ khởi) được trích và cô lập trên giấy sắc ký theo phương pháp ly trích chất điều hòa tăng trưởng thực vật. Vị trí của NAA và 2,4-D trên giấy sắc ký được nhận biết bằng sinh trắc nghiệm khúc cắt diệp tiêu. Riêng IAA, dùng 1ml IAA 50mg/l chấm trực tiếp lên giấy sắc ký, vị trí IAA trên giấy sắc ký được nhận biết bằng trắc nghiệm hóa học với thuốc thử Salkowsky, IAA cho màu hồng với thuốc thử (Machlis and Torrey 1956).

Cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của khối mô sẹo được đo bằng máy Warburg, dựa trên sự hấp thu O_2 bởi mô thực vật, và được tính bằng $\mu l O_2/gTLT/giờ$.

KẾT QUẢ

Sự thu nhận phôi thể hệ

Sự thu nhận phôi chỉ xảy ra ở cách đặt P → D. Với cách đặt này, mô sẹo hóa xanh sau 2 tuần nuôi cấy và cho cây con sau 4 tuần (ảnh 1). Ở cách đặt D → P, khối sẹo bắt đầu hóa đen từ phần tiếp xúc với môi trường ở tuần 2; sự hóa đen hoàn toàn ở tuần 4. Vì lý do này, tất cả các kết quả được trình bày dưới đây đều từ sự nuôi cấy theo cách đặt P → D.

Quan sát hình thái giải phẫu

Khi cắt dọc qua mô sẹo 2 tuần tuổi (ngay trước khi đặt mô sẹo trên môi trường MS, để tạo phôi thể hệ) (ảnh 3), ta dễ dàng phân biệt lần lượt các vùng sau: vùng tiếp xúc với diệp tiêu hóa đen; vùng tế bào kéo dài với hệ thống mạch đã xuất hiện theo hướng D→P; vùng tế bào đậm đặc, đẳng kính; và vùng tiếp xúc với phôi nhũ với các tế bào dài, sinh sản mạnh một cách không trật tự (vùng này hướng lên trên khi đặt mô sẹo trên môi trường MS).

Ở các lát cắt ngang hay dọc qua khối sẹo, các vết hệ thống mạch đã xuất hiện ngay từ ngày 0 (ảnh 2 và 3). Hệ thống mạch ngày càng rõ theo thời gian (ảnh 4). Phôi hình cầu

xuất hiện ở ngày 5 (ảnh 5), phôi hình chùy ở ngày 7 (ảnh 6), dẫn tới sự hình thành cây con ở tuần thứ 4 (ảnh 1).

Vị trí của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Sinh trắc nghiệm khúc cắt điệp tiêu chứng minh NAA hiện diện ở Rf 0,5 – 0,7, trong khi 2,4-D hiện diện ở Rf 0,7 – 0,9 (bảng 1). Với thuốc thử Salkowsky, IAA hiện diện ở Rf 0,4 – 0,5.

Bảng 1: Kết quả sự tăng dài điệp tiêu lúa với 2,4-D 0,2mg/l hay NAA 2mg/l.

Rf	Chiều dài điệp tiêu lúa (mm)	
	NAA 2 mg/l	2,4-D 0,2 mg/l
0,0 – 0,1	2,40 ± 0,10	2,33 ± 0,07
0,1 – 0,2	2,41 ± 0,11	2,41 ± 0,11
0,2 – 0,3	2,44 ± 0,10	2,35 ± 0,05
0,3 – 0,4	2,34 ± 0,12	2,39 ± 0,12
0,4 – 0,5	2,29 ± 0,12	2,35 ± 0,15
0,5 – 0,6	2,46 ± 0,07	2,26 ± 0,08
0,6 – 0,7	2,47 ± 0,07	2,36 ± 0,10
0,7 – 0,8	2,40 ± 0,10	2,66 ± 0,20
0,8 – 0,9	2,38 ± 0,16	2,58 ± 0,12
0,9 – 1,0	2,36 ± 0,15	2,27 ± 0,06

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự tạo phôi

Hoạt tính tổng cộng của auxin trong mô giảm dần theo thời gian, trong khi hoạt tính cytokinin tăng. Acid abscisic chỉ xuất hiện ở ngày 7, gibberelin không được phát hiện trong khoảng thời gian khảo sát (bảng 2).

Bảng 2: Hàm lượng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong mô sẹo theo thời gian trên môi trường MS.

Thời gian (ngày)	Hoạt tính ($\mu\text{g/gTLT}$)			
	Auxin	Cytokinin	Giberelin	Acid abscisic
0	28,4 ± 1,8	4,3 ± 0,8	-	-
3	27,5 ± 2,5	4,7 ± 0,5	-	-
5	24,7 ± 4,6	5,6 ± 0,4	-	-
7	20,4 ± 3,0	7,8 ± 0,8	-	8,4 ± 0,7

(-), không được phát hiện

Hoạt tính auxin ở nửa trên khối sẹo (phần D) thấp hơn nửa dưới (phần P) và giảm dần theo thời gian. Trong khi đó, hoạt tính của cytokinin ở phần D cao hơn ở phần P và tăng dần theo thời gian. Acid abscisic chỉ xuất hiện ở phần D sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường MS. Gibberelin không xuất hiện trong khoảng thời gian 0-7 ngày nuôi cấy (bảng 3).

Bảng 3: Sự thay đổi hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật ở phần D và P của khối sẹo theo thời gian.

Thời gian (ngày)	Phần mô sẹo	Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật ($\mu\text{g/gTLT}$.)			
		Auxin	Cytokinin	Giberelin	A. abscisic
0	P	$21 \pm 2,4$	$5,8 \pm 0,6$	-	-
	D	$32 \pm 2,0$	$3,2 \pm 0,5$	-	-
3	P	$20 \pm 2,5$	$5,4 \pm 0,9$	-	-
	D	$28 \pm 1,7$	$4,4 \pm 0,8$	-	-
5	P	$17 \pm 3,0$	$5,8 \pm 0,4$	-	-
	D	$25 \pm 2,0$	$4,3 \pm 0,5$	-	-
7	P	$16 \pm 2,8$	$9,1 \pm 0,9$	-	$7,3 \pm 0,8$
	D	$24 \pm 3,2$	$7,2 \pm 0,7$	-	-

Nếu dùng sinh trắc nghiệm khúc cắt điệp tiêu để đo hoạt tính auxin của chất trích từ mô, ở các vị trí trên giấy sắc ký tương ứng với IAA (Rf 0,4 – 0,5), NAA (Rf 0,5 – 0,7) và 2,4-D (Rf 0,7 – 0,9), kết quả cho thấy: IAA tăng dần từ ngày 0 đến ngày 5 và giảm mạnh từ ngày 5 đến ngày 7, trong khi NAA khá bền trong thời gian khảo sát và 2,4-D hầu như không đổi từ ngày 0 đến ngày 5 nhưng giảm từ ngày 5 đến ngày 7 (bảng 4).

Bảng 4: Sự thay đổi hoạt tính của IAA (Rf 0,4-0,5), NAA (Rf 0,5-0,7) và 2,4-D (Rf 0,7-0,9) trong mô sẹo theo thời gian.

Thời gian (ngày)	Hoạt tính ($\mu\text{g/gTLT}$.)		
	IAA	NAA	2,4-D
	$4,30 \pm 0,11$	$8,17 \pm 0,22$	$5,16 \pm 0,24$
3	$5,38 \pm 0,26$	$8,60 \pm 0,22$	$6,02 \pm 0,30$
5	$6,24 \pm 0,26$	$6,88 \pm 0,24$	$6,45 \pm 0,30$
7	$3,87 \pm 0,30$	$8,60 \pm 0,13$	$3,87 \pm 0,19$

Cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của mô sẹo giảm dần theo thời gian từ khi mô sẹo được đặt trên môi trường MS (bảng 5).

Bảng 5: Cường độ hô hấp của khối mô sẹo trên môi trường MS theo thời gian nuôi cấy.

Thời gian (ngày)	Cường độ hô hấp ($\mu\text{O}_2/\text{gTLT}/\text{giờ}$)
0	$35,9 \pm 1,7$
3	$30,2 \pm 2,2$
5	$18,1 \pm 1,5$
7	$14,5 \pm 2,1$

THẢO LUẬN

Sự xuất hiện sớm của hệ thống mạch trong khối mô sẹo, ngay từ trước khi đặt mô sẹo trên môi trường MS (để tạo phôi thể hệ), cho thấy mô sẹo 2 tuần tuổi được dùng trong thí nghiệm là khối mô không đồng nhất. Có lẽ sự hình thành hệ thống mạch này do auxin (từ diệp tiêu) di chuyển hướng gốc quyết định, không phải do sự khuếch tán của các auxin nhân tạo (NAA và 2,4-D) từ môi trường đi lên. Sự di chuyển hữu cực hướng gốc của auxin trong các chồi xảy ra ở tốc độ khoảng 6mm/giây (Estelle 1998). Hệ thống mạch này có lẽ xuất hiện từ các tế bào sống ở vùng tiếp xúc với diệp tiêu trước khi có sự hóa đen.

Trên môi trường MS, phôi xuất hiện theo cách đặt P→D, có lẽ từ vùng tế bào có tế bào chất đậm đặc (có đặc tính sinh phôi), bên dưới các tế bào kéo dài (không có đặc tính sinh phôi). Phôi không thể xuất hiện theo cách đặt D → P, vì trong trường hợp này, vùng tế bào hóa đen hướng lên trên, và phôi không thể hình thành từ mặt tiếp xúc với môi trường (không đủ oxygen). Bình thường, khi phôi xuất hiện, tính hữu cực mới sẽ xuất hiện.

Tương tự như kết quả của Trần Thị Bích Trinh và cs. (2000) ở dòng lúa Bằng Ngọc, auxin trong khối sẹo giảm dần, trong khi cytokinin tăng dần theo thời gian cho tới ngày thứ 7, khi xuất hiện phôi hình chùy (bảng 2). Sự giảm hàm lượng auxin có lẽ là nguyên nhân chính của sự giảm cường độ hô hấp (bảng 5), và thường được nghĩ là do sự giảm hay loại auxin trong môi trường nuôi cấy (Aloowalia 1991, Komamine *et al.* 1992).

Trên môi trường MS, auxin của nửa trên khối sẹo (phần P) thấp hơn, trong khi cytokinin cao hơn, do đó tỉ lệ auxin/cytokinin thấp hơn, so với nửa dưới (phần D). Cùng với đặc tính hình thái của mô sẹo (mặt P không có vùng tế bào hóa đen), sự khác biệt về hàm lượng của auxin và cytokinin như thế góp phần làm dễ dàng cho sự tạo phôi từ mặt trên khối sẹo.

Nếu gibberelin không được phát hiện cho tới ngày 7, thì acid abscisic xuất hiện rõ ràng ở ngày này từ nửa trên (bảng 2 và 3). Trong những năm gần đây, người ta tin rằng nếu gibberelin cần thiết trong giai đoạn nảy mầm của hạt, thì acid abscisic cần thiết trong sự phát triển phôi, đặc biệt trong giai đoạn trưởng thành và tích lũy chất khô (Bùi Trang Việt 2000).

Sự phân đoạn (trên giấy sắc ký) và phát hiện (trắc nghiệm sinh học hay hóa học) các chất điều hòa tăng trưởng thực vật: IAA (do thực vật tạo ra), 2,4-D và NAA (chất ngoại sinh được cho vào môi trường tạo mô sẹo) cho thấy: 2,4-D và NAA khá bền trong mô thực vật, trong khi IAA dường như gia tăng liên tục cho tới ngày 5 (khi phôi hình cầu xuất hiện), và sau đó mới giảm từ ngày 7. Như vậy, phải chăng ở dòng lúa VND95-20, giai đoạn từ tế bào thể hệ tới phôi hình cầu không cần sự giảm auxin (IAA và các chất ngoại sinh)? Phải chăng sự giảm từ ngày 7 là do sự di chuyển hữu cực của auxin đã được thiết lập? Và phải chăng sự di chuyển hữu cực của auxin cần thiết cho sự hình thành cơ quan phôi (từ ngay sau giai đoạn phôi hình cầu)? Theo Cohen (1993), sự thay đổi hàm lượng IAA trong mô dường như liên quan tới tình trạng phát triển của mô thực vật hơn là sự hiện diện hay vắng mặt của 2,4-D.

Trong sự sinh phôi hợp tử cà rốt, nồng độ IAA tự do từ mức căn bản (25ng/g trọng lượng tươi) trong tế bào trứng chưa thụ tinh tăng lên 80 lần (2.000ng/g trọng lượng tươi) vào cuối giai đoạn phôi hình cầu muộn và đầu giai đoạn phôi hình trái tim, nhưng sau đó trở lại mức căn bản ở giai đoạn phôi hình cá đuối. Sự gia tăng ban đầu về nồng độ IAA như vậy được chứng minh do sự tổng hợp IAA theo con đường qua tryptophan, nhưng sự duy trì mức căn bản không theo con đường này. Các tác giả này cho rằng, sự thay đổi có kiểm soát các

con đường sinh tổng hợp IAA là có vai trò quyết định trong sự điều hòa quá trình sinh phôi hợp tử ở cà rốt (Bhojwani and Bhatnagar 1999, Ribnicky *et al.* 2000).

KẾT LUẬN

1. Có sự giảm auxin tổng cộng theo thời gian trong mô sẹo trong quá trình sinh phôi trên môi trường không có auxin.

2. NAA và 2,4-D khá bền trong mô sẹo trên môi trường MS.

3. IAA trong mô sẹo gia tăng từ giai đoạn tế bào thể hệ cho tới giai đoạn phôi hình cầu, và sau đó giảm trong quá trình tạo cơ quan phôi.

Trong tương lai, chúng tôi tiếp tục tìm hiểu vai trò của sự giảm hàm lượng auxin nội sinh (IAA) và sự di chuyển hữu cực của auxin trong quá trình sinh phôi thể hệ.

ROLES OF AUXINS ON SOMATIC EMBRYOGENESIS IN RICE (*Oryza sativa* L.)

Cao Minh Phuong, Phan Ngo Hoang and Bui Trang Viet
Faculty of Biology, University of Natural Sciences –VNU-HCM

ABSTRACT: Mature seeds of a cultivar of rice (*Oryza sativa* L. cv. VND 95-20) were used as plant material. The callus was initiated on the MS medium containing 2 mg/ml 2,4-D, 1 mg/ml NAA, and 0,5 mg/ml BA. The callus obtained was moved to a hormone-free MS medium for somatic embryogenesis. Polar IAA transport plays a significant role in the regulation of somatic embryogenesis. To study IAA transport, we estimated the amount of auxins in the lower and upper halves of the callus. Paper chromatography, *Oryza* coleoptile assay, and Salkowsky test were used for the identification and isolation of auxins.

Keywords: auxin, polar transport, callus, *Oryza sativa*, somatic embryogenesis.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ahloowalia B.S., 1991. Somatic embryos in monocots. Their genesis and genetic stability. *Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot.* 14: 223-235.
- [2] Bhojwani S.S. và Bhatnagar S.P. 1999. *The embryology of Angiosperms.* Vikas Publishing House.
- [3] Bùi Trang Việt 1992. Tìm hiểu và áp dụng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật để kiểm soát hiện tượng rụng " bông" và "trái non" tiêu (*Piper nigrum* L.). Luận văn Phó Tiến sĩ Khoa học, chuyên ngành Sinh lý thực vật, Trường ĐH. Tổng hợp TP.Hồ Chí Minh.
- [4] Bùi Trang Việt 2000. Sinh lý thực vật đại cương. Phần II: Phát triển. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- [5] Cohen J.D., Slovin J.P, Ribnicky D.M, Auer C.A., Kuleck G.K, Tam Y.Y and Cooke T.J. 1993. Hormon metabolism in relation to regeneration of plant from culture. Congress

- on cell and tissue culture. California (Abstract). *In vitro* animal & cellular developmental biology, 29(3), p.38A.
- [6] Estelle M. 1998. Polar auxin transport: new support for an old model. *Plant Cell*, 10: 1775-1778.
- [7] 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.* 28: 11 – 14.
- [8] Machlis L. and Torrey J.G. 1956. *Colorimetric Test for Indolacetic Acid*. Plants in action. Laboratory Manual Plant Physiology. 159pp.
- [9] Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497
- [10] Đoàn Thị Phương Thùy, Phan Ngô Hoàng và Bùi Trang Việt 2002. Thu nhận phôi thể hệ từ dịch treo tế bào lúa (*Oryza sativa* L.) dòng Bằng ngọc. Tạp chí Phát triển Khoa học Công nghệ, 5: 17-24.
- [11] Ribnicky D., Cohen J., Hu W.S., Todd J. and Cooke T.J. 2000. An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta* 214: 505-509.
- [12] Trần Thị Bích Trinh, Phan Ngô Hoàng và Bùi Trang Việt 2000. Nuôi cấy tế bào lúa (*Oryza sativa* L.) dòng Bằng ngọc. Tạp chí Phát triển Khoa học Công nghệ, 3: 92-97.
- Đề tài hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí nghiên cứu khoa học của Bộ Giáo dục và Đào tạo, năm 2001.

Ảnh 1: Cây tái sinh từ mô sẹo sau 4 tuần trên môi trường MS. (Thanh ngang: 0,25cm)

Ảnh 2: Hệ thống mạch của mô sẹo (cắt ngang), ở ngày 0, trên môi trường MS. (Thanh ngang: 100 μ m)

Ảnh 3: Hệ thống mạch của mô sẹo (cắt dọc), ở ngày 0, trên môi trường MS. (Thanh ngang: 100 μ m)

Ảnh 4: Hệ thống mạch của mô sẹo (cắt dọc), ở ngày 3, trên môi trường MS. (Thanh ngang: 100 μ m)

Ảnh 5: Phôi hình cầu ở ngày 5, trên môi trường MS. (Thanh ngang: 100 μ m)

Ảnh 6: Phôi hình chùy ở ngày 7, trên môi trường MS. (Thanh ngang: 100 μ m)

