SỰ TẠO MÔ SẸO TỪ CHỒI VÀ LÁ KHOAI TÂY (Solanum tuberosum L.)

Lê Thị Thủy Tiên - Bùi Trang Việt
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên
(Bài nhận ngày 24/06/1999)

***TÓM TẮT** : Mô sẹo được tạo từ chồi ngủ và chồi nảy trên củ và lá Khoai tây (Solanum tuberosum L.). Các chồi ngủ và chồi nảy được đặt trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 0,4mg/l và BA 0,8mg/l, trong tối, ở 22^{0}C. Các lá tách rời từ các cây 3-4 tuần tuổi đặt trên môi trường MS với NAA 2mg/l, trong tối, ở 22^{0}C.*

Mục đích của bài báo này chứng minh sự hiện diện của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật : auxin, giberelin và cytokinin trong mẫu cấy và vai trò của chúng trogn sự thành lập mô sẹo từ những mô đã chuyên hóa. Kết quả cho thấy sự hiện diện của auxin phối hợp với cytokinin trong môi trường khởi phát và duy trì mô sẹo ở trạng thái không phân hóa và tăng trưởng chậm.

MỞ ĐẦU

Sự sinh phôi thể hệ thường được thực hiện qua hai giai đoạn: mô sẹo và dịch treo tế bào. Trong sự tạo mô sẹo, nói chung auxin có vai trò quyết định khi được áp dụng riêng rẻ hay phối hợp với citokinin (Bùi Trang Việt 1994, Pierik 1987). Khảo cứu nầy nhằm tìm hiểu khả năng tạo mô sẹo từ chồi trên củ và từ lá cây khoai tây, đặc biệt là vai trò của auxin, giberelin và citokinin đối với sự tạo mô sẹo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

VẬT LIỆU THỰC VẬT

Các mô cấy sau đây từ cây khoai tây *Solanum tuberosum* L. dòng $AVRDC_{1297.19}$ được sử dụng:

- Chồi ngủ và chồi nảy trên củ (từ cây trồng ngoài đồng): chồi ngủ là chồi ở các "mắt" được che chở bởi các lớp vảy hóa suber; chồi nảy là chồi đã nhô ra khỏi lớp vảy nầy, có chiều cao 5-7 mm với các lá nhỏ màu xanh.

- Các lá số 3 và số 4 (từ trên xuống) của cây khoai tây 3 - 4 tuần tuổi được trồng trong ống nghiệm trên môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962).

PHƯƠNG PHÁP

Sự tạo mô sẹo từ chồi ngủ và chồi nảy. Đối với chồi ngủ, những miếng mô củ (3 x 3 x 7 mm) có chứa chồi ngủ ở giữa được để dưới quạt hút 2 giờ, và ngâm trong dung dịch GA_3 tinh khiết 20 mg/l trong 5 phút (Desire, 1995). Mô cấy chứa chồi ngủ được khử trùng với rượu etilic 70% (1 phút) và dung dịch hypoclorid Ca 20% (10 phút). Chồi nảy có chiều cao 5-7 mm được cô lập và khử trùng.theo cách tương tự (trừ việc xử lý GA_3). Cả hai loại mô cấy sau đó được cấy trên môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) với sacaroz 20 g/l, 2,4-D 0,4 mg/l và BA 0,8 mg/l (theo Lam, 1975), trong tối, ở nhiệt độ 22 ± 2 °C, độ ẩm 61%. Sau 10 ngày nuôi cấy, % mẫu cấy có khả năng tạo mô sẹo được xác định.

Sự tạo mô sẹo từ lá được thực hiện bằng cách gây 5 vết thương trên gân chính của lá và đặt lá trên môi trường MS có bổ sung NAA 2mg/l và BA 0,5mg/l (mặt trên lá tiếp xúc với môi trường (Boxus *et al.* 1995; Nguyễn Đức Thành, 1983). Mẫu cấy được đặt trong tối, ở nhiệt độ 22 ± 2 °C, ẩm độ 61%.

Các biến đổi hình thái tế bào trong quá trình tạo mô sẹo được quan sát dưới kính hiển vi, sau sự nhuộm hai màu (đỏ carmin và xanh iod).

Cường độ hô hấp của mô thực vật được đo nhờ áp kế Warburg, để tính µl 0_2 hấp thu / g trong lượng tươi / giờ.

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được ly trích và phân đoạn nhờ phương pháp sắc ký trên giấy, sau đó xác định hoạt tính nhờ các sinh trắc nghiệm (Bùi Trang Việt, 1992).

KẾT QUẢ

Khả năng tạo mô sẹo từ chồi ngủ và chồi nảy ở củ

Sau 8-10 ngày nuôi cấy, mô sẹo xuất hiện với tỉ lệ cao ở chồi nảy so với chồi ngủ, trên môi trường có 2,4-D 0,4 mg/l và BA 0,8mg/l (bảng 1), không thấy trên môi trường MS không có chất điều hòa tăng trưởng thực vật. Mô sẹo hình thành do sự phân chia hỗn loạn của các tế bào vùng vỏ thân, các tế bào nhu mô ở

vị trí của vết cắt và các tế bào ở dưới lớp biểu bì của củ. Chồi nảy có cường độ hô hấp cao hơn nhiều so với chồi ngủ (hoạt động biến dưỡng cao hơn).

Bảng 1: Sự tạo mô sẹo của chồi ngủ và chồi nảy trên củ khoai tây (dòng $AVRDC_{1297.19}$) sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường có 2,4-D 0,4 mg/l và BA 0,8 mg/l.

Loại chồi	% mô cấy tạo sẹo	Hô hấp (µl 0_2 / g / giờ)
Chồi ngủ	41,35 ± 5,58	0,76 ± 0,02
Chồi nảy	58,82 ± 4,46	18,49 ± 0,40

Hoạt tính auxin, giberelin và citokinin của chồi ngủ và chồi nảy

Hoạt tính auxin, giberelin và citokinin trong mô cấy chứa chồi nảy luôn luôn cao so với mô cấy chứa chồi ngủ. Giberelin không được tìm thấy trong mô cấy chứa chồi ngủ nhưng rất cao trong chồi nảy đang tăng trưởng (bảng 2).

Bảng 2: Hoạt tính của auxin, citokinin và giberelin (dạng tự do) trong chồi ngủ và chồi nảy khoai tây (dòng $AVRDC_{1297.19}$).

Loại chồi	Auxin (mg/l)	Giberelin (mg/l)	Cytokinin (mg/l)
Chồi ngủ	0,59 ± 0,04	0	0,32 ± 0,02
Chồi nảy	4,25 ± 1,05	11,25 ± 2,07	2,47 ± 0,16

Sự mô sẹo từ lá

Trên môi trường MS có NAA 2mg/l và BA 0,5mg/l (trong tối), các mẫu lá hoàng hóa và mô sẹo hình thành từ các vết thương trên gân chính, từ sau 96 giờ nuôi cấy, khi bắt đầu có sự phân chia rối loạn của tế bào. Trên môi trường MS (đối chứng), mẫu cấy vẫn duy trì màu xanh ban đầu và không có sự tạo mô sẹo trong khoảng thời gian nầy. Hoạt tính của auxin và giberelin trong mô tăng mạnh sau 24 giờ nuôi cấy, sau đó giảm dần, sự gia tăng hoạt tính của citokinin xảy ra trễ hơn, từ 72 giờ (bảng 3).

Bảng 3: Sự biến đổi hoạt tính auxin, giberelin và citokinin theo thời gian, trong lá khoai tây (dòng $AVRDC_{1297.19}$), được đặt trong tối, trên môi trường có NAA 2mg/l và BA 0,5mg/l.

Thời gian (giờ)	Auxin (mg/l)	Giberelin (mg/l)	Cytokinin (mg/l)
0	0,46 ± 0,07	2,18 ± 0,95	0,2 ± 0,04
24	7,88 ± 1,47	8,51 ± 2,16	0,258 ± 0,025
48	5,43 ± 1,1	5,0 ± 1,02	0,263 ± 0,091
72	3,47 ± 1,09	1,59 ± 0,35	0,447 ± 0,05
96	1,23 ± 0,24	0	0,362 ± 0,047

THẢO LUẬN

Những kết quả đạt được trong khảo cứu nầy cho thấy tỉ lệ tạo mô sẹo cao ở chồi nẩy và lá đang tăng trưởng phù hợp với các quan điểm: sự phản phân hóa thường xảy ra ở các mô đang trong quá trình tăng trưởng và phân hóa (cường độ hô hấp gia tăng), trên môi trường có auxin kết hợp với citokinin (Hunault 1979, Komamine *et al.* 1992); trạng thái sinh lý của mô và tế bào có vai trò quan trọng trong sự nuôi cấy tế bào (Nozeran *et al.* 1982). Auxin và giberelin cần cho giai đoạn đầu của sự tạo mô sẹo ở khoai tây (dòng $AVRDC_{1297.19}$), citokinin cần ở giai đoạn trễ hơn. Giberelin cần thiết cho sự tạo mô sẹo gián tiếp qua việc kích thích sự nẩy chồi (trường hợp chồi ngủ), nhưng cũng có thể trực tiếp hơn trong sự phản phân hóa (trường hợp lá).

Trong khảo cứu tiếp theo, chúng tôi sẽ tìm hiểu khả năng tạo phôi thể hệ từ các mô sẹo đạt được từ lá.

CALLUS INITIATION FROM SHOOTS AND LEAVES OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

Bui Trang Viet – Le Thi Thuy Tien

ABSTRACT : *Potato callus was initiated from buds and sprouts of tuber and from leaves of Solanum tuberosum L. The buds and sprouts of tuber were placed on MS medium supplemented with 0,4 mg/l 2,4-D and 0,8 mg/l BA, in the dark, at 22 ^{0}C. The leaves taken*

from 3-4 week-old plantlets were placed on MS medium supplemented with 2mg/l NAA and 0,5 mg/l BA, in the dark, at 22 ^{0}C.

The purpose of this paper is to show the presence of some plant growth regulators (auxins, gibberellins and cytokinins) in the explants and their roles on callus formation from the specialized tissues. The results are believed to reflect the fact that the presence of auxins combined with cytokinins in medium initiates and maintains callus in undifferentiated and slow growing state.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Boxus P., Bercetche J., Bollon H., Ducos J.P., Jemmali A., Paques M., Petiard V. Et Pieron. Biotechnologie végétale. Multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique. UNISAT Université audiovisuelle francophone. 190p (1995).

[2] Bùi Trạng Việt - 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, ĐH Tổng Hợp TP HCM, số 1, 155-165 (1992).

[3] Bui Trang Viêt - Utilisation de systèmes cellulaires en vue de l'introduction de gènes d'intérêt agronomique pour l'amélioration des bananiers. Thèse Doctorat. Université de Paris-XI (Orsay, France), 271p (1994).

[4] Desire S. Dormance et germination des microtubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) produits *in vitro*. Thèse Doctorat. Université de Sciences et Technologies de Lille, France 119p (1995).

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

[6] Lam S. Shoot formation in potato tuber discs in tissue culture. Am. Potato J., 52: 103-106 (1975).

[7] Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497 (1962).

[8] Nguyễn Đức Thành. Nuôi cấy tế bào trần của một số dòng khoai tây tứ bội: tách, nuôi và tái sinh cây. Tạp chí Sinh học 5(3): 13-15 (1983).

[9] Nozeran R., Ducreux G. Et Rossignol-Bancilhon L. Réflexion sur les problèmes de rajeunissement chez les végétaux. Bull. Soc. Bot. France, 129: 107-130 (1982).

[10] Pierik R. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands. 344 p (1987).

Lời cảm tạ

Các tác giả chân thành cám ơn Viện Sinh học nhiệt đới TP HCM và Trạm nghiên cứu cây thực phẩm Đà Lạt đã tặng các vật liệu thực vật cho khảo cứu nầy.