

SỰ THÀNH LẬP PHÔI VÀ SỰ TẠO MÔ SẸO TỪ PHÔI NON Ở CHUỐI HỘT *MUSA BALBISIANA*.

Cung Hoàng Phi Phượng - Bùi Trang Việt

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

(Bài nhận ngày 21/02/2000)

TÓM TẮT: Vai trò của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật auxin, cytokinin, giberelin và acid abscisic trong sự phát triển phôi *Musa balbisiana* (BB) được nghiên cứu. Mô sẹo được tạo từ phôi hợp tử non, bằng cách dùng môi trường MS với một auxin mạnh, picloram (acid 4-amino 3,5,6-trichloropicolinic) 2mg/l. Nguồn gốc của các tế bào sinh phôi và các giai đoạn sớm của sự phát triển mô sẹo được mô tả. Các đặc tính sinh lý quan trọng (hô hấp, hoạt tính hormon thực vật) liên quan tới sự thành lập mô sẹo được thảo luận.

MỞ ĐẦU

Cây chuối *Musa* sp. có nguồn gốc từ các vùng Đông Nam Châu Á. Hai loài lưỡng bội hoang dại *M. acuminata* (AA) và *M. balbisiana* (BB) được chứng minh là nguồn gốc của mọi giống chuối trồng (Simmonds, 1976). Đây là nguồn gen quý giá đối với các nhà nghiên cứu nhằm tìm kiếm, lai tạo (bằng các phương pháp truyền thống và hiện đại) và tuyển chọn các giống kháng hay chống chịu bệnh, đặc biệt là bệnh do nấm (Haicour *et al.*, 1998).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu quá trình thành lập phôi sớm trong hột, đặc biệt tìm hiểu vai trò của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, và sau đó tìm hiểu khả năng tạo mô sẹo từ phôi hợp tử chưa trưởng thành của *M. balbisiana*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thực vật

Các hột Chuối được lấy từ trái có tuổi 30, 50 và 70 ngày sau sự nở hoa cái (được xem như ngày thụ tinh của hoa).

Tính sống của phôi được kiểm tra bằng thuốc thử 2,3,5-triphenyl tetrazolium clorid (TTC), qua sự thiết lập formazan có màu đỏ bền (Wanatabe và csv, 1992).

Sự thay đổi hình thái tế bào trong quá trình tạo mô sẹo được theo dõi dưới kính hiển vi, sau sự nhuộm các lát cắt qua phôi chưa trưởng thành (trước sự nuôi cấy) hay qua mô sẹo phát sinh từ phôi non sau 50 ngày nuôi cấy trên môi trường có picloram, với thuốc nhuộm Schiff-hematoxylin.

Cường độ hô hấp của mô cấy có chứa phôi 30, 50 và 70 ngày tuổi được đo trên máy Warburg, dựa vào sự hấp thu oxygen của mô thực vật. 20 mô cấy (tương ứng với khoảng 1gam vật liệu tươi) được đo ở điều kiện nhiệt độ 25-26°C, trong tối, trong 1 giờ, để tính μLO_2 được hấp thu bởi 1gam trọng lượng tươi trong 1 giờ.

Đo hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh auxin, gibberelin, cytokinin và acid abscisic (dạng tự do) có trong vùng mô có chứa phôi được ly trích, cô lập và đo hoạt tính bằng sinh trắc nghiệm: diệp tiêu lúa *Oryza sativa* cho auxin và acid abscisic, lá mầm dưa chuột cho cytokinin, trụ hạ diệp dưa chuột cho gibberelin (Bùi Trang Việt, 1989).

Tạo mô sẹo

Các trái non trước tiên được khử trùng bằng cách nhúng trong cồn 95° (3 phút) và đốt lớp phía ngoài trái. Sau đó cắt đôi trái chuối và tách các hạt non trong điều kiện vô trùng. Mô cấy có kích thước 2mm × 2mm chứa phôi chưa trưởng thành ở giữa được đặt trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962), với sacaroz 60mg/l, KH₂PO₄ 200mg/l và picloram 2mg/l. Mô cấy được đặt theo cách để phôi chưa trưởng thành tiếp xúc với môi trường nuôi cấy. Sự nuôi cấy được thực hiện trong tối, ở nhiệt độ 27±1°C, độ ẩm 74%.

KẾT QUẢ

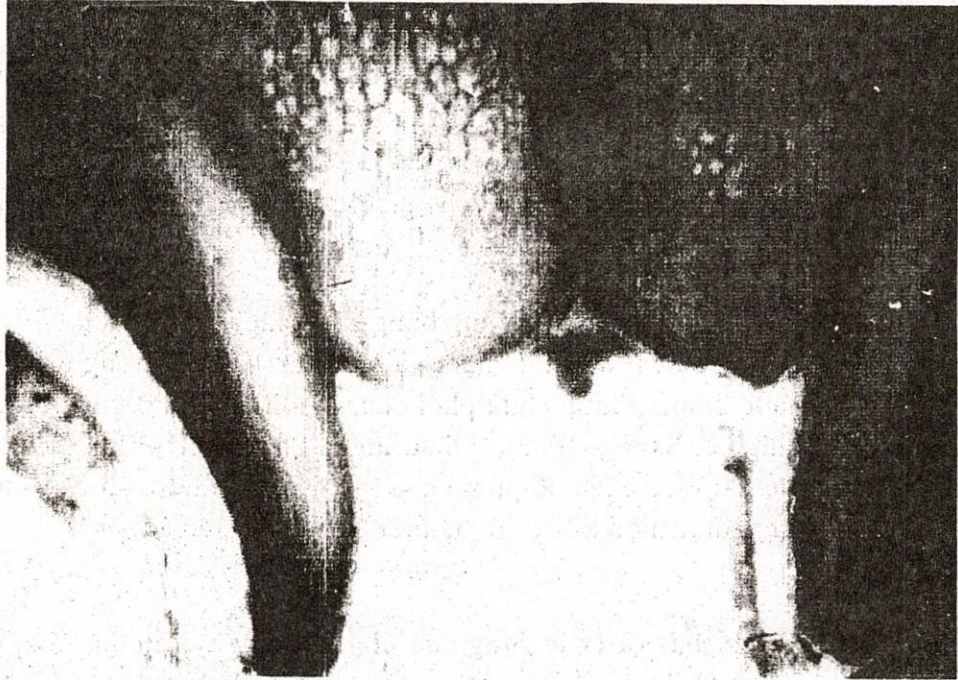
Sự biến đổi hình thái và tỷ lệ sống của phôi ở 30 ngày sau thụ tinh, phôi hình cầu, có kích thước 40-60µm (ảnh 1). Ở ngày thứ 50, phôi đạt kích thước 210µm với sự phân chia 2 vùng bắt màu đậm với hematoxylin: vùng cực chồi và rễ vùng tử diệp (ảnh 2). Sau đó phôi tiếp tục gia tăng kích thước cho tới tối đa 750µm ở ngày 70.

Phôi 50 ngày tuổi sau 15 ngày nuôi cấy trên môi trường MS (không có chất điều hòa tăng trưởng thực vật) có khả năng phát triển bình thường và đạt tới giai đoạn phôi. Ở 60 ngày tuổi trong thiên nhiên (dạng núi lửa). Ở giai đoạn này, vùng tử diệp, sinh mô ngọn chồi và rễ, và phát thể lá được thấy rõ dưới kính hiển vi (hình 1).

Cường độ hô hấp của mô cấy có chứa phôi tăng nhanh theo sự phân hóa phôi từ giai đoạn phôi 30 ngày tuổi (phôi hình cầu) cho tới giai đoạn phôi 50 ngày tuổi (bắt đầu sự phân vùng) và giữ ở mức độ này cho tới 70 ngày tuổi (bảng 2).

Bảng 2: Cường độ hô hấp của mô cấy có chứa phôi chưa trưởng thành.

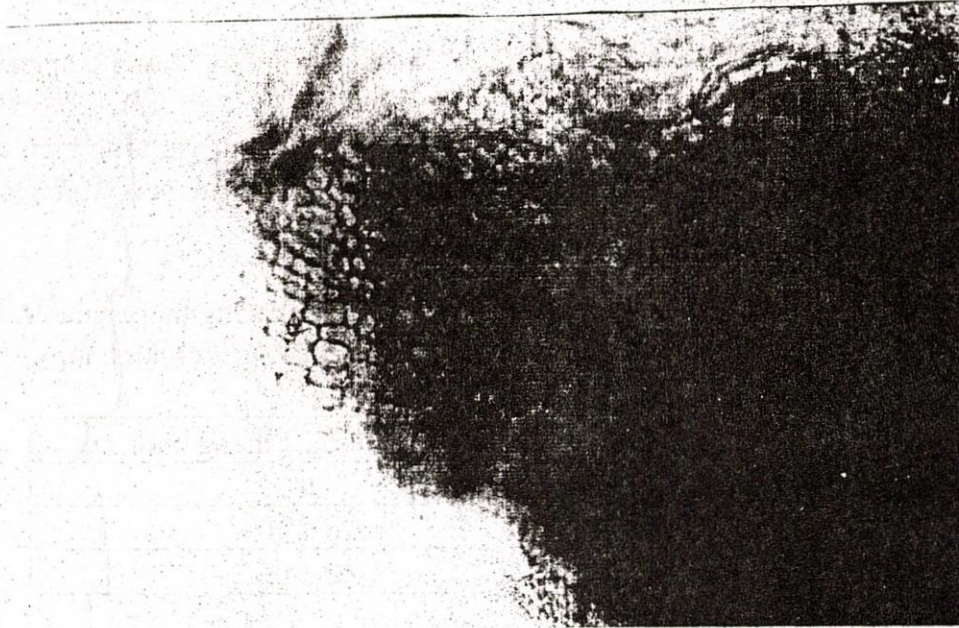
Tuổi phôi trong mô cấy (ngày)	Cường độ hô hấp (µlO ₂ /g TLT/giờ)
30	7,29 ± 0,06
50	10,40 ± 0,56
70	11,94 ± 0,10



Ảnh 1: Phôi ở 30 ngày tuổi. Thanh ngang: 120 μ m.



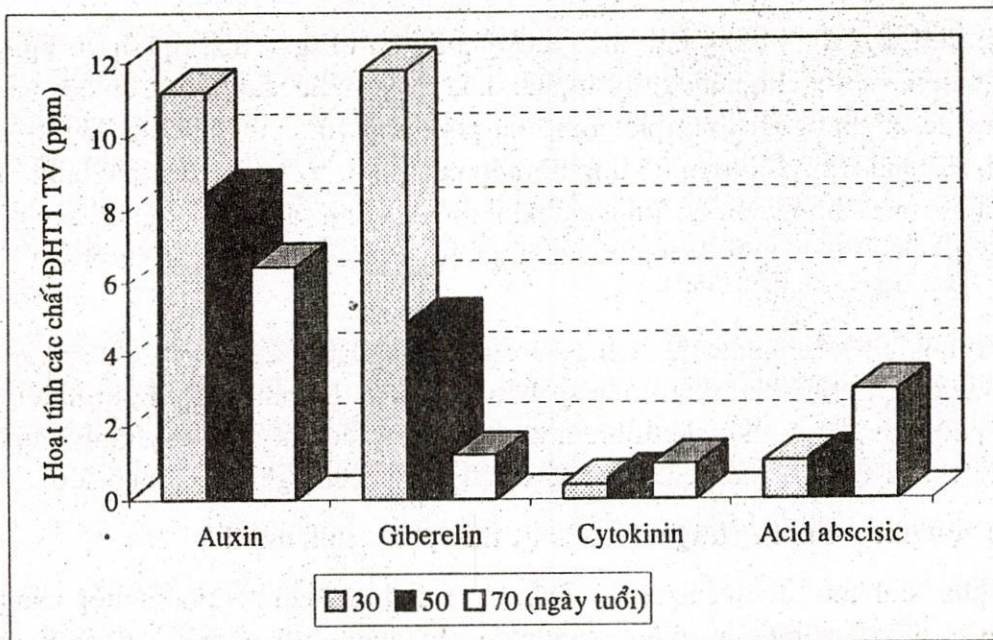
Ảnh 2: Phôi 50 ngày tuổi với các vùng mô phân chia: chồi và rễ (vùng bắt màu đậm phía trên) và vùng tử diệp (vùng bắt màu đậm phía dưới). Thanh ngang: 120 μ m.



Ảnh 3: Vùng tử diệp của phôi 50 ngày tuổi phân chia mạnh để hình thành mô sẹo trên môi trường có picloram 2mg/l, sau 45 ngày nuôi cấy. Thanh ngang: 120µm.

Hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong khúc cắt có chứa phôi

Trong khoảng thời gian từ 30 tới 70 ngày tuổi, nếu hoạt tính auxin và giberelin giảm mạnh (khoảng 2 lần đối với auxin và khoảng 6 lần đối với giberelin), thì hoạt tính cytokinin và acid abscisic lại gia tăng (khoảng 3 lần đối với cytokinin cũng như acid abscisic) (Hình 1).



Hình 1: Hoạt tính của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong khúc cắt có chứa phôi chưa trưởng thành.

Khả năng tạo mô sẹo của phôi chưa trưởng thành

Trong môi trường có picloram 2mg/l, khả năng tạo mô sẹo của phôi chưa trưởng thành, sau một tháng nuôi cấy, thay đổi mạnh theo tuổi phôi (bảng 4). Phôi ở 50 ngày tuổi

có khả năng tạo mô sẹo cao nhất ($25 \pm 10\%$). Trong môi trường không có picloram, phôi ở các tuổi khác nhau gia tăng nhẹ kích thước, hoàn toàn không có sự tạo mô sẹo, và hóa đen sau một tháng nuôi cấy. Cũng vậy, các phôi 30 ngày tuổi gia tăng kích thước dưới ảnh hưởng của picloram 2mg/l, nhưng không có khả năng cho mô sẹo (không có sự phân chia hỗn loạn tế bào) và hóa đen sau một tháng nuôi cấy.

Bảng 4: Khả năng tạo mô sẹo của phôi hợp tử chưa trưởng thành của *M. balbisiana* (BB) dưới ảnh hưởng của picloram 2mg/l (quan sát sau 1 tháng dưới kính lúp).

Tuổi phôi (ngày)	% tạo mô sẹo sau 1 tháng nuôi cấy
30	0
50	25 ± 10
70	10 ± 06

THẢO LUẬN

Sự phát triển phôi trong thiên nhiên và vai trò của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh trong sự tạo mô sẹo *in-vitro*

Ở Chuối Hột, hàm lượng auxin cao ở giai đoạn phôi 30 ngày tuổi, khi phôi ở giai đoạn hình cầu, giảm ở 50 ngày (bắt đầu sự phân vùng) và 70 ngày tuổi. Điều này phù hợp với ghi nhận của Michalczuk và csv (1992): Trong quá trình phát triển phôi, auxin nội sinh đạt đến hàm lượng cao ở giai đoạn trước giai đoạn hình cầu, nhưng sẽ giảm từ từ khi phôi trải qua sự phân cực và phát triển sau đó. Ngược lại, để tạo mô sẹo, ở chuối hay các đối tượng khác, cần áp dụng auxin ngoại sinh (2,4-D; picloram) cho phôi.

Hoạt tính cytokinin tăng dần theo tuổi phôi (cho tới giai đoạn phôi 70 ngày tuổi). Trong tự nhiên, sự gia tăng này giúp sự phân hóa chồi mầm của phôi. Còn đối với sự tạo mô sẹo, có lẽ auxin ngoại sinh (picloram) đã phối hợp với cytokinin nội sinh trong việc kích thích sự phân chia rối loạn ở vùng tử diệp của phôi. Vì lý do này, picloram được sử dụng riêng rẽ mà không cần bổ sung cytokinin ngoại sinh, để cảm ứng sự tạo mô sẹo ở vùng tử diệp của phôi chuối. Vùng này tương ứng với mống dừa trong sự phát triển phôi dừa (Mai Trần Ngọc Tiếng, 1983).

Hoạt tính giberelin giảm dần cùng với sự gia tăng hàm lượng ABA phù hợp với sinh lý bình thường của hột chuối dẫn đến sự hưu miên của hột chuối trong tự nhiên hay sự trụy của phôi non, do đó hột chuối hiếm khi nảy mầm để cho một cây bình thường. Vai trò của giberelin và acid abscisic ít được đề cập trong các thí nghiệm tạo mô sẹo.

Mô sẹo phát sinh từ vùng mô có hoạt tính phân chia mạnh

Sự phát sinh mô sẹo từ các tế bào biểu bì và dưới biểu bì ở vùng tử diệp của phôi 50 ngày tuổi có thể do vùng này có hoạt tính phân chia mạnh trong phôi non và do được đặt tiếp xúc trực tiếp với môi trường. Điều này phù hợp với quan sát của Hunault (1979) về nguồn gốc tạo mô sẹo do sự phản phân hóa của vài tế bào nhu mô đang phân chia. Mặt khác, theo Nozeran (1984), tiềm năng sinh phôi của một loài thực vật được xác định không chỉ bởi kiểu gen, mà còn ở trạng thái sinh lý của vật liệu nuôi cấy. Thật vậy, trong khảo cứu này, phôi phải đạt tới giai đoạn (50 ngày tuổi) mới có khả năng đáp ứng với picloram để cho mô sẹo.

Sự gia tăng cường độ hô hấp trong quá trình phát triển bình thường của phôi hợp tử trên cây mẹ đáp ứng nhu cầu năng lượng cho sự phân hóa phôi. Auxin ngoại sinh có vai trò quan trọng trong sự tạo mô sẹo (Ahloowalia, 1991). Hơn nữa, auxin ngoại sinh chỉ tác động trên một nhóm tế bào nhất định, thí dụ tế bào biểu bì hay dưới biểu bì của vùng tử diệp của phôi non.

KẾT LUẬN

1. Trong quá trình phát triển phôi chuối Hột (*M. balbisiana*) trong thiên nhiên, hàm lượng auxin ở giai đoạn phôi hình cầu giảm dần trong quá trình tạo cơ quan phôi; ngược lại, hàm lượng cytokinin tăng dần.

2. Phôi 50 ngày tuổi (bắt đầu sự phân vùng) có thể phát triển trên môi trường MS để đạt tới giai đoạn tạo phát thể chồi và rễ.

3. Pichloram (2mg/l) kích thích sự tạo mô sẹo từ các tế bào biểu bì và dưới biểu bì của tử diệp của phôi 50 ngày tuổi.

Trong tương lai, chúng tôi tiếp tục tìm hiểu thêm khả năng tạo mô sẹo ở vài loại mô cấy chuối, trước khi thực hiện quá trình sinh phôi thể hệ từ các mô sẹo thu nhận được.

DEVELOPMENT OF EMBRYOS AND CALLUS INITIATION FROM IMMATURE EMBRYOS OF *MUSA BALBISIANA*.

Cung Hoang Phi Phuong – Bui Trang Viet

ABSTRACT : The roles of the growth substances auxins, cytokinins, gibberellins and abscisic acid in the development of *Musa balbisiana* (BB) embryos were investigated. Callus was initiated from immature zygotic embryos, using MS medium supplemented with a strong auxin, picloram (acid 4-amino 3,5,6-trichloropicolinic) at 2mg/l. Origin of embryogenic cells, and the early stages of the callus development are described. The main physiological characteristics (respiration, plant hormone activity) of the explants containing immature zygotic embryos are discussed and related to the callus formation.

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] Bùi Trang Việt, 1992. Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng “bông” và “trái non” Tiêu *Piper nigrum* L. Tập san khoa học Trường Đại Học Tổng Hợp Thành Phố Hồ Chí Minh, 1992. Phần B: Khoa Học Tự Nhiên. Trang 155-165.

[3] Escalant J.V. and Teisson C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa accuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell Reports 7: 665-668.

[4] Haicour R., Bui Trang V., Dhed'a D., Assani A., Bakry F. Et Côte F. 1998. La sécurité alimentaire: Perspectives d'amélioration des bananiers par voie biotechnologiques. Cahiers Agricultures 7: 468-75.

[5] Haunault G. 1979. Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivés *in-vitro*. Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot. 2: 231-287.

[5] Haunault G. 1979. Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivés *in-vitro*. Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot. 2: 231-287.

[6] Mai Trần Ngọc Tiếng, Nguyễn Thị Ngọc Lang, Lê Học Lãnh Vân 1986. Nhân giống cây Dừa. Phần II: Gỡ hươu miên cho phôi Dừa *cocos nucifera*. Tập san khoa học trường Đại học Tổng Hợp Thành Phố Hồ Chí Minh, tháng 5, 1986. Trang 45-50.

[7] Michalczuk L., Cooke T. J. And Cohen J.D. 1992. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry 31, 1097-1103.

[8] Murashige T. and Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Ther. Appl. Genet., 80: 673-679.

[9] Nozeran R. 1984. Integration of organism development. In: Positional controls in plant development. Barlow P.W. and Carr D.J. eds. Cambridge University Press: 375-401.

[10] Simmonds N.W. 1976. Evolution of Crop Plants. Longman Scientific and Technical (London) 339p.

[11] Wanatabe M., Wanatabe Y. and Shimada N. 1992. Colometric estimation of leaf-protoplast potential to divide by use of 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride J. Plant Physiol. 141: 111-114.