

ẢNH HƯỞNG CỦA KINETIN VÀ NGUỒN CARBOHYDRATES LÊN KHẢ NĂNG HÌNH THÀNH PHÔI VÔ TÍNH CÂY CỘC RÀO (*JATROPHA CURCAS* L.)

Đỗ Đăng Giáp¹, Nguyễn Thị Kim Loan¹, Nguyễn Thị Ngọc Anh¹, Nguyễn Thị Huyền Trang¹, Trần Trọng Tuấn¹, Thái Xuân Du¹, Nguyễn Đình Lâm², Dương Tấn Nhựt³

¹Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam

³Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

MỞ ĐẦU

Cây Cọc rào thuộc họ Thầu dầu (*Euphorbiaceae*), có tên khoa học là *Jatropha curcas* L. (JCL) hay còn được gọi là cây Dầu mè (tên tiếng Anh: Physic nut). Cây có nguồn gốc từ Mexico, Trung Mỹ, sau đó được lan truyền sang châu Phi, châu Á. Khoảng 10 năm trở lại đây, nhiều nước trên thế giới trong đó có các nước trong khu vực châu Á, đặc biệt Việt Nam là nước quan tâm nghiên cứu và phát triển cây Cọc rào để sản xuất biodiesel. Vì nhân giống cây *J. curcas* đã được nghiên cứu nhiều trên thế giới, cây con được tái sinh từ nuôi cấy các bộ phận khác nhau như: đỉnh sinh trưởng, chồi nách, chồi đỉnh, đốt thân, trụ dưới lá mầm, cuống lá, lá (*Sujatha et al.*, 2003; *Sardana et al.*, 1998; *Đỗ Đăng Giáp et al.*, 2012). Vì nhân giống thông qua con đường nuôi cấy phôi vô tính được thực hiện thành công trên cây Cọc rào, *Sardana và cộng sự* (2000), đã thực hiện thành công tái sinh cây từ phôi vô tính cây cọc rào. Năm 2007, *Ja và cộng sự* đã nuôi cấy thành công mô sẹo có khả năng phát sinh phôi được thu nhận bằng cách nuôi cấy mẫu lá. Năm 2012, *Đỗ Đăng Giáp và cộng sự* cũng đã nuôi cấy thành công phôi vô tính cây cọc rào thông qua mô sẹo.

Đối với nuôi cấy phôi, các chất kích thích sinh trưởng như auxin, cytokinin, GA₃ thường được dùng nhiều trong nuôi cấy phôi. Auxin thường dùng ở nồng độ thấp. Kinetin có vai trò đặc biệt cho sự phát triển của phôi. Như đã biết, đường cũng đóng vai trò rất quan trọng. Việc bổ sung nguồn carbohydrates bên ngoài vào môi trường làm tăng phân chia tế bào và tái sinh các chồi xanh. Nguồn carbohydrate thông dụng được sử dụng phổ biến nhất là sucrose, ngoài ra một số nghiên cứu còn sử dụng đường glucose và fructose trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Trong nhiều trường hợp thì đường sucrose cho kết quả tốt hơn các đường khác. Theo đó, trong hướng nghiên cứu này, chúng tôi muốn tăng cường khả năng sinh phôi vô tính và cải tiến khả năng phát triển phôi vô tính từ mô sẹo trên cây cọc rào bằng những ảnh hưởng của Kinetin và nguồn carbohydrates.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Sử dụng mẫu lá cây Cọc rào được trồng tại vườn ươm Viện Sinh học Nhiệt đới làm vật liệu nuôi cấy tạo phôi. Các cặp lá thứ hai từ đỉnh sau khi thu nhận được khử trùng sơ bộ bằng cách đặt dưới vòi nước chảy (30 phút), dùng xà phòng loãng rửa sơ bộ mặt lá, sau đó ngâm lá trong cồn 70° (30 giây) rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng (3-4 lần). Mẫu lá được chuyển vào túi cây và lặt khử trùng với dung dịch Javel có bổ sung 2-3 giọt Tween-20 (10 phút), sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng (4-5 lần). Các lá sau khi được khử trùng sẽ được cắt nhỏ theo kỹ thuật lớp mỏng tế bào. Mỗi mảnh nhỏ lá có kích thước 0,5 mm x 10 mm được cấy vào môi trường cơ bản MS (Đỗ Đăng Giáp và cộng sự 2012) có bổ sung 1,0 mg.l⁻¹ kinetin và 1,5 mg.l⁻¹ 2,4-D. Sau 4 tuần nuôi cấy trong điều kiện tối và sáng thì các mô sẹo có khả năng phát sinh phôi được hình thành sẽ được sử dụng trong nghiên cứu của bài báo này.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của kinetin lên sự hình thành phôi soma từ mô sẹo có khả năng sinh phôi

Các mô sẹo có khả năng sinh phôi cắt với kích thước 0,5 x 1,0 cm sẽ được cấy vào môi trường cơ bản MS có bổ sung kinetin (0-2,5 mg.l⁻¹) riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, ghi nhận ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên sự hình thành phôi soma.

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn Carbohydrates lên sự hình thành phôi soma từ mô sẹo có khả năng sinh phôi

Mô sẹo có khả năng sinh phôi cắt với kích thước 0,5 x 1,0 cm sẽ được cấy trên môi trường cơ bản MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng ở nồng độ thích hợp, đồng thời có bổ sung các nguồn carbohydrates riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau: Sucrose (0, 10, 20, 30, 40, 50 g.l⁻¹); Glucose (0, 10, 20, 30, 40, 50 g.l⁻¹); Fructose (0, 10, 20, 30, 40, 50 g.l⁻¹).

Điều kiện thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành trong phòng nuôi cấy có nhiệt độ trung bình 25°C ± 2, thời gian chiếu sáng 14 h/ngày, cường độ chiếu sáng tương đương 50,64 ± 1,00 μmol.m⁻².s⁻¹, độ ẩm trung bình 60% ± 5.

Xử lý thống kê số liệu

Các thí nghiệm đều được bố trí theo kiểu thí nghiệm hoàn toàn ngẫu nhiên. Số liệu được ghi nhận và xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV theo phương pháp DMRT [8] ở mức ý nghĩa 5%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của kinetin lên sự hình thành phôi soma từ mô sẹo có khả năng sinh phôi

Mô sẹo có khả năng sinh phôi được cắt thành những cụm nhỏ và cấy sang môi trường có bổ sung kinetin riêng lẻ. Sau 4 tuần nuôi cấy, nhận thấy có sự hình thành phôi trên các mô sẹo khác nhau tùy nghiệm thức. Các chỉ tiêu về phôi theo dõi được trình bày trong Bảng 1.

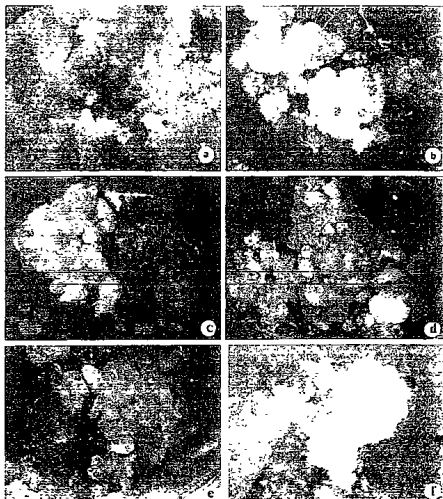
Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn Carbohydrates lên sự phát sinh phôi vô tính

Nghiem thuc	Nồng độ (g.l ⁻¹)	Tỷ lệ tạo phôi (%)	Tổng số phôi	Trọng lượng (g)
S0	0	40,00gh	25,83ghi	0,0297k
C1	Sucrose – 10	76,67bc	62,13b	0,0697bc
C2	Sucrose – 20	96,67a	78,63a	0,0909a
C3	Sucrose – 30	80,00b	64,93b	0,0735b
C4	Sucrose – 40	73,33bc	51,97c	0,0617cd
C5	Sucrose – 50	66,67bcd	50,70cd	0,0566de
C6	Glucose – 10	43,33fgh	26,50gh	0,0307h
C7	Glucose – 20	56,67def	34,50efg	0,0401gh
C8	Glucose – 30	73,33bc	48,60cd	0,0559de
C9	Glucose – 40	66,67bcd	42,93de	0,0497ef
C10	Glucose – 50	63,33bcd	38,13ef	0,0437fg
C11	Fructose – 10	33,33h	17,60i	0,0209k
C12	Fructose – 20	46,67fgh	24,97hi	0,0299k
C13	Fructose – 30	53,33def	31,23fgh	0,0363ghi
C14	Fructose – 40	46,67defg	26,97gh	0,0308hi
C15	Fructose – 50	50,00efg	29,80fgh	0,0308hi

a, b, c... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $F < 0,05$ theo phương pháp Duncan's test.

Swedlund và Locy (1993) đã kết luận rằng nguồn carbohydrate đặc biệt ảnh hưởng đến khả năng biệt hóa tế bào trong phát sinh hình thái và cung cấp năng lượng cho phôi phát triển thông qua quá trình thẩm thấu. Hilae và Te-chato (2005) khi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của 4 loại đường khác nhau bao gồm sucrose, glucose, fructose và mannitol lên sự phát sinh phôi soma cây Cải dầu đã kết luận rằng đường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy không chỉ đóng vai trò là nguồn carbohydrate mà còn điều chỉnh quá trình thẩm lọc làm tăng stress nước của phôi soma liên quan đến hình thành chồi và rễ từ phôi. Ngoài ra, vai trò của nguồn carbohydrate đối với sự phát sinh phôi đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau như *Araucaria angustifolia*, cây Kê và nghiên cứu mới nhất là của Nhut và cộng sự (2012) về ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên sự hình thành phôi soma cây Sâm Ngọc Linh.

Hình 1. Hình thái mô sẹo và phôi vô tính ở những môi trường thí nghiệm sau 4 tuần nuôi cấy: a. Mẫu mô sẹo ban đầu; b. Môi trường không bổ sung Kinetin (đối chứng); c. Môi trường bổ sung 1,0 mg.l⁻¹ kinetin; d. Môi trường



bổ sung 1,0 mg.l⁻¹ kinetin + 20 g.l⁻¹ Sucrose, e. Môi trường bổ sung 1,0 mg.l⁻¹ kinetin + 20 g.l⁻¹ Glucose; f. Môi trường bổ sung 1,0 mg.l⁻¹ kinetin + 20 g.l⁻¹ Fructose.

Trong nhiều nguồn carbohydrate sử dụng cho nuôi cấy mô thực vật, sucrose được sử dụng phổ biến và rộng rãi nhất. Sandra và cộng sự (2000) khẳng định sucrose là nguồn carbohydrate tốt nhất cho tế bào phân chia và tăng trưởng. Sucrose còn được biết đến như chất cảm ứng stress, tác nhân thẩm thấu, dẫn truyền tín hiệu ở thực vật. Traore và cộng sự (2006) đã khẳng định vai trò của sucrose lên sự hình thành phôi soma từ mẫu cây lá Cacao. Vai trò của sucrose đối với sự phát sinh phôi ở 5 kiểu gen cây Cà phê khác nhau cũng đã được Sandra và cộng sự (2000) ghi nhận. Sucrose với nồng độ từ 20 g.l⁻¹ đến 50 g.l⁻¹ được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy *in vitro*. Nhận định này phù hợp với kết quả nhóm thực hiện đề tài thu được ở nồng độ 20 g.l⁻¹ sucrose cho tỷ lệ phát sinh phôi soma từ mô sẹo cây Cọ ráo cao nhất. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Ogunsola và Ilori (2008) khi tiến hành thí nghiệm cảm ứng phát sinh phôi từ mẫu lá cây *Synsepalum dulcificum* D. tốt nhất trên môi trường bổ sung 20 g.l⁻¹ sucrose.

Daigny và cộng sự (1996) cho rằng nguồn đường ngoại sinh bổ sung vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng lên sự hình thành phôi soma ở các loài thực vật là khác nhau. Nồng độ sucrose tốt nhất đối với sự phát sinh phôi soma Sâm Ngọc Linh là 50 g.l⁻¹, trong khi đó 100 g.l⁻¹ sucrose cho tỷ lệ hình thành phôi soma cây Cà đầu cao nhất. Điều này có thể giải thích do sự khác biệt về kiểu gen nên nhu cầu sử dụng đường của các loài thực vật khác nhau là không đồng nhất.

KẾT LUẬN

Như vậy, có thể kết luận rằng không chỉ chất điều hòa sinh trưởng thực vật mà nguồn carbohydrate cũng đóng vai trò rất quan trọng đối với quá trình phát sinh phôi vô tính từ mô sẹo cây Cọ ráo. Sự kết hợp giữa sucrose và kinetin với nồng độ thích hợp đã cho kết quả phát sinh phôi tốt nhất. Môi trường MS bổ sung kinetin ở nồng độ 1,0 mg.l⁻¹ là thích hợp nhất để cảm ứng phát sinh phôi soma từ mô sẹo có khả năng sinh phôi. Sucrose là nguồn carbohydrate phù hợp nhất và nồng độ sucrose là 20 g.l⁻¹ cho kết quả phát sinh phôi soma từ mô sẹo cây Cọ ráo cao nhất. Các phôi này tiếp tục được nuôi cấy đến giai đoạn trưởng thành để làm nguyên liệu sản xuất cây con tái sinh từ phôi kết hợp với quá trình kích thích ra rễ để phát triển thành cây hoàn chỉnh.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ tế bào thực vật (Viện Sinh học nhiệt đới) đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Do Dang Giap, Bui Van The Vinh, Nguyen Thi Kim Loan, Thai Xuan Du, Chu Thi Bich Phuong, Hoang Xuan Chien, Nguyen Phuc Huy, Tran Trong Tuan, Nguyen Dinh Lam, Duong Tan Nhut, 2012. Organogenesis and somatic embryogenesis from leaf transverse thin cell layers of *Jatropha curcas* L. J Biotechnol, 10(2). 281-288.
- Dunstan DI, Tautoris TE, Thorpe TA (1995). Somatic embryogenesis in woody plants, in: Thorpe TA (ed), *In vitro Embryogenesis in Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 471-538.
- Hilae A, Te-chato S (2005). Effects of carbon sources and strengths of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Songklanakarin Journal of Science and Technology, 3, 629-635.
- Kallimuthu K, Paulsamy S, Senthikumar R, Sathya M (2007) *In vitro* Propagation of the biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. Plant Tiss Cult, 17(2): 137-147.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plants*, 15: 473-497
- Nhut DT, Vinh BVT, Hien TT, Huy NP, Nam NB, Chien HX (2012) Effect of spermidine, prolin and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et. Grushv.), Afr J Biotechnol, 11(5): 1084-1091.
- Ogunsola KE, Ilori CO (2008) *In vitro* propagation of miracle berry (*Synsepalum dulcificum* Daniel) through embryo and nodal cultures. Afr J Biotechnol, 7(3): 244-248.
- Sardana J, Batra A, Ali DJ (1998) *In vitro* plantlet formation and micropropagation of *Jatropha curcas* L. Adv Plant Sci, 11(2): 167-169.
- Sujatha M, Makkar HPS, Becker K (2005) Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regul, 47: 83-90.
- Swedlund B, Locy RD (1993) Sorbitol as the primary carbon sources for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant Physiol*, 103: 1339-1346.
- Traore A, Guitinan MJ (2006) Effects of carbon sources and explant type on somatic embryogenesis of four Cacao genotypes. Hort Sci, 41(3): 753-758.
- Vanildo S, Balbuena TS, Santa-Catarina, Floh EIS, Guerra MP, Handro W (2004). Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L.. Plant Growth Regul, 44 (2): 147-156.

EFFECT OF KINETIN AND CARBOHYDRATES ON SOMATIC EMBRYOGENESIS OF PHYSIC NUT (*JATROPHA CURCAS* L.)

Do Dang Giap^{1*}, Nguyen Thi Kim Loan¹, Nguyen Thi Ngọc Anh¹, Nguyen Thi Huyen Trang¹, Tran Trong Tuan¹, Thai Xuan Du¹, Nguyen Dinh Lam², Duong Tan Nhut³

¹Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Agricultural Science for Southern Viet Nam, Vietnam Academy of Science and Technology

³Tay Nguyen Institute for Scientific Resreach, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The studies on somatic embryogenesis culture of *Jatropha curcas* L. were reported recently. Carbohydrate plays an important role in both autotrophic and heterotrophic period of embryogenesis culture. Growth and development of embryos need plant growth regulators under heterotrophic period (pre embryogenesis period) but not autotrophic. In this paper, we examined the effect of Kinetin and carbohydrate resources on formation and development of somatic embryos of *J. curcas*. Results of experiments showed that somatic embryogenesis formation from callus got the best rate on MS medium supplemented with 10 mg.l⁻¹ Kinetin. Sucrose was the suitable carbohydrate resource and medium containing 20 g.l⁻¹ sucrose gave the best rate of formation of somatic embryogenesis of *J. curcas*.

Keywords: Carbohydrates, Kinetin, *Jatropha curcas* L., micropropagation, physic nut, somatic embryogenesis

* Author for correspondence: Email: dodanggiap@gmail.com