

CÁC DẠNG CẤU TRÚC PHÔI SOMA QUÝT ĐƯỜNG (*Citrus reticulata* Blanco)

Phạm Thị Bích Thủy và Nguyễn Bảo Toàn¹

ABSTRACT

*Studies were carried to determine endogenous factors and types of somatic embryo structures during embryogenesis of Duong mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Experiments comprised conversion of friable calli to somatic embryos. Observing and recording structure types formed at anatomical level and evaluating endogenous plant growth regulators during embryogenesis. Results showed that respond to arise somatic embryo from friable calli of nucellar culture obtained on basal medium (BM) supplemented sugar galactose 20 g/l. There were many abnormal structures appeared during embryogenesis. Abnormal structures observed at anatomical level showed that there were many cell zones polarized and stuck together. Measurement of endogenous plant growth regulator amount showed that amount of auxin, abscisic acid and gibberellin were not different statistically during embryogenesis. But amount of cytokinin increased during formation of globular, heart and cotyledonary embryos.*

Keywords: *embryogenesis; normal and abnormal structures; Duong mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)*

Title: *Somatic embryo structures of Duong mandarib (*Citrus reticulata* Blanco)*

TÓM TẮT

*Các nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định yếu tố nội sinh và cấu trúc giải phẫu của các dạng phôi soma trong quá trình phát sinh phôi của quýt Đường (*Citrus reticulata* Blanco). Các thí nghiệm bao gồm biến đổi các callus rời rạc từ nuôi cấy phôi tâm thành phôi soma. Quan sát ghi nhận. các dạng cấu trúc phôi soma hình thành ở mức độ giải phẫu và đánh giá sự hiện diện của các chất điều hòa sinh trưởng nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma. Kết quả cho thấy là sự đáp ứng để phát sinh phôi soma từ callus rời rạc có nguồn gốc phôi tâm đạt được trên môi trường BM được bổ sung đường galactose 20 g/l. Có nhiều dạng cấu trúc bất thường xuất hiện trong quá trình hình thành phôi. Các cấu trúc bất thường được quan sát ở mức độ giải phẫu cho thấy có nhiều vùng tế bào phân cực kết dính nhau. Đo hàm lượng các chất điều hòa sinh trưởng nội sinh phát sinh phôi soma cho thấy hàm lượng auxin, abscisic acid, gibberellin không khác biệt trong quá trình tạo phôi soma. Nhưng hàm lượng cytokinin tăng trong quá trình hình thành từ phôi cầu sang phôi trái tim và phôi tứ diệp.*

Từ khoá: *sự tạo phôi; cấu trúc phôi bình thường và bất thường; Quýt Đường (*Citrus reticulata* Blanco)*

1 MỞ ĐẦU

Phôi soma là phôi phát sinh từ các tế bào soma. Đặc tính của phôi soma là các cây con được tạo ra có đặc tính di truyền giống nhau. Quá trình phát triển phôi soma của thực vật thường hình thành ba dạng cấu trúc. Cấu trúc hình cầu (globular shape), cấu trúc hình tim (heart shape) và cấu trúc torpedo. Ở cấu trúc torpedo đã hình thành hai nhóm tế bào phân cực riêng biệt. Một nhóm tế bào phân cực lên gọi là phân sinh mô chồi và nhóm tế bào phân cực xuống gọi là phân sinh mô rễ. Sự

¹ Khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng dụng

hình thành phôi soma trên cây có múi chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố. Kochba *et al.*, 1982, sử dụng đường galactose, lactose để biến đổi callus thành phôi hoặc sử dụng đường sucrose kết hợp với tuổi callus (Kochba, 1974). Sự tạo thành phôi soma trên cam đôi khi hình thành các cấu trúc bất thường (abnormal structures). Button *et al.*, (1974), khi nuôi cấy callus có nguồn gốc phôi tâm của Cam “Shamouti” *Citrus sinensis* Osb., phát hiện có sự tạo thành các cấu trúc bất thường trong quá trình tiến hoá của phôi soma ông đặt tên cho những cấu trúc này là phôi bất thường. Cấu trúc bất thường bao gồm nhiều phôi có cực chồi và rễ dính nhau quan sát rõ ở giai đoạn hình tim; hay chỉ là một khối mô lớn bong chỉ có sự phân hóa của cực rễ, không có cực chồi. Phôi có nhiều lá mầm; hay hình thành dạng hoa thị với nhiều chồi và rễ, ở dạng này cũng có thể phát sinh nhiều chồi bình thường. Topoonyanont (1999), Márcio *et al.*, (2001) đã nhận thấy có nhiều dạng bất thường trong quá trình thành lập phôi soma. Họ đã xếp chúng thành ba nhóm chính: bất thường về trụ hạ diệp (thay đổi về kích thước và hình dạng) bao gồm số lượng lá mầm; mô phân sinh đỉnh và sự phát triển chồi. Các tác giả trước đây chỉ ghi nhận các cấu trúc quan sát được bằng mắt hoặc dưới kính phóng đại nhưng chưa quan sát cấu trúc ở mức độ giải phẫu. Sự phát sinh phôi ngoài các yếu tố tác động của môi trường nuôi cấy còn có yếu tố nội sinh có trong các tế bào phát sinh phôi. Xác định các chất điều hoà sinh trưởng nội sinh sẽ giúp ích rất nhiều trong việc hiệu chỉnh các chất điều hoà sinh trưởng ngoại sinh cho vào môi trường nuôi cấy. Nghiên cứu này nhằm xác định yếu tố nội sinh và cấu trúc giải phẫu của các dạng phôi soma trên cây quýt Đường (*Citrus reticulata* Blanco).

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Quả quýt Đường được thu nhận tại vườn quýt của Huyện Bình Minh, Tỉnh Vĩnh Long. Quả được thu ở giai đoạn 4 đến 5 tháng tuổi, có đường kính từ 2,5 đến 3 cm.

2.2 Môi trường nuôi cấy

Môi trường sử dụng trong thí nghiệm là môi trường cơ bản (BM). Môi trường cơ bản BM là môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) được bổ sung 1 mg/l pyridoxine-HCl; 1 mg/l nicotinic acid ; 0,2 mg/l thiamine-HCl, 100 mg/l myo-inositol; 500 mg/l malt extract; 50 g/l sucrose và 7 g/l agar. pH của môi trường được chỉnh ở 5,7 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Các thí nghiệm được đặt trong phòng sinh trưởng có nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$ dưới quang kỳ 16 giờ được cung cấp bằng các ống đèn huỳnh quang 1,2 m với mật độ dòng photon quang hợp PPF (photosynthetic photon flux density) là $43 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.3 Phương pháp

Phương pháp nghiên cứu dựa trên các thí nghiệm

2.3.1 Thí nghiệm 1: Hiệu quả của các loại đường lên sự hình thành phôi soma

Callus Quýt Đường khoảng 32 tuần tuổi được sử dụng thí nghiệm trên môi trường cơ bản BM bổ sung 8,5 g/l agar, thay thế 50 g/l sucrose với loại và hàm lượng đường khác nhau như đường sucrose (Su), đường galactose (Ga), đường lactose (La). Sự nuôi cấy được thực hiện với 10 lần lặp lại, mỗi lần là một keo có 6

khối callus (30 mg/khối tương đương đường kính khối khoảng 2,5 mm). Mỗi keo chứa 30 ml môi trường đặc. Các nghiệm thức thí nghiệm:

BM + 50 g/l Su; BM + 20 g/l Ga; BM + 30 g/l Ga; BM + 50 g/l Ga; BM + 10 g/l Su + 20 g/l Ga; BM + 20 g/l La; BM + 10 g/l Su + 20 g/l La; BM + 20 g/l Ga+ 20 g/l La

Ghi nhận phần trăm cụm callus có sự xuất hiện phôi. Đánh giá số lượng phôi được tạo thành trên mỗi cụm callus.

2.3.2 Thí nghiệm 2: Hiệu quả của nồng độ đường sucrose lên sự phát triển của phôi soma

Cụm phôi 5 - 6 tuần tuổi với các phôi ở những giai đoạn phát triển khác nhau, trong đó phôi trưởng thành có đầy đủ tử diệp, cực chồi, cực rễ chiếm tỉ lệ khoảng 0,5%, còn lại là phôi ở giai đoạn hình cầu và hình trái tim. Những phôi ở giai đoạn hình cầu và trái tim này không tiếp tục phát triển sang giai đoạn có tử diệp, nếu không được chuyển sang môi trường mới phôi sẽ bị vàng và chết. Phôi hình cầu và hình tim được lấy ra và cấy vào môi trường BM có bổ sung 2 g/l than hoạt tính trong đó đường sucrose được sử dụng từ 10 g đến 50 g. Thí nghiệm được bố trí với 6 nghiệm thức mỗi nghiệm thức với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại có 5 cụm phôi khoảng 20 phôi cầu/cụm, sau 20 ngày nuôi cấy đếm số phôi có tử diệp, khảo sát chất lượng phôi.

2.4 Khảo sát hoạt tính chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh trong quá trình phát triển phôi

Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh của phôi ở các giai đoạn khác nhau được xác định bao gồm auxin, cytokinin, abscissic acid (ABA), gibberelin (GA). Các chất này được xác định bằng kỹ thuật sinh trắc nghiệm (Nguyễn Du Sanh, 1996). Các mẫu được ly trích và phân đoạn theo các bước sau: Nghiền mẫu (1g) kết hợp 20 ml metanol 80% để trong tối 24 giờ. Sau đó, lọc 3 lần mỗi lần 10ml metanol 80%. Quạt khô cạn còn 1 ml, thêm 4 ml nước cất. Lóng 3 lần với ether, mỗi lần 10 ml. Chia hai dung dịch

1. Dịch ether, lóng 2 lần, mỗi lần 3 ml NaHCO₃. Dịch ether quạt khô cạn còn 1 ml. Dịch này được sử dụng sinh trắc nghiệm auxin, ABA, GA.

2 Dịch nước chỉnh pH 2,5 lóng 3 lần với ether. Thu dịch nước chỉnh về pH7, lóng 3 lần, mỗi lần 10 ml Butanol. Dịch Butanol được cô cạn, thêm 10 ml nước cất. Dịch này dùng để sinh trắc nghiệm Cytokinin.

Dùng giấy Whatman số 1 có kích thước 11 x 22 cm. Sử dụng micropipet chấm dịch eter đã quạt cạn còn khoảng 1 ml thành một đường ngang trên giấy sắc ký, vạch gốc cách mép giấy 2 cm theo chiều đứng. Dung môi di chuyển gồm isopropanol, ammoniac, nước (tỉ lệ 10 : 1 : 1 theo thể tích). Khi dung môi di chuyển cách mép trên của giấy khoảng 1 - 2 cm lấy giấy sắc ký ra, dùng bút chì đánh dấu mực dung môi di chuyển. Phân đoạn giấy sắc ký từ vạch gốc thành mười băng bằng nhau (kí hiệu Rf 0,1 đến Rf 1,0), lấy 1 băng cùng kích thước nhưng chỉ có dung môi đi qua (phía dưới vạch gốc) làm băng chuẩn. Ngâm mỗi băng trong hộp petri chứa 10 ml nước cất trong 24 giờ để khuếch tán các chất đã được cô lập trong giấy sắc ký. Auxin nội sinh ở băng Rf 0,3 - Rf 0,4, ABA ở băng Rf 0,6 - Rf 0,8. Vị

trí của GA được phát hiện bằng cách nhúng vào dung dịch KMnO_4 5‰, rửa trong thau nước cho đến khi mất màu dung dịch KMnO_4 . GA_3 hình thành màu nâu đậm trên giấy sắc ký. Hoạt tính của auxin và ABA được đo bằng sinh trắc nghiệm khúc cắt diệp tiêu của cây mầm lúa (được gieo trong tối sau 72 ± 5 giờ, khi bao diệp tiêu chưa bị xé). Diệp tiêu Lúa được cắt thành các đoạn có chiều dài 5 mm, 10 khúc cắt được ngâm vào mỗi đĩa petri có chứa dịch trích, trong tối. Sau 24 giờ, đo sự sai biệt chiều dài khúc cắt diệp tiêu. Hoạt tính của auxin được so với hoạt tính của IAA tinh khiết 1 mg/l; hoạt tính của ABA được so với hoạt tính của ABA tinh khiết 1 mg/l. Hoạt tính GA được xác định bằng sinh trắc nghiệm với trực hạ diệp cây mầm Xà lách (*Lactuca sativa* L.). Hạt xà lách sau khi ủ 24 giờ cho nảy mầm được đặt vào các becher 100 ml chứa dịch ngâm băng sắc ký có GA. Mẫu đối chứng được thực hiện với GA 10 mg/l và mẫu chuẩn (dung dịch ngâm băng sắc ký chỉ có dung môi đi qua). Thí nghiệm được đặt dưới ánh sáng 2000 lux, nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau năm ngày xác định sự sai biệt của chiều dài trực hạ diệp cây mầm Xà lách với mẫu đối chứng và mẫu chuẩn suy ra hoạt tính GA. Hoạt tính cytokinin được xác định bằng sinh trắc nghiệm với tử diệp Dưa leo (*Cucumis sativus* L.). Hạt Dưa leo được ủ cho nảy mầm khoảng 24 giờ trong tối. Khi rễ mầm dài khoảng 5 mm, tiến hành tách tử diệp. Năm mảnh tử diệp sau khi cân được đặt trên tấm lame quần giấy lọc, đặt trong đĩa petri chứa dịch trích dùng để sinh trắc nghiệm cytokinin. Mẫu đối chứng với BA 1 mg/l và mẫu chuẩn (n - butanol cô cạn). Thí nghiệm được thực hiện dưới ánh sáng 2000 lux, nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau 2 ngày, xác định sự sai biệt khối lượng của các mảnh tử diệp so với mẫu đối chứng và mẫu chuẩn suy ra hoạt tính của cytokinin.

2.5 Khảo sát hình thái và cấu trúc giải phẫu của các dạng phôi

Mục đích của kỹ thuật này là nhận diện các loại mô thông qua sự ăn màu của vách tế bào với phẩm nhuộm. Cắt dọc phôi thành từng lát mỏng tủy nội dung tế bào bằng javel trong thời gian khoảng 20 phút. Rửa 3 lần với nước cất. Ngâm mẫu trong acid acetic 5% trong 3 phút. Rửa nước 3 lần. Nhuộm 15 phút với phẩm nhuộm son phen - lục iod. Rửa nước đến khi sạch thuốc nhuộm dư thừa, ngâm trong nước, mẫu đã sẵn sàng để quan sát. Mẫu được quan sát dưới kính lúp và kính hiển vi quang học vật kính X10. Phôi được thu nhận ở các giai đoạn phát triển khác nhau: giai đoạn cầu, giai đoạn tử diệp và phôi bất thường. Các dạng cấu trúc được tiến hành đo và chụp hình dưới kính lúp với độ phóng đại 30 lần.

2.6 Xử lý số liệu

Các số liệu được phân tích thống kê với phép thử F và Duncan bằng phần mềm SPSS version 11.5

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thí nghiệm 1: Đánh giá hiệu quả của các loại đường lên sự hình thành phôi soma

Kết quả thí nghiệm ở Bảng 1 cho thấy rằng các nghiệm thức có sự hiện diện của đường sucrose (Su) đơn hoặc kết hợp đều không có sự hình thành phôi soma ở 2 tuần sau khi cấy. Khối callus của các môi trường này được tiếp tục cấy chuyển và sinh trưởng nhanh sau 4 tuần và không tiếp tục sinh trưởng sau 6 tuần. Sau đó,

chuyển sang màu vàng và hoá nâu. Chỉ có nghiệm thức có đường galactose thì có sự xuất hiện phôi.

Bảng 1: Hiệu quả của các loại đường sucrose (Su), galactose (Ga) và lactose (La) trên tỉ lệ phần trăm cụm callus phát sinh phôi thể hệ theo thời gian

Nghiệm thức (BM + đường)	Thời gian (tuần)		
	2	4	6
50 g/l Su	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
20 g/l Ga	0,0 ^a	39,9 ^b	69,9 ^c
30 g/l Ga	3,3 ^a	19,9 ^a	23,3 ^{ab}
50 g/l Ga	3,3 ^a	26,6 ^a	39,9 ^{bc}
10 g/l Su + 20 g/l Ga	0 ^a	0 ^a	0 ^a
20 g/l La	0 ^a	0 ^a	6 ^{ab}
10 g/l Su + 20 g/l La	0 ^a	0 ^a	0 ^a
20 g/l Ga+ 20 g/l La	6,6 ^a	33,3 ^a	66,6 ^c

Các giá trị được kèm theo sau bởi các chữ giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan

Sau bốn tuần nuôi cấy có nhiều nghiệm thức xuất hiện phôi soma. Đa số đều xuất hiện trên môi trường có đường galactose và galactose kết hợp lactose số lượng phôi được tạo thành nhiều bao phủ cả khối callus. Sau 6 tuần nuôi cấy, các nghiệm thức có lactose (La) có sự xuất hiện phôi. Nghiệm thức galactose 20 g/l xuất hiện phôi soma nhiều nhất (69,9%) kể đến là nghiệm thức kết hợp galactose (20 g/l) và lactose (20 g/l) nhưng hai nghiệm thức này không khác biệt thống kê. Trong một cụm callus có nhiều dạng phôi xuất hiện xen kẽ với khối callus. Để phân biệt cụm callus nào có phôi xuất hiện phôi sớm nhất. Chúng tôi dựa trên màu sắc của cụm callus. Cụm callus nào có màu sắc hơi vàng xanh hoặc màu xanh thì được lấy ra (trong điều kiện vô trùng) quan sát dưới kính phóng đại để xác định các dạng cấu trúc. Cụm callus vàng xanh thường xuất hiện các phôi hình cầu nhỏ xen kẽ rải rác trên các khối callus. Cụm callus màu xanh thì xuất hiện các phôi hình tim hoặc phôi torpedo (Hình 1 ABC). Sự hình thành phôi soma được bắt đầu từ dạng hình cầu (globular shape) kể đến dạng hình tim (heart shape) và sau cùng là dạng torpedo. Sự phát triển thêm có thể hình thành dạng tử diệp (cotyledonary embryo). Như vậy sự tạo phôi không đồng bộ ở các kiểu phôi trên các cụm callus. Điều này chứng tỏ rằng các tế bào phát sinh phôi khi đủ điều kiện có thể hình thành phôi soma. Thí nghiệm trên hai loại đường galactose và lactose ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp cũng cho thấy là hai loại đường này có hiệu quả trên sự hình thành phôi soma (Bảng 1). Có nhiều giải thích cho sự hình thành phôi soma này. Mặc dù Gross *et al.*, (1981) cho rằng galactose độc cho sự sinh trưởng trong *in-vitro* của callus trực thượng diệp cây Dưa Leo. Nhưng Kochba *et al.*, (1982) cho rằng galactose và lactose rất hiệu quả cho sự kích thích sự tạo phôi từ các callus của giống Cam “Shamouti” (*Citrus sinensis*). Họ cũng đã chứng minh rằng galactose và lactose ngăn cản sự tổng hợp của auxin. Kochba *et al.*, (1978), đã cho thấy rằng giống Cam “Shamouti” đã có sự đáp ứng tốt nhất trong sự tạo phôi soma ở đường galactose hoặc lactose 5%. Các kết quả này cũng được Kunitake & Mii, (1995), xác nhận trên các thí nghiệm được thực hiện với galactose và lactose trên nhiều giống và loài *Citrus*. Họ đã ghi nhận sự đáp ứng khác nhau trong quá trình tạo phôi chủ yếu là sự khác biệt giữa các loài.

3.2 Thí nghiệm 2: Hiệu quả của nồng độ đường sucrose (Su) lên sự phát triển của phôi soma

Phôi soma được gọi là phôi tử diệp khi nó hình thành nên các tử diệp rõ ràng. Cấu trúc phôi tử diệp được ghi nhận bao gồm phôi tử diệp bình thường và phôi tử diệp bất thường. Phôi tử diệp bình thường là một phôi đơn bao gồm hai vùng tế bào phân cực trên và dưới. Khi phôi tử diệp bình thường phát triển thành cây bình thường.

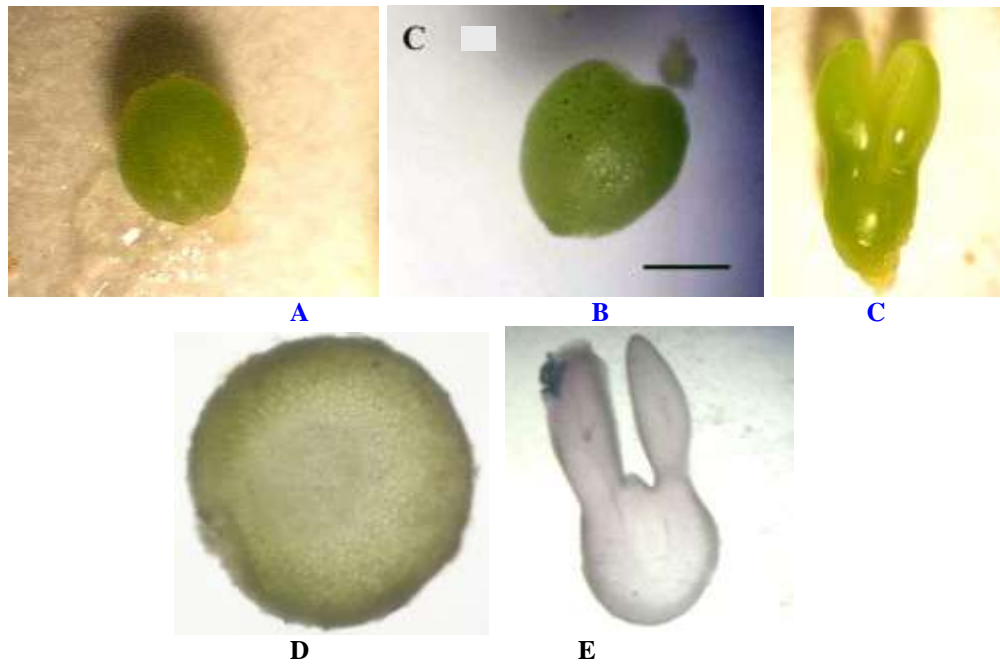
Bảng 2: Tỷ lệ phần trăm lượng phôi tử diệp, phôi tử diệp bình thường và phôi tử diệp bất thường trên môi trường BM với lượng đường sucrose khác nhau, sau 20 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Phôi tử diệp (%)	Phôi tử diệp bình thường (%)	Phôi tử diệp bất thường (%)
BM + 2 g/l than +10 g/l Su	14,8 ^a	0,4 ^a	14,4b
BM + 2 g/l than + 20 g/l Su	9,3 ^a	1,0 ^a	8,3 ^{ab}
BM + 2 g/l than + 25 g/l Su	8,6 ^a	0,6 ^a	8,0 ^{ab}
BM + 2 g/l than + 30 g/l Su	7,2 ^a	0,4 ^a	6,8 ^a
BM + 2 g/l than + 40 g/l Su	6,6 ^a	0,3 ^a	6,3 ^a
BM + 2 g/l than + 50 g/l Su	8,3 ^a	2,3 ^b	6,0 ^a

Các giá trị được kèm theo sau bởi các chữ giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan

Trong khi phôi tử diệp bất thường là một dạng cấu trúc đặc biệt. Nó có thể bao gồm nhiều cực chồi kết dính nhau hay có nhiều tử diệp...Phôi tử diệp bất thường đôi khi phát sinh chồi ở nhiều vị trí khác nhau. Kết quả Bảng 2 cho thấy sau 20 ngày nuôi cấy trên môi trường cơ bản BM có bổ sung 2 g/l than hoạt tính ở các nồng độ đường sucrose khác nhau đều có sự thay đổi hình thái phôi tử diệp. Tỷ lệ phần trăm phôi tử diệp bình thường (có hai tử diệp, có sự phân cực chồi và cực rỗng) chiếm tỷ lệ thấp so với phôi tử diệp bất thường. Phôi tử diệp bình thường đạt tỷ lệ cao nhất ở nghiệm thức 50 g/l sucrose (2,3%). Ở nồng độ đường thấp tỷ lệ hình thành phôi bất thường cao trong khi nồng độ đường sucrose gia tăng tỷ lệ hình thành phôi bất thường giảm. Đường là nguồn cung cấp năng lượng cho sự phát triển của tế bào và cơ quan. Lượng sucrose trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự phát triển của cấu trúc phôi và tăng trưởng thành cây con. Kết quả thí nghiệm này cho thấy hàm lượng sucrose ảnh hưởng đến sự thay đổi hình thái phôi. Sự định hình cấu trúc phôi soma ở dạng phôi tử diệp bình thường hay dạng phôi tử diệp bất thường có lẽ đã được hình thành trong quá trình phát triển phôi. Sự hình thành cấu trúc phôi bình thường có được phát sinh từ một tế bào ban đầu sau đó phân chia và phân cực trên và dưới trong quá trình hình thành phôi. Trong khi sự hình thành phôi bất thường có lẽ là do sự phát sinh cùng lúc các tế bào còn dính nhau và khi phát triển hình thành cụm phôi gồm nhiều tế bào phân cực lên hoặc xuống để có thể phát triển thành nhiều cực chồi (Hình 3 C). Sự hình thành các dạng cấu trúc phôi tử diệp bất thường đã được nhiều tác giả báo cáo trong quá trình phát triển phôi soma của các cây cam (Toponyanont, 1999; Mácio *et al.*, 2001, Nguyễn Bảo Toàn & Debergh, 2005). Có lẽ đây là một đặc tính riêng của các loài trong chi *Citrus* trong quá trình phát sinh phôi soma.

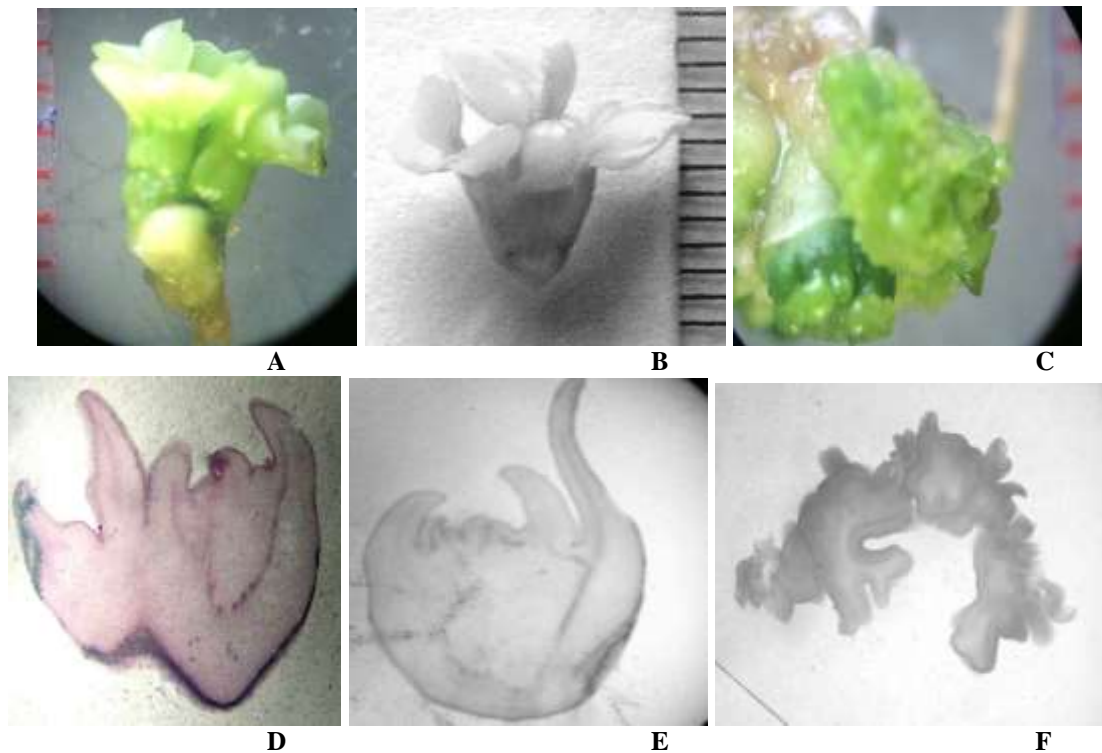
3.3 Khảo sát hình thái và cấu trúc giải phẫu của các dạng phôi



Hình 1: Các dạng cấu trúc phôi bình thường

A: phôi cầu; B: phôi trái tim; C: Phôi từ diệp,

D: Cấu trúc giải phẫu của phôi cầu; E: Cấu trúc giải phẫu của phôi từ diệp;



Hình 2: Các dạng phôi bất thường và hình thái giải phẫu của chúng

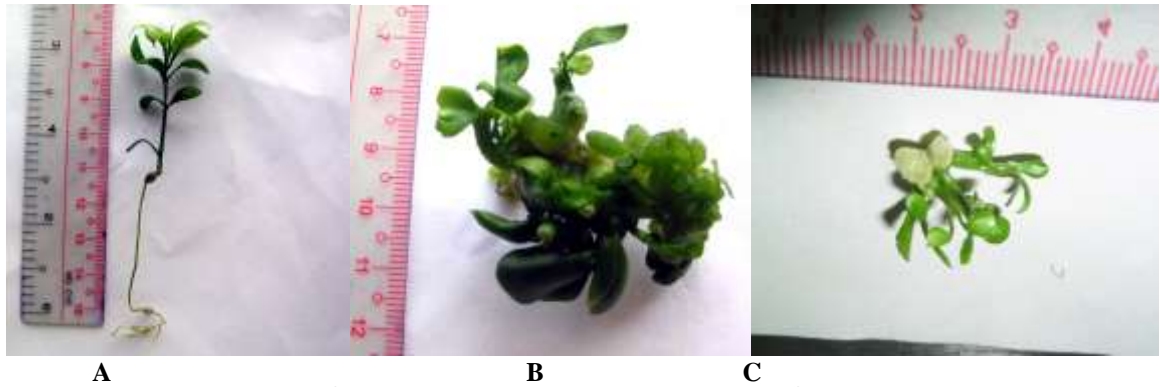
A: Phôi bất thường gồm hai phôi dính nhau ; B: Phôi bất thường gồm nhiều lá; C: Phôi bất thường gồm cụm lá dính nhau. D: Cấu trúc giải phẫu phôi bất thường gồm hai phôi dính nhau; E: Cấu trúc giải phẫu phôi bất thường gồm nhiều lá; F: Cấu trúc giải phẫu phôi bất thường gồm cụm lá dính nhau.

Quan sát hình thái và giải phẫu học của phôi soma của quýt Đường ở những giai đoạn phát triển khác nhau, cho thấy callus phát sinh phôi trải qua các dạng phôi ở các giai đoạn phát triển từ phôi cầu hơi xanh (Hình 1A), phôi hình tim có sự hình thành hai lá mầm ở hai phía đối diện nhau (Hình 1B), phôi tử diệp với sự hiện diện rõ của hai lá mầm (Hình 1C).

Lát cắt dọc phôi cầu cho thấy vùng mô phân sinh ngọn và sự chuyên hóa vùng tiền tượng tầng chưa rõ ràng (Hình 1D). Quan sát giải phẫu học của phôi tử diệp cho thấy có sự hình thành các vùng phân cực chồi và cực rễ, với hai vùng mạch kéo dài từ chồi xuống rễ (Hình 1E). Hai mạch chạy dọc từ trên xuống từ giữa hai lá mầm, vùng sơ khởi tượng tầng kéo dài vào trong lá mầm. Vì vậy các phôi này khi phát triển sẽ thành cây bình thường (Hình 3A) Trong quá trình nuôi cấy, bên cạnh những phôi soma có cấu trúc bình thường còn có sự phát triển dạng bất thường này được quan sát ở các cấu trúc khác nhau như phôi bất thường gồm hai phôi dính nhau, phôi bất thường gồm nhiều lá, phôi bất thường gồm cụm lá dính nhau (Hình 2 A,B,C). Khi quan sát cấu trúc giải phẫu của các phôi này cho thấy mô phân sinh chồi của phôi bất thường có hình thành (Hình 2D, 2E). Phôi khuyết mô phân sinh ngọn và mô phân sinh rễ hay mô phân sinh chưa hình thành. Mô phân sinh chồi bị biến đổi hay tiêu giảm (Hình 2 F).

Quan sát lát cắt dọc của những phôi có nhiều lá mầm đối xứng nhau qua trục, những phôi này có cụm với nhiều mô phân sinh chồi ở giữa. Sự dính liền của nhiều phôi do nhiều tế bào phát sinh phôi dính nhau, do sự phân bào không bình thường trong quá trình phát sinh phôi, hình thành những phôi với cùng một cực rễ nhưng có nhiều cực chồi khác nhau (Hình 2 A). Cụm phôi với nhiều phôi có cực chồi và cực rễ riêng biệt, có tượng tầng phát triển bình thường, nhưng dính nhau ở một bên mép của phôi, hình thành cụm phôi hỗn độn không phân biệt được chồi và rễ với chi chít những lá mầm rất nhỏ không phát triển (Hình 2 F).

Sự phát triển chồi: trong sự phát triển của chồi cũng có những biến đổi bất thường. Phôi bất thường hình thành cụm chồi với những chồi bình thường (Hình 3 B), phôi tạo chồi bình thường xen lẫn với những chồi bất thường. Những phôi có cực chồi và cực rễ riêng biệt nhưng dính nhau ở một mép của phôi thì nảy mầm phát triển thành những cây con dính nhau (Hình 3 C) Tuy nhiên, trong quá trình phát triển của phôi, từ sau giai đoạn phôi cầu có sự hình thành những phôi bất thường và điều này xảy ra thường xuyên trong các nghiên cứu tạo phôi thể hệ từ các loài của cây có múi như Chanh Rangpur (*Citrus limonia* L. Osbeck) và Quýt Cleopatra (*Citrus reticulata* Blanco) (Márcio *et al.*, 2000), hay ở *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis* (Topoonyanont, 1999; Nguyễn Bảo Toàn & Debergh, 2005). Nhiều giả thuyết cho rằng sự bất thường bắt xảy ra ngay trong giai đoạn xác định tế bào sinh phôi và sự phát triển về sau của phôi cầu. Những tế bào khác nhau và điều kiện nuôi cấy khác nhau sẽ ảnh hưởng đến sự hình thành và phát triển cấu trúc của phôi cầu từ cụm tế bào phát sinh phôi (Topoonyanont, 1999), chính những thay đổi này dẫn đến thay đổi về sinh lý của tế bào. Sự thay đổi hình thái phôi từ phôi cầu sang phôi tim là do sự di chuyển hữu cực của auxin quyết định. Do đó, có thể có một sự rối loạn trong sự di chuyển hữu cực của auxin trong phôi cầu. Chính điều này làm cho sự phân chia tế bào bị xáo trộn.



Hình 3: Cây con phát triển từ phôi bình thường (A); chồi phát triển từ phôi bất thường (B, C)

3.3.1 Kết quả định lượng các hoạt tính chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh trong quá trình phát triển phôi

Kết quả Bảng 3 cho thấy rằng hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng nội sinh có trong các giai đoạn phát triển phôi đều khác nhau. Trong quá trình phát triển phôi từ giai đoạn phôi cầu trắng nhỏ đến phôi có tử diệp, hoạt tính auxin giảm dần, thể hiện rõ nhất từ giai đoạn hình cầu muộn sang phôi có tử diệp, ngược lại với auxin, cytokinin tăng dần từ giai đoạn phôi có hình cầu trắng nhỏ đến giai đoạn phôi tử diệp. Trong khi đó hoạt tính ABA và GA thay đổi không đáng kể.

Bảng 3: Hoạt tính chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh trong các giai đoạn phát triển của phôi từ giai đoạn phôi hình cầu nhỏ đến giai đoạn phôi có tử diệp

Các giai đoạn phát triển phôi	Hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng			
	Auxin ($\mu\text{g/g}$)	ABA ($\mu\text{g/g}$)	GA ($\mu\text{g/g}$)	Cytokinin ($\mu\text{g/g}$)
Phôi cầu trắng nhỏ	$6,8 \pm 0,9^a$	$10,6 \pm 0,8^a$	$39,3 \pm 5,6^a$	$1,5 \pm 0,2^a$
Phôi cầu muộn và hình tim	$6,6 \pm 0,5^a$	$9,3 \pm 0,9^a$	$40,1 \pm 3,8^a$	$1,8 \pm 0,2^b$
Phôi tử diệp	$5,8 \pm 0,8^a$	$10,5 \pm 1,1^a$	$38,1 \pm 2,8^a$	$2,7 \pm 0,1^c$

Các giá trị được kèm theo sau bởi các chữ giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan

Trong quá trình phát triển phôi từ giai đoạn phôi cầu trắng nhỏ đến phôi có tử diệp, hoạt tính auxin giảm dần, thể hiện rõ nhất từ giai đoạn phôi cầu muộn sang phôi có tử diệp. Ngược lại, hoạt tính cytokinin tăng dần từ giai đoạn phôi có hình cầu trắng nhỏ đến giai đoạn phôi tử diệp, hoạt tính cytokinin tăng lên trong giai đoạn này là yếu tố chính điều khiển quá trình sinh mạch giúp cho sự tạo chồi. Sự giảm hoạt tính auxin kết hợp với sự gia tăng hoạt tính cytokinin trong quá trình nuôi cấy là điều kiện cần thiết cho sự tiến hoá của phôi soma (Bùi Trang Việt, 2003). Trong khi đó hoạt tính ABA và GA thay đổi không đáng kể, vì hoạt tính ABA giảm ít từ phôi cầu sang phôi tim nhưng tăng nhẹ trở lại khi bước sang giai đoạn phôi có tử diệp. Có thể hoạt tính của ABA sẽ tăng lên sau giai đoạn phôi tử diệp giúp cho sự trưởng thành của phôi. GA không có vai trò trong giai đoạn tiến hoá của phôi thể hệ.

4 KẾT LUẬN

Sự cảm ứng phát sinh phôi soma từ callus rời rạc có nguồn gốc phôi tâm đạt được trên môi trường BM được bổ sung đường galactose 20 g/l.

Có nhiều dạng cấu trúc bất thường trong quá trình hình thành phôi. Các cấu trúc bất thường được quan sát giải phẫu cho thấy có nhiều phân cực kết dính nhau.

Hàm lượng các chất điều hòa sinh trưởng nội sinh cho thấy auxin, abscisic acid, gibberellin không khác biệt trong quá trình tạo phôi soma. Nhưng cytokinin tăng quá trình hình thành từ phôi cầu sang phôi trái tim và phôi tử diệp.

CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Giáo Dục và Đào Tạo, Trường Đại Học Cần Thơ đã xét duyệt và tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Trang Việt. (2003). Sinh phôi thể hệ ở thực vật - Giáo trình cao học sinh lý thực vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp HCM.
- Button J, Kochba J and Bornman CH. (1974). Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.). *J. Exp. Bot.* 25: 446-457
- Gross, K. C., D. M. Pharr, and R. D. Locy. (1981). Growth of callus initiated from cucumber hypocotyls on galactose and galactose containing oligosaccharides. *Pl. Sci. Lett.* 20: 333-341
- Kochba, J. and J. Button. (1974). The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the Shamouti Orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. *Z. Pflanzenphysio.* 73, 415-421
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Saad S and Neuman H. (1978). Stimulation of embryogenesis in citrus tissue culture by galactose. *Naturwissenschaften* 65: 261
- Kochba, J., P. Spiegel-Roy, H. Neumann and S. Saad. (1982). Effects of carbohydrate on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. *Z. Pflanzenphysio.* 105 : 359-368
- Kunitake, H. and H. Mii. (1995). Somatic embryogenesis in *Citrus* species. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. (ed by Y.P.S. Bajaj) Springer- Verlag Berlin Heidelberg. Vol 30: 283-298
- Márcio L. T.; Beatriz M. Januzzi Mendes; Francisco De Assis A. Moađao Filho; Clarice G.B. Demeútrio; Naratip
- Jansakul and Adriana P. Martinelli Rodriguez. (2001). Somatic embryogenesis in citrus spp.: carbohydrate stimulation and histodifferentiation, *Biol.–Plant*, 37, 446-452
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Nguyễn Bảo Toàn và Debergh P. C. (2005). Cải thiện cấu trúc phôi bất thường trong nuôi cấy phôi tâm hai giống cam *Citrus aurantium* và *Citrus sinensis*, Hội thảo quốc gia cây có múi, xoài và khóm, Chương trình VLIR-IUC CTU, 16-23.
- Nguyễn Du Sanh. (1996). Xác định hoạt tính các chất điều hòa sinh trưởng thực vật bằng phương pháp sinh trắc nghiệm, trong: *Thực tập hướng Sinh học Thực vật, nhà xuất bản trường đại học khoa học tự nhiên TP. HCM*, 42-66
- Tisserat, B. (1987). Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration, In: *Plant cell culture: A practical approach*, Oxford, Washington DC , 79-104.
- Topoonyyanont N. (1999). Abnormalities in *Citrus* somatic embryogenesis, In: *The versatility of plant development In-vitro: Case studies*, PhD thesis, Gent University, Belgium.