

PHÁT SINH PHÔI SINH DƯỠNG TỪ MÔ SỢ CÓ NGUỒN GỐC TỪ LÁ CÂY ĐU ĐỦ (*CARICA PAPAYA* L.)

ĐỖ BÍCH NGỌC*, BÙI XUÂN SƠN**, BÙI VĂN LỆ***

TÓM TẮT

Mô sẹo từ lá non cây đu đủ *Carica papaya* L. tạo phôi khi nuôi cấy trên môi trường MS (*Murashige and Skoog*) bổ sung 0,5mg/l BAP (6-Benzylaminopurine) và 0,1mg/l NAA (*Naphthaleneacetic acid*). Phôi sinh dưỡng sẽ nảy mầm khi nuôi cấy lỏng lắc trên môi trường MS. Sự phát sinh phôi sinh dưỡng của những mô sẹo có nguồn gốc từ lá của loài đu đủ này với hiệu suất cao là bằng chứng mạnh mẽ cho tính toàn năng của thực vật. Điều này sẽ giúp ích cho phương thức thực nghiệm trong việc nhân giống nhanh cây *Carica papaya* L.

Từ khóa: mô sẹo phát sinh phôi, papaya, phôi sinh dưỡng.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis from calluses on leaf explants of *Carica papaya* L.

*Delivered from young leaves of *Carica papaya* L. and cultured in MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP and 0,1 mg/l NAA, calluses produce somatic embryogenesis. This somatic embryogenesis then continues to germinate during the time they are cultured in shaken MS liquid medium. The development of embryogenesis from calluses on leaf explants of *Carica papaya* L. in an efficient way is a strong evidence for the plant totipotency. It is helpful for experimental procedures in the quick propagation of *Carica papaya* L.*

Keywords: embryogenesis callus, papaya, somatic embryogenesis.

1. Mở đầu

Cây đu đủ *Carica papaya* L. thuộc họ *Caricaceae*, là loại cây ăn quả phổ biến ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Đu đủ cho trái quanh năm, hàm lượng chất dinh dưỡng cao, đặc biệt là chứa nhiều vitamin A. Đu đủ còn được coi là một loại dược liệu quý: rễ, hoa, lá và nhựa cây đều có thể sử dụng để làm thuốc [2]. Ngoài ra, nhựa của cây đu đủ chứa một enzyme

phân giải protein có tên là papain. Papain rất cần cho nhiều lĩnh vực công nghiệp: dược phẩm, hóa chất, kỹ nghệ tơ sợi dệt may, thuộc da, thực phẩm...[5]

Đu đủ được trồng phổ biến ở nước ta chủ yếu ở quy mô hộ gia đình. Việc trồng tập trung chuyên canh để sản xuất đu đủ với quy mô công nghiệp gặp nhiều bất lợi về giống và dịch bệnh.

Quá trình hình thành phôi sinh dưỡng mang lại nhiều ứng dụng trong thực tiễn và có tính thương mại cao, đặc biệt là trong lĩnh vực vi nhân giống. Ngoài ra, số lượng lớn của phôi sinh dưỡng chính là một nguồn nguyên liệu

* HVCH, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP HCM

** ThS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP HCM

*** PGS TS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP HCM

đáng kể phục vụ cho những ứng dụng quan trọng khác như: sản xuất hạt nhân tạo, biến nạp gen, lai sinh dưỡng, tạo dòng cây sạch virus,... Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu về sự tạo phôi sinh dưỡng cây đu đủ. Mục tiêu của nghiên cứu này là tìm hiểu quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng thông qua mô sẹo của cây đu đủ giống ruột vàng, một giống đu đủ của địa phương huyện Tân Thành, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu với các phẩm chất: trái to, quả ngọt, năng suất cao. Điều này cũng sẽ giúp ích cho công tác tuyển chọn và lưu trữ giống.

2. Vật liệu - phương pháp

2.1. Vật liệu

Vật liệu là mô sẹo từ lá cây con *in vitro* 30 ngày tuổi của hạt đu đủ ruột vàng ở vườn của các hộ nông dân thuộc xã Hắc Dịch, huyện Tân Thành, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. Quả hái về được rửa sạch bằng xà phòng và khử trùng bề mặt bằng cồn 70% rồi đưa vào tủ cấy. Tách đôi quả bằng dao vô trùng, chọn những hạt đen ở phần giữa trái đu đủ, tách bỏ lớp vỏ lụa rồi gieo trên gòn thấm ướt bằng dung dịch GA₃ nồng độ 0,5mg/l đã được hấp vô trùng.

Hạt sau khi gieo được một tuần thì nảy mầm. Hạt nảy mầm được chuyển sang môi trường MS [4] để cây con phát triển. Những mẫu lá của cây con 30 ngày tuổi được sử dụng làm vật liệu tạo mô sẹo trên môi trường MS_{1/2} có bổ sung 3% sucrose, 400mg/l glutamine; 0,02mg/l BAP và 1mg/l 2,4-D. Sự nuôi cấy được thực hiện trong tối. Khảo sát sự phát sinh

phôi sinh dưỡng cây đu đủ từ nguồn mô sẹo thu được sau 3 tháng nuôi cấy.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên quá trình cảm ứng tạo phôi sinh dưỡng từ những mô sẹo có nguồn gốc từ lá.

Mô sẹo từ lá được đặt nuôi trên môi trường MS cơ bản (C1), môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa (C2) hoặc môi trường MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng là 0,1mg/l BAP kết hợp 0,02mg/l NAA (C3) hoặc 0,5mg/l BAP kết hợp 0,1mg/l NAA (C4). Độ pH môi trường được chỉnh về $5,8 \pm 0,1$ trước khi hấp khử trùng bằng nồi hấp ở 121°C, 1 atm trong thời gian 15 phút.

Chỉ tiêu theo dõi là tỉ lệ (%) mẫu mô sẹo tạo phôi sinh dưỡng và số phôi trung bình trên một mẫu mô sẹo ban đầu. Thời gian theo dõi: 1 tháng.

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của môi trường và cách nuôi cấy lên khả năng nảy mầm của phôi.

Vật liệu là phôi ở giai đoạn trưởng thành từ thí nghiệm trên (hình 1B). Môi trường nuôi cấy là môi trường MS, môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa hoặc môi trường MS có sự kết hợp giữa 0,5mg/l BAP và 0,02mg/l NAA. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường đặc, lỏng tĩnh hoặc lỏng lắc (tốc độ lắc là 150 vòng/phút). Thời gian theo dõi: 1 tuần.

Các thí nghiệm được tiến hành tại Bộ môn Công nghệ Sinh học Thực vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM. Thời gian chiếu sáng: 16

giờ/ngày. Cường độ chiếu sáng: 33,75 - 40,5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nhiệt độ phòng nuôi cấy: $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Độ ẩm trung bình: 70 – 80%.

2.2.2. Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả là giá trị trung bình cộng của 3 lần thí nghiệm. Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS v.11.5 với độ tin cậy 95%, được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình \pm SE (Standard Error).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên quá trình cảm ứng tạo phôi sinh dưỡng từ những mô sẹo có nguồn gốc từ lá

Phôi sinh dưỡng hình thành trực tiếp trên bề mặt của mẫu mô sau một tuần nuôi cấy. Các nghiệm thức môi trường đều có khả năng cảm ứng sinh phôi sinh dưỡng từ mô sẹo (bảng 1). Nghiệm thức C1 và C4 có khả năng cảm ứng tạo phôi sinh dưỡng tốt nhất. Hai nghiệm thức này không có sự khác biệt đáng kể về tỉ lệ mẫu mô sẹo phát sinh phôi sinh dưỡng. Tuy nhiên, trên môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l BAP và 0,1mg/l NAA cho số phôi sinh dưỡng trung bình trên một mẫu mô sẹo nhiều nhất (trung bình 218 phôi trên một mẫu mô sẹo ban đầu sau một tháng nuôi cấy) (hình 1G). Như vậy, trong thí nghiệm này, nghiệm thức C4 là nghiệm thức có sự phát sinh phôi sinh dưỡng tốt nhất.

Sự phát sinh phôi sinh dưỡng trong trường hợp này là quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng gián tiếp vì thông qua giai đoạn mô sẹo. Trong thí nghiệm này,

sự kết hợp giữa auxin và cytokinin cho khả năng cảm ứng phát sinh phôi tốt nhất. Kết quả này phù hợp với nhận định của Cruz và cộng sự [1]. Tuy nhiên, kết quả này có thể khác biệt ở những loài cây khác vì tác động của các chất điều hòa sinh trưởng lên các đối tượng thực vật khác nhau là không giống nhau.

3.2. Ảnh hưởng của môi trường và cách nuôi cấy lên khả năng nảy mầm của phôi

Phôi nảy mầm tốt nhất khi nuôi cấy lỏng lắc trên môi trường MS (hình 1H). Cùng một phương pháp nuôi cấy lỏng lắc, khi sử dụng môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l BAP và 0,02mg/l NAA hoặc 10% nước dừa thì tỉ lệ ra rễ khá cao nhưng chồi phát triển dị dạng, lá mầm không phát triển hoặc chỉ có một lá mầm phát triển. Có thể thấy rằng phôi soma cần sự giảm hàm lượng auxin và cytokinin để phát sinh hình thái. Merkle và cộng sự (1995) nhận xét trên môi trường không có chất điều hòa tăng trưởng, khi sự cân auxin ngoại bào bị loại trừ, phôi soma bắt đầu chuyển sang giai đoạn biệt hóa mới với các biến đổi về hình thái [3].

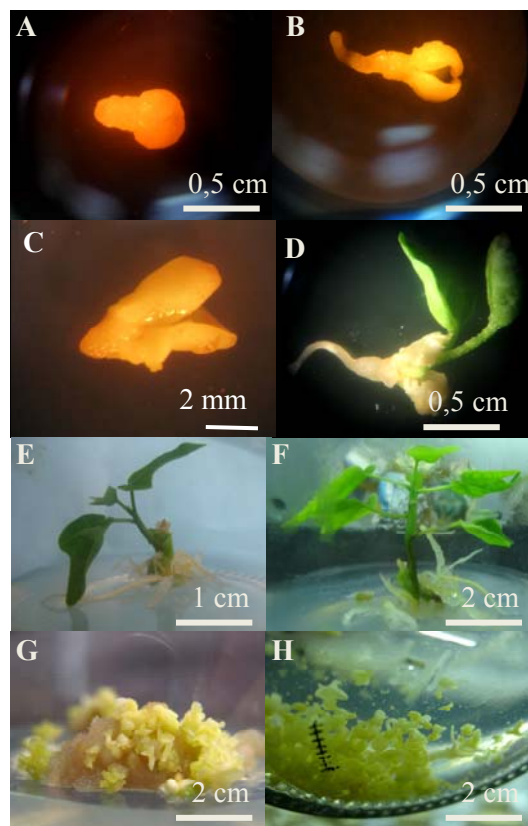
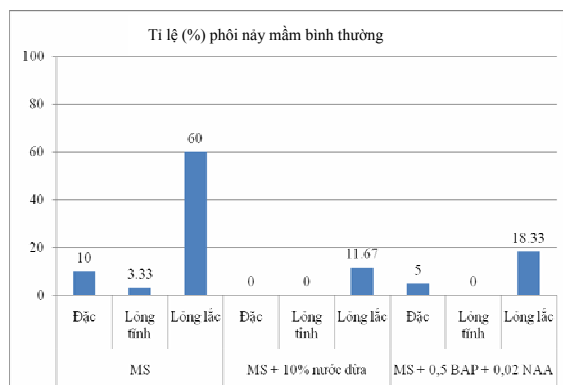
Khi so sánh về cách nuôi cấy, có thể thấy rằng nuôi cấy lỏng lắc kích thích sự nảy mầm của phôi tốt nhất, tiếp theo là nuôi cấy trên môi trường đặc và nuôi cấy lỏng tĩnh đem lại kết quả thấp nhất (bảng 2, biểu đồ 1). Việc sử dụng môi trường lỏng lắc có những ưu điểm sau: môi trường thoáng khí giúp cho sự hô hấp, tổng hợp protein và hấp thụ chất dinh dưỡng của phôi tốt hơn; môi trường lỏng

giúp gia tăng bề mặt tiếp xúc của phôi đối với các chất dinh dưỡng. Còn môi trường lỏng tĩnh thiếu sự thông thoáng.

Mặc dù phương pháp nuôi cấy lỏng lắc tỏ ra vượt trội hơn so với hai phương pháp còn lại nhưng bên cạnh đó nó vẫn có những hạn chế. Vì là môi trường lỏng nên sự lây nhiễm vi sinh vật sẽ xảy ra rất nhanh và gây hậu quả nghiêm trọng hơn so với môi trường đặc.

Nếu tiếp tục nuôi cấy trong môi trường lỏng lắc, những phôi sinh dưỡng đã nảy mầm này không phát triển thành cây con mà chúng từ từ hóa nâu và chết. Có thể là do phôi bị trương nước và bị hiện tượng thủy tinh thể do ngập quá lâu trong môi trường, ngoài ra mẫu có thể còn bị những tổn thương do quá trình lắc. Vì vậy, chúng được chuyển sang môi trường MS đặc để tiếp tục phát triển thành cây con hoàn chỉnh (hình 1E, 1F).

Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của môi trường và cách nuôi cấy lên khả năng nảy mầm của phôi sinh dưỡng



Hình 1. Một số hình ảnh về phát triển của phôi sinh dưỡng *Carica papaya* L.

A. Phôi sinh dưỡng hình cầu hình thành khi nuôi cấy mô sẹo 2 tuần trên môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l BAP và 0,1mg/l NAA;

B. Phôi sinh dưỡng trưởng thành;

C. Phôi hình thủy lôi;

D,E,F. Cây con phát triển từ phôi sinh dưỡng trên môi trường MS sau 15 ngày, 30 ngày, 45 ngày;

G. Sự phát sinh phôi sinh dưỡng từ mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l BAP và 0,1mg/l NAA;

H. Phôi sinh dưỡng nảy mầm khi nuôi cấy lỏng lắc trong môi trường MS sau 1 tuần.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường đến sự cảm ứng tạo phôi sinh dưỡng từ mô sẹo có nguồn gốc từ lá

Nghiệm thức	Môi trường	Tỉ lệ (%) mẫu mô sẹo sinh phôi	Số phôi trung bình trên một mẫu
C1	MS	93,33 ± 3,33 ^a	108,00 ± 8,08 ^b
C2	MS + 10% nước dừa	40,73 ± 3,70 ^c	35,00 ± 3,46 ^c
C3	MS + 0,1 BAP + 0,02 NAA	55,55 ± 6,41 ^b	45,00 ± 3,78 ^c
C4	MS + 0,5 BAP + 0,1 NAA	96,67 ± 3,33 ^a	218,33 ± 11,05 ^a

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường và cách nuôi cấy lên khả năng nảy mầm của phôi sinh dưỡng

Nghiệm thức	Môi trường	Cách nuôi cấy	Tỷ lệ phôi nảy mầm bình thường
E1	MS	Đặc	10,00 ± 0,00 ^c
E2	MS	Lồng tĩnh	3,33 ± 1,67 ^d
E3	MS	Lồng lắc	60,00 ± 2,89 ^a
E4	MS + 10% nước dừa	Đặc	-
E5	MS + 10% nước dừa	Lồng tĩnh	-
E6	MS + 10% nước dừa	Lồng lắc	11,67 ± 1,67 ^c
E7	MS + 0,5 BAP + 0,02 NAA	Đặc	5,00 ± 0,00 ^d
E8	MS + 0,5 BAP + 0,02 NAA	Lồng tĩnh	-
E9	MS + 0,5 BAP + 0,02 NAA	Lồng lắc	18,33 ± 1,67 ^b

4. Kết luận

Phôi sinh dưỡng bắt đầu hình thành trên bề mặt mô sẹo sau một tuần nuôi cấy. Tỉ lệ phát sinh phôi cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l BAP và 0,1mg/l NAA.

Sự quyết định cách nuôi cấy cũng rất quan trọng trong việc cảm ứng và tăng cường sự phát triển của phôi vô tính. Phôi sinh dưỡng trưởng thành tốt nhất khi nuôi cấy lồng lắc trên môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cruz GS, Canhoto JM, Abrue MAV (1990), "Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg", *Plant Sci*, (66), pp. 263-270.
2. Đỗ Tất Lợi (1999), Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nxb Y học, tr. 360-362.
3. Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995), "Morphogenic aspect of somatic embryogenesis". In: Thorpe TA (ed.) *In vitro embryogenesis in plants*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 155-203.
4. Murashige T, Skoog F (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiol Plant* (15), pp. 473-497.
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/Papain>

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 12-7-2011; ngày chấp nhận đăng: 24-10-2011)