

Tìm hiểu ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát sinh chồi từ vảy hành cây Lily Sorbonne

- Trần Thanh Thắng
- Trần Thanh Hương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 27 tháng 07 năm 2016, nhận đăng ngày 02 tháng 12 năm 2016)

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, các chất điều hòa tăng trưởng thực vật 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), picloram, 6-benzylaminopurine (BA) hay thidiazuron (TDZ) ở các nồng độ khác nhau, riêng lẻ hay phối hợp được dùng để cảm ứng sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily Sorbonne. Các biến đổi hình thái và sinh lý trong quá trình hình thành chồi được phân tích. Sự phát sinh chồi đạt cao nhất trên môi trường Murashige và Skoog (MS) có sự phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L, BA 1,5 mg/L, zeatin 0,2 mg/L và indole-3-acetic acid (IAA) 0,5 mg/L. Sự hình thành chồi có nguồn gốc từ các tế bào nhu mô cách biểu bì và lớp tế bào và trải qua các giai đoạn: hoạt hóa và

phân chia tế bào với sự hình thành các tế bào có nhân to, vách mỏng và hầu như không chứa hạt tinh bột; tạo vùng phát sinh hình thái chồi; hình thành mô phân sinh ngọn chồi và cuối cùng là chồi với các phác thể lá. Trong sự phát sinh chồi có sự gia tăng cường độ hô hấp, hoạt tính IAA và zeatin. Sự dùng các chất ức chế vận chuyển auxin, 1-naphthoxyacetic acid (1-NOA) và N-1-naphthylphthalamic acid (NPA) cho thấy vai trò của sự di chuyển hữu cực của auxin trong sự phát sinh chồi. Mối liên hệ giữa các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, cường độ hô hấp và sự phát sinh chồi được thảo luận.

Từ khóa: chất điều hòa tăng trưởng thực vật, Lily, sự di chuyển hữu cực của auxin, sự phát sinh chồi, vảy hành

MỞ ĐẦU

Lily là một trong những loài hoa có giá trị kinh tế cao được xếp thứ bảy trên thị trường hoa cắt cành thế giới và thứ hai trong các loài hoa thuộc nhóm thực vật có hành sau Tulip nhờ sự đa dạng về màu sắc, hình dạng, hương thơm và độ bền [1]. Ngoài ra, Lily còn là một loại thảo dược có giá trị do chứa nhiều hợp chất thứ cấp như acid gallic, rutin, epicatechin... [2]. Trong tự nhiên, cây Lily có thể phát triển từ hạt hoặc hành. Tuy nhiên, sự nảy mầm của hạt Lily cần thời gian khá dài (khoảng 2 tháng). Bên cạnh đó, tỉ lệ nảy mầm của hạt thấp và cây con sau khi nảy mầm tăng trưởng chậm dẫn đến thời gian cần để cây ra hoa bị kéo dài. Do đó, trong sản xuất, hành Lily

thường được sử dụng làm giống vì giúp rút ngắn thời gian để thu hoạch hoa. Hiện nay, tại Việt Nam hành giống Lily phần lớn được nhập khẩu từ nước ngoài hoặc từ việc giâm vảy hành trong điều kiện vườn ươm. Tuy nhiên, phương pháp này gặp khá nhiều khó khăn như hệ số nhân giống thấp, chất lượng cây giống không đồng đều và dễ bị thoái hóa. Bên cạnh đó, việc tạo hành giống theo phương pháp này dễ làm lây lan các bệnh do nấm và virus. Vì nhân giống trong điều kiện *in vitro* là một trong những phương pháp giúp tạo số lượng lớn cây con đồng nhất và tương đối sạch bệnh [3]. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành phân tích những thay đổi hình thái và

sinh lý trong quá trình phát sinh chồi *in vitro* từ vảy hành của cây Lily Sorbonne.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hành (củ) Lily 8 tuần tuổi (Hình 1) tăng trưởng trên môi trường Murashige và Skoog căn bản (MS) [4], có nguồn gốc từ sự nuôi cấy vảy hành Lily trồng trong vườn.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật riêng lẻ trên sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily

Các vảy hành có chiều rộng khoảng 1 cm và dài 2 cm từ các hành Lily *in vitro* 8 tuần tuổi tăng trưởng trên môi trường MS được cô lập và cấy vào trong erlen 100 mL chứa 30 mL môi trường MS căn bản hay MS có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật riêng lẻ, ở các nồng độ thay đổi như sau:

Picloram ở nồng độ 1, 2, 3 hay 4 mg/L;

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ở nồng độ 0,5; 1,0; 2,0 hay 3,0 mg/L;

6-Benzylaminopurine (BA) ở nồng độ 0,5; 1,0; 1,5 hay 2,0 mg/L; hay

Thidiazuron (TDZ) (0,05; 0,10; 0,15 hay 0,20 mg/L).

Các mẫu cấy được đặt nuôi trong tối, ở nhiệt độ 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 erlen, mỗi erlen gồm 3 mẫu cấy. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu cấy, chiều cao chồi và số vảy lá/chồi được xác định.

Khảo sát ảnh hưởng của sự phối hợp các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily

Các vảy hành có chiều rộng khoảng 1 cm và dài 2 cm từ các hành Lily *in vitro* 8 tuần tuổi tăng trưởng trên môi trường MS được cô lập và cấy vào trong erlen 100 mL chứa 30 mL môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L riêng lẻ hay phối

hợp với BA (0,5; 1,0; 1,5 hay 2,0 mg/L) hay TDZ (0,05; 0,10; 0,15 hay 0,20 mg/L). Các mẫu cấy được đặt nuôi trong tối, ở nhiệt độ 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 erlen, mỗi erlen gồm 3 mẫu cấy. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu cấy, chiều cao chồi và số vảy lá/chồi được xác định.

Quan sát các biến đổi hình thái

Các biến đổi hình thái trong quá trình phát sinh chồi từ vảy hành được quan sát trực tiếp, dùng kính hiển vi soi nổi hay kính hiển vi quang học sau sự cắt bằng tay hay máy vi phẫu. Sự cắt bằng máy vi phẫu được thực hiện như sau: Mẫu cấy được cố định trong dung dịch FAA (ethanol 70 % : formalin : acetic acid = 8:1:1 v/v). Sau 18 giờ, loại FAA bằng ethanol 70 % rồi đặt lần lượt trong một chuỗi các dung dịch ethanol (80, 85, 90, 95, 100 %) và butanol. Sau khi loại nước, mẫu được vùi trong parafin tan ở 56 °C (mã số 1.07337.1000, Merck) và cắt dọc thành các lát mỏng 7 µm bằng máy vi phẫu (Rotary microtome, Microm HM340E). Các lát mỏng parafin mang mẫu được dán trên lam nhờ dung dịch gelatin 3 %. Sự loại parafin được thực hiện nhờ một chuỗi các dung dịch methylcyclohexan, ethanol (100, 95, 85, 70, 50, 30) và nước cất [5]. Cuối cùng, mẫu được nhuộm bằng phẩm nhuộm hai màu đỏ carmin – xanh iod và quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Đo cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g}$ trọng lượng tươi/giờ) của mẫu cấy được xác định bằng điện cực oxygen dựa trên sự giảm tỉ lệ oxygen trong buồng đo (LeafLab2, Hansetech) theo thời gian, ở nhiệt độ 22 °C, trong tối. Kết quả là giá trị trung bình của 5 lần lặp lại.

Ly trích và đo hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật auxin (indole-3-acetic acid) (IAA), cytokinin (zeatin),

gibberellin và abscisic acid (ABA) có trong mẫu cây được ly trích và cô lập bằng cách dùng các dung môi thích hợp và thực hiện sắc ký trên bản mỏng silicagel 60 F254 (mã số 1.05554, Merck), ở nhiệt độ 29 °C với dung môi di chuyển chloroform : methanol : acetic acid (80:15:5 v/v). Vị trí của các hormone tăng trưởng thực vật được phát hiện nhờ quan sát trực tiếp dưới tia ultraviolet (UV). Hoạt tính các hormone tăng trưởng thực vật được đo bằng sinh trắc nghiệm: diệp tiêu lúa (*Oryza sativa* L.) cho auxin và acid abscisic, từ diệp dưa leo (*Cucumis sativus* L.) cho cytokinin và cây mầm xà lách (*Lactuca sativa* L.) cho gibberellin [6, 7].

Khảo sát ảnh hưởng của chất ức chế sự vận chuyển auxin trên sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily

Các vảy hành có chiều rộng khoảng 1 cm và dài 2 cm từ các hành Lily *in vitro* 8 tuần tuổi tăng trưởng trên môi trường MS được cô lập và cấy vào trong erlen 100 mL chứa 30 mL môi trường MS có sự phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L hay MS có sự phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L, BA 1,5 mg/L và N-1-Naphthylphthalamic acid (NPA) 3,45 mg/L (10 µM) (chất ức chế sự vận chuyển auxin ra khỏi tế bào) hay 1-Naphthoxyacetic acid (1-NOA) 4,95 mg/L (10 µM) (chất ức chế sự vận chuyển auxin vào trong và ra khỏi tế bào). Các mẫu cây được đặt nuôi trong tối, ở nhiệt độ 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 erlen, mỗi erlen gồm 3 mẫu cây. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu cây, chiều cao chồi và số vảy lá/chồi được xác định.

Áp dụng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily

Các vảy hành có chiều rộng khoảng 1 cm và dài 2 cm từ các hành Lily *in vitro* 8 tuần tuổi tăng

trưởng trên môi trường MS được cô lập và cấy vào trong erlen 100 mL chứa 30 mL môi trường MS có phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L hay MS có phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L, BA 1,5 mg/L zeatin 0,2 mg/L và IAA 0,2 mg/L. Các mẫu cây được đặt nuôi trong tối, ở nhiệt độ 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 erlen, mỗi erlen gồm 3 mẫu cây. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu cây, chiều cao chồi, chiều rộng chồi và số vảy lá/chồi được xác định.

Xử lý thống kê

Kết quả thí nghiệm được phân tích bằng chương trình thống kê SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) dùng cho Window phiên bản 15.0. Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 95 % của giá trị được thể hiện bởi các mẫu tự hoặc chữ số kèm theo.

KẾT QUẢ

Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật riêng lẻ trên sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily

Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung auxin hay cytokinin riêng lẻ ở các nồng độ thay đổi, tỉ lệ mẫu tạo chồi đạt cao nhất ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường có bổ sung 2,4-D 1 mg/L. Số chồi/mẫu cây đạt cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA 1,5 hay 2 mg/L. Số vảy lá/chồi đạt cao nhất ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường có bổ sung BA 1 hay 1,5 mg/L. Chiều cao chồi đạt cao nhất ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường có bổ sung TDZ ở nồng độ 0,1; 0,15 hay 0,2 mg/L. Trên môi trường có bổ sung picloram, bên cạnh sự phát sinh chồi có sự hình thành mô sẹo, nồng độ picloram càng cao sự hình thành mô sẹo càng nhiều (Hình 2A-E, Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật ở các nồng độ thay đổi trên sự phát sinh chồi từ vảy hành *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Chất điều hòa tăng trưởng thực vật	Nồng độ (mg/L)	Tỉ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu cấy	Chiều cao chồi (mm)	Số vảy lá/chồi	Sự hình thành mô sẹo
Đối chứng (MS)		22,22 ± 2,22 ^f	1,33 ± 0,33 ^{cd}	5,50 ± 0,29 ^e	2,67 ± 0,33 ^e	
2,4-D	0,50	51,11 ± 2,22 ^d	1,67 ± 0,33 ^{bcd}	5,67 ± 0,17 ^e	2,33 ± 0,33 ^e	
	1,00	75,55 ± 2,22 ^a	1,53 ± 0,26 ^{bcd}	7,50 ± 0,29 ^{cd}	3,00 ± 0,00 ^{de}	
	2,00	64,45 ± 2,22 ^{bc}	1,83 ± 0,17 ^{bc}	7,67 ± 0,33 ^c	3,67 ± 0,33 ^d	
	3,00	48,89 ± 2,22 ^d	1,33 ± 0,33 ^{cd}	5,67 ± 0,33 ^e	3,00 ± 0,58 ^{de}	
Picloram	1,00	15,50 ± 1,50 ^g	1,12 ± 0,12 ^d	7,67 ± 0,33 ^{cd}	2,53 ± 0,67 ^e	+
	2,00	9,53 ± 1,84 ^h	1,11 ± 0,26 ^d	6,67 ± 0,33 ^d	2,53 ± 0,33 ^e	++
	3,00	2,20 ± 1,50 ⁱ	1,00 ± 0,04 ^d	5,67 ± 0,33 ^e	2,33 ± 0,33 ^e	+++
	4,00	-	-	-	-	++++
BA	0,50	37,78 ± 2,22 ^e	1,30 ± 0,15 ^{cd}	4,50 ± 0,29 ^f	6,67 ± 0,33 ^c	
	1,00	48,89 ± 2,22 ^d	1,88 ± 0,19 ^{bc}	6,83 ± 0,17 ^d	11,67 ± 0,33 ^a	
	1,50	55,56 ± 4,44 ^{cd}	3,33 ± 0,17 ^a	7,00 ± 0,00 ^{cd}	12,33 ± 0,33 ^a	
	2,00	64,45 ± 2,22 ^{bc}	3,76 ± 0,15 ^a	7,17 ± 0,17 ^{cd}	10,00 ± 0,00 ^b	
TDZ	0,05	26,67 ± 0,00 ^t	1,17 ± 0,08 ^{cd}	8,50 ± 0,29 ^b	2,67 ± 0,33 ^e	
	0,10	53,33 ± 6,67 ^c	1,48 ± 0,26 ^{cd}	9,50 ± 0,29 ^a	2,67 ± 0,33 ^e	
	0,15	55,55 ± 2,22 ^{cd}	1,31 ± 0,03 ^{cd}	9,83 ± 0,17 ^a	2,67 ± 0,33 ^e	
	0,20	66,67 ± 0,00 ^b	1,13 ± 0,07 ^d	9,33 ± 0,33 ^a	3,00 ± 0,58 ^e	

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

(-), Không có sự phát sinh chồi; (+), Mẫu cấy có sự hình thành mô sẹo.

Ảnh hưởng của sự phối hợp các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily

Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có sự phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA hay TDZ ở các nồng độ thay đổi, tỉ lệ mẫu tạo chồi đạt cao nhất trên môi trường có bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L. Số chồi/mẫu cấy đạt cao

nhất trên môi trường có bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA ở nồng độ 1,5 mg/L hay 2 mg/L. Sự phối hợp bổ sung 2,4-D với BA hay TDZ ở các nồng độ thay đổi không giúp gia tăng chiều cao chồi. Sự bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau (0,5-2,0 mg/L) đều giúp các chồi gia tăng số vảy lá (Hình 2F, Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của sự phối hợp 2,4-D và BA hay TDZ ở các nồng độ thay đổi trên sự phát sinh chồi từ vảy hành *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Chất điều hòa tăng trưởng thực vật	Nồng độ (mg/L)	Tỉ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu cấy	Chiều cao chồi (mm)	Số vảy lá/chồi
Đối chứng (MS với 2,4-D 1 mg/L)		75,55 ± 2,22 ^b	1,53 ± 0,26 ^d	7,50 ± 0,29 ^a	3,00 ± 0,00 ^c
BA	0,50	71,11 ± 2,22 ^b	2,33 ± 0,17 ^c	5,17 ± 0,17 ^{cd}	12,67 ± 0,33 ^a
	1,00	68,89 ± 2,22 ^b	3,00 ± 0,29 ^b	4,23 ± 0,15 ^e	13,00 ± 0,00 ^a
	1,50	84,45 ± 2,22 ^a	4,43 ± 0,07 ^a	4,10 ± 0,06 ^e	13,33 ± 0,33 ^a
	2,00	73,33 ± 0,00 ^b	4,53 ± 0,17 ^a	4,07 ± 0,15 ^e	13,33 ± 0,33 ^a
TDZ	0,05	55,56 ± 2,22 ^d	1,17 ± 0,17 ^d	5,73 ± 0,15 ^b	3,33 ± 0,33 ^c
	0,10	71,11 ± 2,22 ^b	1,23 ± 0,15 ^d	5,13 ± 0,07 ^d	6,00 ± 0,58 ^b
	0,15	62,22 ± 2,22 ^c	1,17 ± 0,17 ^d	4,50 ± 0,29 ^e	3,67 ± 0,33 ^c
	0,20	57,78 ± 2,22 ^{cd}	1,07 ± 0,17 ^d	4,53 ± 0,29 ^e	3,00 ± 0,00 ^c

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Sự phát sinh hình thái chồi

Vào thời điểm bắt đầu nuôi cấy, các tế bào nhu mô của vảy hành có sự sắp xếp tương đối đồng đều và chứa nhiều hạt tinh bột (Hình 3). Sau 5 ngày nuôi cấy, một số tế bào nhu mô dưới biểu bì được hoạt hóa và phân chia. Các tế bào đang ở trạng thái phân chia có nhân to và hầu như không chứa các hạt tinh bột (Hình 4). Sau 10 ngày nuôi cấy, vùng phát sinh hình thái chồi xuất hiện với sự hiện diện của các tế bào có kích thước nhỏ, nhân to và không chứa hạt tinh bột (Hình 5). Sau 17 ngày nuôi cấy, vòm mô phân

sinh ngọn chồi đang trong giai đoạn phân chia hình thành phác thể lá đầu tiên hình thành (Hình 6). Sau 20 ngày nuôi cấy, xuất hiện vòm mô phân sinh ngọn chồi với hai phác thể lá (Hình 7) và sau 24 ngày nuôi cấy, là sự xuất hiện của chồi hoàn chỉnh (Hình 8).

Cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường MS có sự phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L cao hơn so với mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường MS không hay có bổ sung 2,4-D hay BA riêng lẻ (Bảng 3).

Bảng 3. Cường độ hô hấp của mẫu cấy phát sinh chồi trên các môi trường khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật xử lý	Cường độ hô hấp ($\mu\text{L O}_2/\text{g}$ trọng lượng tươi/giờ)
Đối chứng (MS)	$40,48 \pm 7,70^b$
2,4-D 1 mg/L	$45,01 \pm 7,12^b$
BA 1,5 mg/L	$50,17 \pm 2,17^b$
2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L	$57,88 \pm 3,46^a$

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Hoạt tính IAA và gibberellin đạt cao nhất ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L. Hoạt tính zeatin đạt cao nhất ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường MS có bổ sung BA 1,5 mg/L, thấp hơn ở mẫu cấy tăng

trưởng trên môi trường MS có sự phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L với BA 1,5 mg/L và thấp nhất ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường MS hay MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L. Hoạt tính ABA đạt cao nhất ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường đối chứng MS (Bảng 4).

Bảng 4. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật của mẫu cấy phát sinh chồi trên các môi trường khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật xử lý	Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh (mg/L)			
	IAA	Zeatin	Gibberellin	ABA
Đối chứng (MS)	$0,39 \pm 0,05^b$	$0,15 \pm 0,02^c$	$0,17 \pm 0,02^b$	$0,61 \pm 0,01^a$
2,4-D 1 mg/L	$0,84 \pm 0,01^a$	$0,15 \pm 0,01^c$	$0,37 \pm 0,08^a$	$0,19 \pm 0,02^b$
BA 1,5 mg/L	$0,41 \pm 0,02^b$	$0,52 \pm 0,03^a$	$0,15 \pm 0,04^b$	$0,16 \pm 0,03^b$
2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L	$0,32 \pm 0,03^b$	$0,33 \pm 0,01^b$	$0,17 \pm 0,02^b$	$0,14 \pm 0,03^b$

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của các chất ức chế sự vận chuyển auxin trên sự phát sinh chồi từ vảy hành *in vitro*

Sau 4 tuần nuôi cấy, các xử lý với NPA 3,45 mg/L hay 1-NOA 4,95 mg/L (các chất ức chế sự vận chuyển của auxin) đều làm giảm khả năng

tạo chồi của mẫu cấy. Tỷ lệ mẫu cấy tạo chồi giảm mạnh hơn khi xử lý với 1-NOA (Hình 2G-H, Bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của các chất ức chế sự vận chuyển auxin trên sự phát sinh chồi từ vảy hành *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Xử lý	Tỉ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu cấy	Chiều cao chồi (mm)	Số vảy lá/chồi
Đối chứng *	84,45 ± 2,22 ^a	4,43 ± 0,07 ^a	4,10 ± 0,06 ^a	13,33 ± 0,33 ^a
NPA 3,45 mg/L	66,67 ± 0,00 ^b	2,17 ± 0,17 ^b	3,67 ± 1,86 ^{ab}	12,67 ± 0,67 ^a
1-NOA 4,95 mg/L	33,33 ± 19,25 ^c	1,67 ± 0,33 ^b	3,33 ± 0,33 ^b	11,67 ± 1,93 ^a

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

(*), MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L.

Áp dụng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát sinh chồi từ vảy hành cây Lily *in vitro*

Sự phối hợp bổ sung zeatin 0,2 mg/L và IAA 0,5 mg/L vào môi trường 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L giúp gia tăng tỉ lệ mẫu tạo chồi và số chồi/mẫu cấy. Chiều rộng và chiều cao chồi, số vảy lá/chồi không có sự thay đổi (Hình 2I, Bảng 6).

Bảng 6. Áp dụng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát sinh chồi từ vảy hành *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Chỉ tiêu theo dõi	Chất điều hòa tăng trưởng thực vật áp dụng (mg/L)		T-Test
	Đối chứng *	Zeatin 0,2 mg/L và IAA 0,5 mg/L	
Tỉ lệ mẫu tạo chồi	84,45 ± 2,22	100,00 ± 0,00	+
Số chồi/mẫu cấy	4,43 ± 0,07	5,17 ± 0,17	+
Chiều rộng chồi (mm)	3,67 ± 0,67	4,77 ± 0,33	-
Chiều cao chồi (mm)	4,10 ± 0,06	4,33 ± 0,33	-
Số vảy lá/chồi	13,33 ± 0,33	13,67 ± 0,67	-

(+), Các số trung bình trong cột khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ (T-Test).

(*), MS với 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L.

THẢO LUẬN

Vào thời điểm trước khi nuôi cấy, các tế bào nhu mô dưới biểu bì của vảy hành Lily có sự sắp xếp tương đối đồng đều. Tuy nhiên, vì đóng vai trò là mô dự trữ, các tế bào này chứa rất nhiều hạt tinh bột (Hình 3). Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường có bổ sung phối hợp 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L, các tế bào nhu mô được hoạt hóa và phân chia để hình thành vùng phát sinh hình thái (Hình 4) với sự hiện diện của các tế bào có nhân to, vách mỏng và hạt tinh bột nhỏ (hay hầu như không còn). Các đặc điểm hình thái này cũng được tìm thấy trong tế bào mô phân sinh ngọn chồi có khả năng phát sinh cơ quan [8] hay các tế bào dịch treo có khả năng phát sinh phôi ở chuối Cau Mãn [9]. Các hạt tinh bột nhỏ thường được xem như dấu hiệu của sự dùng tinh bột dự trữ cho các phản ứng biến dưỡng của tế bào trong sự phân hóa tế bào [10]. Chính vì vậy, sau 10 ngày

nuôi cấy, vùng phát sinh hình thái chồi hình thành gồm một nhóm tế bào nhỏ có nhân to, tế bào chất đậm đặc và không còn chứa hạt tinh bột (Hình 5). Sau đó, vùng phát sinh hình thái này tiếp tục phát triển để hình thành mô phân sinh ngọn chồi với sự hiện diện của sơ khởi lá đầu tiên vào ngày thứ 17 (Hình 6), mô phân sinh ngọn chồi với hai phác thể lá vào ngày 20 (Hình 7) và chồi vào ngày 24 (Hình 8). Như vậy, tương tự như sự phát sinh chồi từ lá ở một số đối tượng thực vật hay từ mô phân sinh ngọn chồi ở chuối, sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily trải qua các giai đoạn: hoạt hóa và phân chia tế bào, tạo vùng phát sinh hình thái chồi, hình thành mô phân sinh ngọn chồi và cuối cùng là chồi với các phác thể lá.

Ở cùng nồng độ, khả năng cảm ứng tạo chồi của 2,4-D mạnh hơn so với picloram (Hình 2B-C, Bảng 1). Theo Bukowska (2006), 2,4-D và

picloram đều có vai trò giúp tế bào đi vào con đường phân phân hóa [11]. Sau đó, 2,4-D giúp tế bào tiếp tục đi vào con đường tái phân hóa trở về trạng thái mô phân sinh cấp hai hoạt động và phân hóa thành chồi. Trong khi đó, picloram là một auxin mạnh, thường được sử dụng như một chất cảm ứng có tác dụng khử phân hóa tế bào trong quá trình tạo mô sẹo hay phôi thể hệ. Có lẽ, chính tác động quá mạnh của picloram trên sự phân chia tế bào đã cản tế bào đi vào con đường tái phân hóa để hình thành mô phân sinh cấp hai hoạt động, do đó làm giảm khả năng phát sinh chồi. Ảnh hưởng của nồng độ auxin trên sự phát sinh chồi thể hiện rõ khi tăng nồng độ 2,4-D từ 1 đến 3 mg/L. Tỷ lệ mẫu tạo chồi giảm dần theo sự gia tăng nồng độ 2,4-D (Bảng 1). Theo Bùi Trang Việt (2000), sự gia tăng nồng độ 2,4-D sẽ dẫn đến sự cạnh tranh thể nhận giữa các phân tử auxin làm hình thành các phức hợp bất hoạt auxin mang hai thể nhận [10]. Do đó, sự truyền tín hiệu nội bào không xảy ra. Bên cạnh việc dùng auxin riêng lẻ, TDZ (một chất điều hòa tăng trưởng thực vật vừa có hoạt tính auxin vừa có hoạt tính cytokinin) cũng thường được sử dụng và cho khả năng tạo chồi rất hiệu quả ở các giống trồng Lily như *L. oxypetalum*, *L. longforium*,... [12, 13]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, với giống trồng Sorbonne, việc xử lý TDZ không đạt hiệu quả cảm ứng cao trong quá trình tạo chồi như 2,4-D hay BA (Bảng 1). Điều này có thể do sự khác nhau về kiểu gene. Ảnh hưởng của BA trên sự phát sinh chồi cũng đã được ghi nhận ở nhiều đối tượng thực vật [8], [10]. Trong sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily, sự bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy không những giúp mẫu cây gia tăng số chồi mà còn gia tăng số vảy lá của chồi. Sự phát sinh chồi là một hoạt động sinh lý mạnh của mẫu cây đòi hỏi nguồn năng lượng lớn để cung cấp cho hoạt động phân chia của tế bào. Cường độ hô hấp của mẫu cây vảy hành tăng trưởng trên môi trường có sự phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L gia tăng mạnh hơn so với mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có bổ sung 2,4-D

hay BA riêng lẻ (Bảng 3). Điều này dẫn đến khả năng phát sinh chồi ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có sự phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L cao hơn so với các mẫu cây tăng trưởng trên các môi trường còn lại (Bảng 2). Ngoài việc cung cấp năng lượng, hoạt động hô hấp của tế bào còn cung cấp các sản phẩm biến dưỡng và các tiền chất cho quá trình sinh tổng hợp các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh. Trong trường hợp vảy hành Lily, sự tăng mạnh hoạt tính IAA hay zeatin trong mẫu cây vảy hành không phải là yếu tố giúp cho sự phát sinh chồi xảy ra mạnh nhất, mà chính hiện diện của IAA và zeatin với nồng độ thích hợp mới là yếu tố quyết định (Bảng 5). Thật vậy, việc xử lý phối hợp IAA 0,5 mg/L và zeatin 0,2 mg/L vào môi trường nuôi cấy đã giúp gia tăng tỷ lệ mẫu tạo chồi và số chồi/mẫu cây (Bảng 6). Bên cạnh tác động phối hợp với cytokinin, sự di chuyển hữu cực của auxin cũng có vai trò rất quan trọng trong sự tạo chồi. Sự dùng 1-NOA và NPA, các chất ức chế sự di chuyển của auxin, đã chứng minh tác động của sự di chuyển hữu cực của auxin trong sự tạo chồi. Khả năng tạo chồi của mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có sự hiện diện của 1-NOA (4,95 mg/L) hay NPA (3,45 mg/L) đều giảm mạnh so với đối chứng. Theo Balzan và cộng sự (2014), sự vận chuyển hữu cực của auxin được điều hòa bởi hoạt động của các phức hợp protein đóng vai trò là thể mang auxin vào trong tế bào (AUX, LAX và ABCB) và ra khỏi tế bào (PIN và ABCB) [14]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy NPA ức chế sự hoạt động của các thể mang auxin ra khỏi tế bào trong khi 1-NOA vừa ức chế hoạt động của thể mang auxin vào trong tế bào vừa có khả năng ức chế hoạt động của thể mang auxin ra khỏi tế bào [15]. Điều này giải thích tại sao khả năng phát sinh chồi của mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có sự hiện diện của 1-NOA thấp hơn so với mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có NPA (Hình G-H, Bảng 5). Cùng với tác động phối hợp của zeatin và auxin, sự giảm hoạt tính ABA trong mẫu cây

cũng góp phần giúp gia tăng sự tạo chồi (Hình 2F-I, Hình 4-6). IAA và zeatin có vai trò cảm ứng tạo chồi trong khi ABA thì ngược lại, cản quá trình này [10].

KẾT LUẬN

Sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily *in vitro* có nguồn gốc từ các tế bào nhu mô cách biểu bì vài lớp tế bào, trải qua các giai đoạn: hoạt hóa và phân chia tế bào với sự hình thành các tế bào có nhân to, vách mỏng và hầu như không chứa hạt tinh bột; tạo vùng phát sinh hình thái chồi; hình

thành mô phân sinh ngọn chồi và cuối cùng là chồi với các phác thể lá. Môi trường MS có sự phối hợp bổ sung 2,4-D 1 mg/L, BA 1,5 mg/L, zeatin 0,2 mg/L và IAA 0,5 mg/L thích hợp cho sự phát triển chồi từ vảy hành Lily. Trong sự phát sinh chồi có sự gia tăng cường độ hô hấp, hoạt tính IAA và zeatin. Sự dùng 1-NOA (4,95 mg/L) hay NPA (3,45 mg/L) cho thấy vai trò của sự di chuyển hữu cực của auxin trong sự phát sinh chồi.

Role of plant growth regulators on shoot formation from bulb scales of Lily Sorbonne

- Tran Thanh Thang
- Tran Thanh Huong

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

In this study, plant growth regulators included 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), picloram, 6-benzylaminopurine (BA) and thidiazuron (TDZ), at different concentrations were used individually or in combination to induce adventitious shoots from bulb scales of Lily Sorbonne. Morphological and physiological changes in shoot formation from bulb scales were analysed. The maximum number of shoots per explant were obtained on Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 2,4-D 1 mg/L, BA 1,5 mg/L, zeatin 0,2 mg/L and indole-3-acetic acid (IAA) 0,5 mg/L. The adventitious shoots

were derived from parenchymal cells, which placed under epidermis cells. This process included the following stages: activation of cell division with large nucleus, thin-walled and without starch granules; initiating of meristematic region; formation of shoot primordium and shoot with leaves. Use of 1-naphthylphthalamic acid (1-NOA) and N-1-naphthoxyacetic acid (NPA), auxin transport inhibitors, showed the role of polar auxin transport in shoot formation. The correlation of plant hormone, respiration rate and shoot formation from bulb scales was discussed.

Key words: adventitious shoots, bulb scales, Lily, plant growth regulators, polar auxin transport

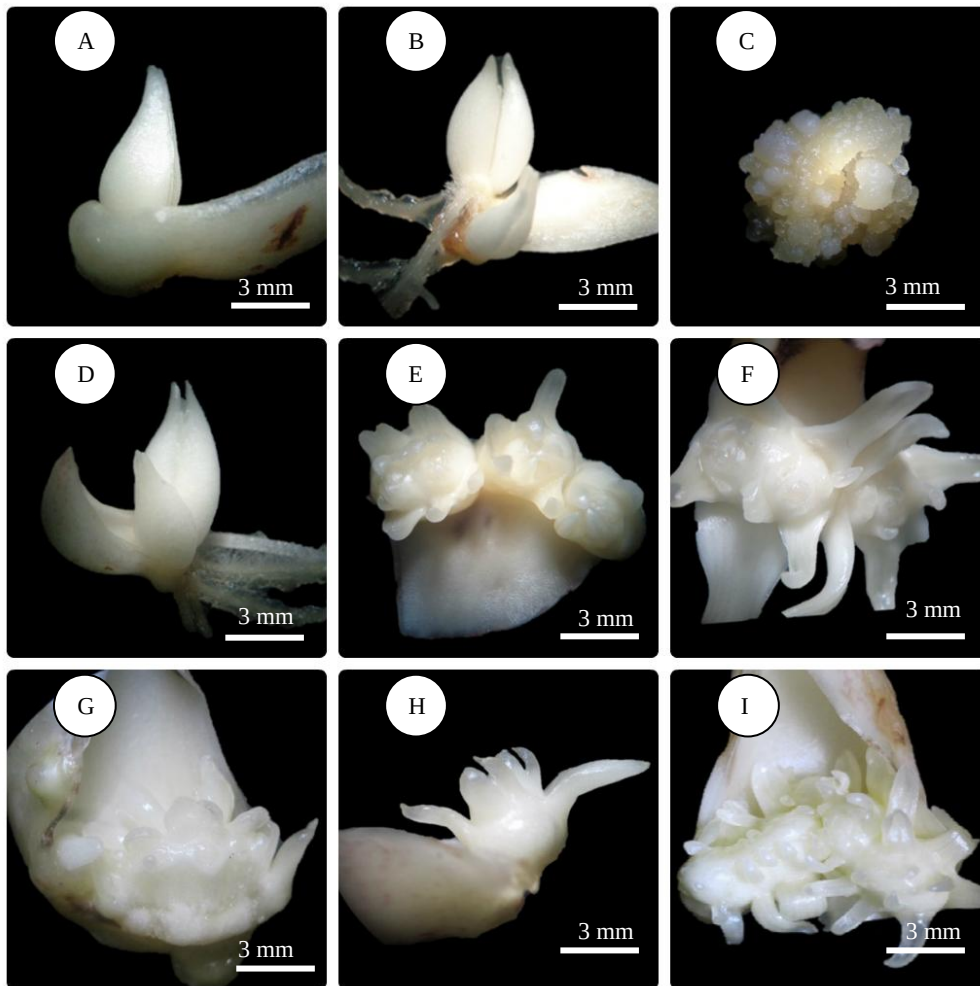
TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A.V. Varshney, P.S. Dhawan, Srivastava, A protocol for *in vitro* mass propagation of asiatic hybrids of Lily through liquid stationary culture, *In Vitro Cell Develop*, 36, 383–391 (2000).
- [2]. J. Lei, Z. Yanlong, Y. Linmao, G. Yulong, N. Lixin, Phenolic compounds and antioxidant activity of bulb extracts of xix *Lilium* species native to China, *Molecules*, 17, 9361–9378 (2012).

- [3]. T.T. Vân, V.T. Đông, Cơ sở khoa học và kỹ thuật sản xuất hoa Lily, Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội (2005).
- [4]. T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiol*, 15, 3, 473–497 (1962).
- [5]. K.S. Lee, F.J. Zapata-Arias, H. Brunner, R. Afza, Histology of somatic embryoinitiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* sp., *Tissue and Organ Culture*, 51, 1–8 (1997).
- [6]. H. Meidner, Class experiments in Plant Physiology, George Allen and Unwin, London (1984).
- [7]. B.T. 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 ĐHTH TP HCM*, 1, 155–165 (1992).
- [8]. T.H. Tran, T.V. Bui, T.Y. Feng, Role of plant growth regulators on shoot development of shoot apical meristems of banana genotypes. *Acta Hort*, 1114, 211–218 (2016a).
- [9]. T.H. Tran, T.V. Bui, T.Y. Feng, The role of auxin and cytokinin on somatic embryogenesis from cell suspension cultures of the banana cultivar 'Cau Man', *Acta Hort*, 1114, 219–226 (2016b).
- [10]. B.T. Việt, Sinh lý thực vật đại cương, phần II: Phát triển, Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh (2000).
- [11]. B. Bukowska, Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid – molecular mechanisms, *Polish J. of Environ. Stud.*, 15, 3, 365–374 (2006).
- [12]. L. Bacchetta, P.C. Remotti, C. Bernardini, F. Saccardo, Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 74, 37–44 (2003).
- [13]. X. LingFei, M. FengWang, L. Dong, Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou Lily (*Lilium davidii* var. unicolor), *Sci Hortic*, 119, 458–461 (2009).
- [14]. S. Balzan, G.S. Johal, N. Carraro, The role of auxin transporters in monocots development, *Frontiers in plant science*, 5, 380–393 (2014).
- [15]. P. Klíma, M. Laňková, E. Zažímalová, Inhibitors of plant hormone transport, *Protoplasma*, 253, 6, 1–14 (2015).

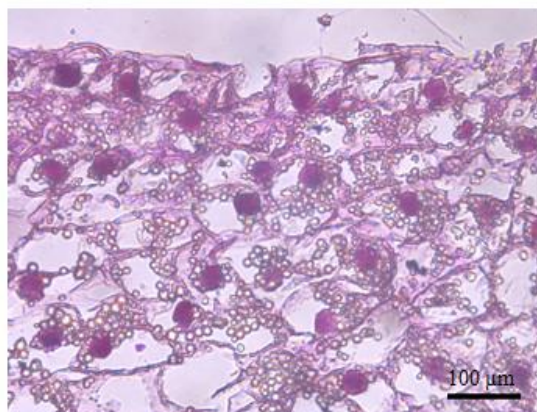


Hình 1. Hành Lily *in vitro* 8 tuần tuổi tăng trưởng trên môi trường MS

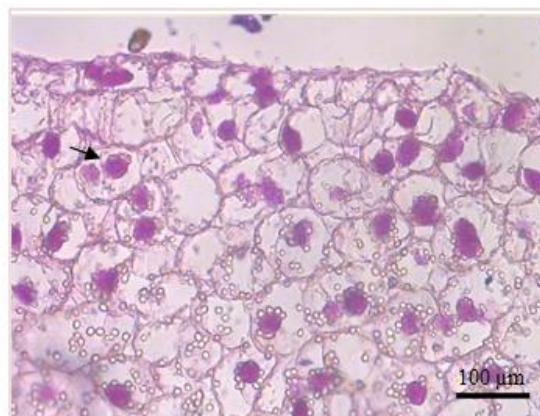


Hình 2. Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát sinh chồi từ vảy hành Lily *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy trong điều kiện tối

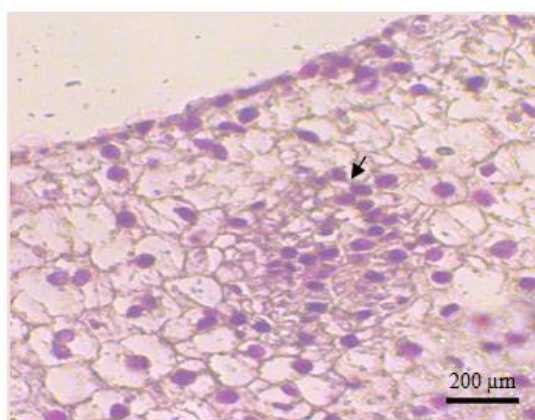
- | | |
|-----------------------------|--|
| (A), MS | (F), MS với 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L |
| (B), MS với 2,4-D 1 mg/L | (G), MS với 2,4-D 1 mg/L, BA 1,5 mg/L và NPA 3,45 mg/L |
| (C), MS với picloram 4 mg/L | (H), MS với 2,4-D 1 mg/L, BA 1,5 mg/L và NOA 4,95 mg/L |
| (D), MS với TDZ 0,1 mg/L | (I), MS với 2,4-D 1 mg/L, BA 1,5 mg/L, zeatin 0,2 mg/L và IAA 0,5 mg/L |
| (E), MS với BA 1,5 mg/L | |



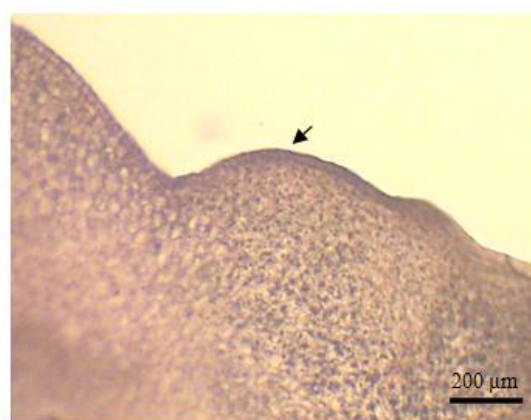
Hình 3. Lát cắt ngang qua vây hành *in vitro* (mẫu cấy ngày 0) với sự hiện diện của các tế bào nhu mô chứa nhiều hạt tinh bột



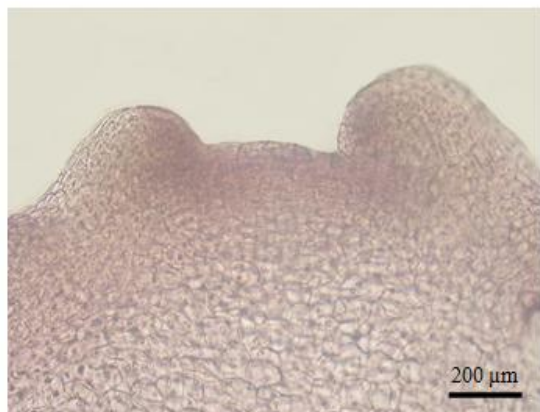
Hình 4. Lát cắt ngang qua mẫu cấy đang tăng trưởng trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L sau 5 ngày nuôi cấy. Mũi tên: tế bào đang phân chia chuẩn bị cho sự hình thành vùng phát sinh hình thái



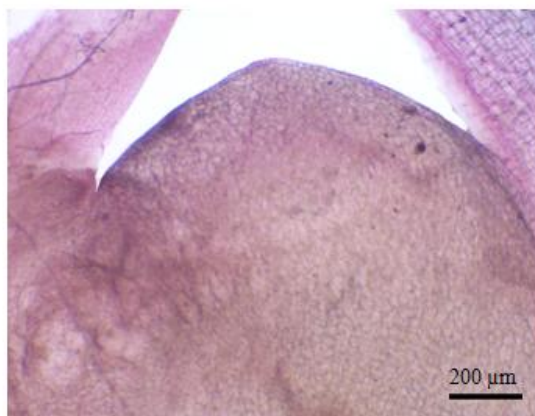
Hình 5. Sự hình thành vùng phát sinh hình thái (mũi tên) sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L và BA 1,5 mg/L



Hình 6. Vòm mô phân sinh ngọn chồi (mũi tên) đang trong giai đoạn chuẩn bị hình thành phác thể lá đầu tiên sau 17 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1mg/L và BA 1,5 mg/L



Hình 7. Vòm mô phân sinh ngọn chồi với hai phác thể lá sau 20 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1mg/L và BA 1,5 mg/L



Hình 8. Chồi hoàn chỉnh sau 24 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1mg/L và BA 1,5 mg/L