

BÀI TỔNG QUAN

SỰ PHÁT SINH PHÔI CỦA CÁC TẾ BÀO SINH DƯỠNG THỰC VẬT

Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Thành Hải, Nguyễn Đức Huy, Lương Ngọc Thuận

Phân Viện Sinh học tại Đà Lạt

TÓM TẮT

Phôi của thực vật không những chỉ được phát sinh từ tế bào trứng đã thụ tinh mà nó còn có thể được tạo ra một cách tự nhiên hoặc nhân tạo từ nhiều loại tế bào khác nhau, bao gồm cả tế bào sinh dưỡng. Mặc dù các yếu tố di truyền quyết định tiềm năng hình thành phôi sinh dưỡng của loài/kiểu gen, nhưng sự biểu hiện khả năng phát sinh phôi sinh dưỡng ở mức độ tế bào được xác định bởi các dấu hiệu sinh lý và phát triển. Các tế bào tiềm năng có thể phản ứng với các điều kiện khác nhau trong giai đoạn đầu của quá trình phát triển phát sinh phôi. Nhìn chung, những điều kiện này bao gồm việc thay đổi nồng độ auxin (nội sinh hoặc ngoại sinh) và các phản ứng stress. Những kết quả thực nghiệm gần đây trong lĩnh vực sinh học phân tử thực vật đã chứng minh vai trò của việc tái tổ chức các gen trên nhiễm sắc thể biểu hiện qua các kiểu hình khác nhau. Có thể đưa ra giả thuyết rằng sự khởi đầu quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng là một phản ứng tổng thể với vô số những tín hiệu đồng thời, bao gồm auxin và các nhân tố stress. Ngoài việc tái tổ chức tế bào và các điều kiện sinh lý, phản ứng này còn bao gồm việc tăng cường tái tổ chức nhiễm sắc thể, kích hoạt chương trình phát sinh phôi; mặt khác nó bất hoạt chương trình phát sinh phôi ở các tế bào sinh dưỡng bằng cách bất hoạt các gen trung gian trong nhiễm sắc thể. Trong bài tổng quan này, chúng tôi xin trình bày tổng quát một số các kết quả nghiên cứu thực nghiệm nhằm làm sáng tỏ giả thuyết trên. Ngoài ra, chúng tôi cũng trình bày những kết quả bước đầu về nghiên cứu phát sinh phôi trên các đối tượng như: hoa Lily, hoa Cẩm chướng, hoa Cát tường, hoa Hồng, hoa Chuông, Địa lan, lan Hồ điệp, một số giống Phong lan, cây Hồng, cây Lúa, cây Dâu tây, cây Khoai tây, Sâm Ngọc linh, Chè, Hồng môn... tại Phòng Công nghệ thực vật, Phân Viện Sinh học tại Đà Lạt từ 1996 đến nay.

Từ khóa: Auxin, các phản ứng stress, quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng, sự tái tổ chức nhiễm sắc thể, sự tái tổ chức tế bào, tế bào có khả năng phát sinh phôi

MỞ ĐẦU

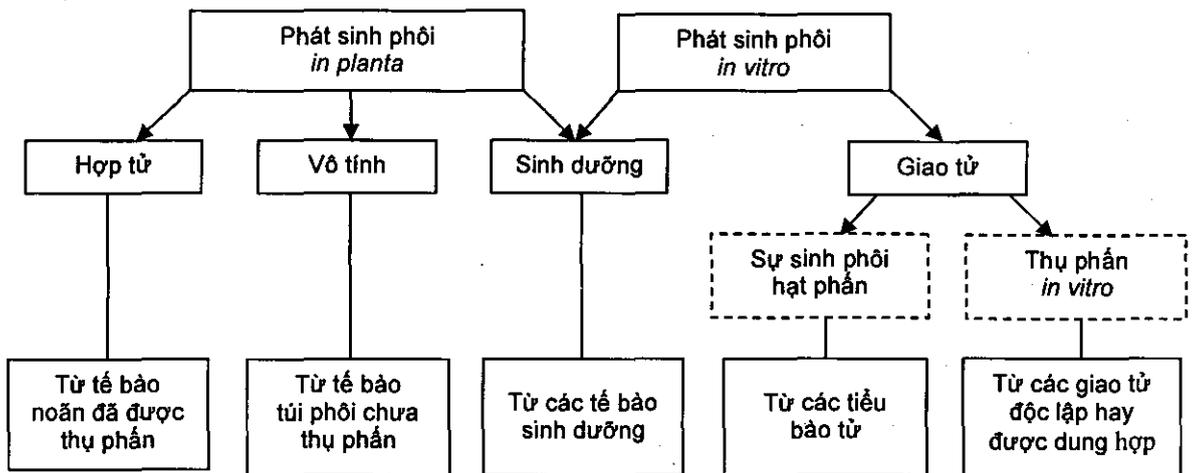
Sơ lược về phôi vô tính. Phôi vô tính chứa chất dinh dưỡng tương tự phôi hữu tính, có mầm chóp rễ và chồi đỉnh nên có thể này mầm trực tiếp thành cây không qua giai đoạn phát sinh chồi, rễ. Các mô và tế bào sinh dưỡng nuôi cấy *in vitro* trực tiếp tạo ra phôi vô tính thông qua một quá trình tạo mô sẹo trung gian. Tế bào mô sẹo có thể phân chia theo cấp số nhân, nhờ vậy, chỉ sau một thời gian ngắn nó có thể tạo được một số lượng phôi đáng kể. Cho đến nay, trên 200 loài cây trồng đã được nhân giống thành công bằng công nghệ phôi vô tính. Phôi vô tính có thể bảo quản lâu dài và cho nảy mầm vào thời vụ thích hợp. Công nghệ tạo phôi vô tính hiện vẫn đang là công nghệ tiên tiến trên thế giới (Nguyễn Văn Uyên, 2006; Dương Tấn Nhựt, 2007).

Quá trình phát sinh phôi ở thực vật. Ở các loài thực vật bậc cao, sự thụ phấn kép (sự thụ phấn của tế bào noãn đồng thời với sự thụ phấn của tế bào trứng tâm) sinh ra phôi và nội nhũ một cách đồng

thời, từ đó tạo ra một hạt có thể sinh trưởng bình thường. Sự phát sinh phôi hợp tử ở thực vật là một quá trình ăn sâu trong mô mẹ. Ngoài những dữ liệu mô học thu thập được trên nhiều loài thì việc phân tích các dạng đột biến của *Arabidopsis* cũng đã góp phần làm sáng tỏ một chuỗi các sự kiện xảy ra trong quá trình phát triển phôi ở thực vật (Mordhorst *et al.*, 1997). Vi nhân giống và thụ phấn *in vitro*, kết hợp với các biện pháp phân tử và gen, đã làm sáng tỏ thêm một số chi tiết và đồng thời cũng có những đóng góp thiết thực vào vốn hiểu biết của chúng ta về quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng ở thực vật (Grimanelli *et al.*, 2005; Kranz *et al.*, 1995; Kranz, 1999; Sprunck *et al.*, 2005). Tuy nhiên, ở các loài thực vật bậc cao, việc không thể phát sinh phôi hợp tử ở một số loài được cho là có liên quan đến sự sinh sản vô phôi (apomixis – sự sinh sản không thông qua quá trình thụ tinh) (gồm hơn 400 loài cây thuộc ít nhất 40 họ khác nhau; Bicknell, Koltunow, 2004). Trong quá trình sinh sản vô phôi, sự hình thành hạt vô tính bắt đầu từ mô mẹ của noãn, không trải qua

quá trình giảm phân và thụ phấn, dẫn đến sự phát triển của phôi (Bicknell, Koltunow, 2004). Hiện tượng sinh sản vô phôi đã bộc lộ hai khía cạnh quan trọng của quá trình phát sinh phôi ở thực vật: (1) Các điểm nhấn kích hoạt sự thụ phấn có thể được thay thế bằng những cơ chế nội sinh; (2) Ở một số loài thực vật bậc cao, ngoài tế bào noãn được thụ phấn thì các loại tế bào khác cũng có thể duy trì và giữ lại khả năng phát triển phôi. Mặc dù quá trình sinh sản vô phôi chỉ hạn chế ở các tế bào phát sinh đỉnh hoặc

noãn, nhưng cũng có một số lượng lớn tế bào sinh dưỡng thực vật có thể trải qua quá trình phát triển phôi dưới những điều kiện thích hợp. Ví dụ, sự hình thành phôi (có vai trò như là mầm sinh dưỡng) cũng có thể xảy ra trên mép lá của cây *Kalanchoe*, *Bryophyllum* (Yarbrough, 1932) hay các cây thuộc chi *Malaxis* (Taylor, 1967). Có nhiều thí nghiệm phát sinh phôi được bắt đầu từ nuôi cấy *in vitro* các tế bào sinh dưỡng (Thorpe, 1995) hoặc tế bào giao tử (ví dụ: tiểu bào tử, Reynolds, 1997).



Hình 1. Có nhiều con đường dẫn tới sự phát triển phôi ở thực vật bậc cao. Sự phát sinh phôi ở phần lớn những thực vật bậc cao bắt đầu với sự thụ phấn kép (sự thụ phấn của tế bào noãn đồng thời với sự thụ phấn của tế bào trung tâm). Tuy nhiên, ở một số loài và trong một số điều kiện nhất định, việc phát sinh phôi có thể khởi đầu trong túi phôi mà không cần quá trình thụ phấn (sinh sản vô phôi). Ở một số loài thực vật khác (ví dụ: *Kalanchoe* sp.), phôi (có vai trò giống các chồi mầm) có thể xuất hiện ở mép lá (quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng *in planta*). Quá trình phát sinh phôi cũng có thể được kích thích nhân tạo đối với các tế bào sinh dưỡng hoặc các tế bào giao tử *in vitro*.

Cần phải hiểu rõ về tất cả các dạng thức phát sinh phôi ở thực vật trước khi bắt đầu tiến hành nghiên cứu (Hình 1). Những loài hoặc kiểu gen này phải có tiềm năng di truyền để tạo phôi từ các tế bào sinh dưỡng và một hay vài tế bào của mẫu cây phải có khả năng nhận tín hiệu (nội sinh hay ngoại sinh) để kích hoạt con đường phát triển phát sinh phôi dẫn tới sự hình thành phôi ngay cả khi không còn tín hiệu kích thích.

Mặc dù quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng *in vitro* đã và đang được áp dụng rộng rãi trên nhiều đối tượng thực vật ở các phòng thí nghiệm nuôi cấy mô, nhưng cơ chế sinh học của quá trình này thì hầu như vẫn chưa được hiểu rõ. Những điều kiện đặc biệt để kích thích sự phát sinh phôi thì chỉ được thiết lập

một cách máy móc theo kinh nghiệm vì người ta vẫn chưa biết tại sao những kiểu gen hoặc mẫu cây như vậy lại có tiềm năng phát sinh phôi, tại sao và làm thế nào để đạt được khả năng đó, cũng như đâu là điểm nhấn kích hoạt quá trình phát triển của phôi.

KHẢ NĂNG PHÁT SINH PHÔI CỦA CÁC TẾ BÀO SINH DƯỠNG

Khả năng phát sinh phôi sinh dưỡng được biểu hiện trước hết là ở mức kiểu gen (Kielly, Bowley, 1992; Moltrasio *et al.*, 2004). Điều này có thể được chứng minh dễ dàng bằng cách chuyển khả năng phát sinh phôi từ kiểu gen có khả năng phát sinh phôi sang kiểu gen ngăn cản sự phát sinh phôi thông

qua quá trình lai giống hữu tính (Bowley *et al.*, 1993; Kielly, Bowley, 1992; Moltrasio *et al.*, 2004). Mặc dù các điều kiện kích thích sự phát sinh phôi đã được thiết lập cho nhiều loài, nhưng vẫn còn một số lượng lớn các loài chưa thể tạo phôi sinh dưỡng. Thậm chí ngay trong cùng một loài, có kiểu gen dễ tạo phôi nhưng cũng có kiểu gen ngăn cản sự tạo phôi. Tuy nhiên, cần phải nhấn mạnh rằng trong nhiều trường hợp, sự ngăn cản tạo phôi có thể được giải quyết bằng cách tối ưu hóa các điều kiện sinh trưởng của cây hoặc bằng cách chọn lựa mẫu cây thích hợp (Krishna Raj, Vasil, 1995). Vì vậy, việc xác định các đặc tính di truyền có thể chỉ được sử dụng để xác định vị trí và thời điểm biểu hiện khả năng sinh phôi. Do đó, khả năng phát sinh phôi chủ yếu được xác định thông qua chương trình phát triển của thực vật cũng như những dấu hiệu của môi trường.

Phôi sinh dưỡng có thể phát triển trên tất cả các cơ quan của Cà rốt hoặc củ Linh lăng mà có mang những kiểu gen nhất định quy định sự phát sinh phôi, điều đó cho thấy biên độ biểu hiện rộng của khả năng sinh phôi. Tuy nhiên, ở phần lớn các loài thực vật, khả năng phát sinh phôi bị hạn chế ở những mô nhất định của kiểu gen nói trên. Những thí nghiệm nuôi cấy mô cho thấy giữa các cơ quan khác nhau của cây tồn tại một gradient phản ứng phát sinh phôi. Các mô có nguồn gốc từ phôi thì có khả năng phát sinh phôi cao nhất, và khả năng này giảm dần ở cọng dưới lá mầm, cuống lá, lá và rễ (Neumann, 2000). Nhưng thậm chí nếu tiềm năng phát sinh phôi đã bị mất đi ở các tế bào sinh dưỡng thực vật thì nó vẫn có thể được phục hồi. Những con đường phát sinh phôi gián tiếp này cần phải trải qua giai đoạn tạo mô sẹo trung gian nhằm biểu hiện tiềm năng phát sinh phôi.

Hiển nhiên, khả năng phát sinh phôi của tế bào thực vật không ngừng giảm trong suốt quá trình phát triển cá thể, và nó còn phụ thuộc vào loài. Ở thực vật một lá mầm, bao gồm hầu hết các loài ngũ cốc quan trọng, khả năng phát sinh phôi hầu như chỉ giới hạn ở các tế bào có nguồn gốc từ phôi hoặc mô phân sinh, bao gồm phôi non, hạt, gốc lá (*Graminae*), đỉnh chồi (*Orchidaceae*), vảy củ (*Liliaceae*) và chồi bên (Krishna Raj, Vasil, 1995). Khả năng phát sinh phôi của những tế bào mô phân sinh này có thể được duy trì nếu mẫu cấy được nuôi trong môi trường có bổ sung 2,4-D, tiếp đó cho tạo mô sẹo. Tiến hành cấy chuyển những tế bào mô sẹo có khả năng phát sinh phôi này sang môi trường không có chất kích thích tăng trưởng hoặc môi trường có bổ sung auxin với hàm lượng thấp thì có thể đạt được một tỷ lệ phát

sinh phôi sinh dưỡng cao.

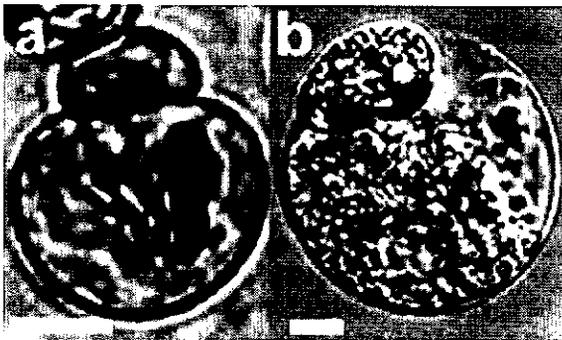
Ngược với các tế bào mô phân sinh, các tế bào sinh dưỡng của cây một lá mầm thì được biệt hóa sớm và nhanh hơn, điều này làm mất khả năng phân chia và phát sinh hình thái của chúng. Ở khía cạnh này, cần lưu ý là sự điều hòa quá trình phát triển chuyển tiếp từ giai đoạn còn non đến giai đoạn trưởng thành có thể khác nhau giữa cây một lá mầm và cây hai lá mầm (Chuck, Hake, 2005). Mặc dù lý do trực tiếp của việc sớm mất đi tính toàn năng ở thực vật một lá mầm vẫn chưa được biết đến, nhưng người ta đã có thể liên hệ sự điều hòa nghiêm ngặt của quá trình tổng hợp này với quá trình chuyển hóa của các chất điều hòa nội sinh, chẳng hạn như auxin.

Nhiều thí nghiệm đã được thực hiện để so sánh kiểu gen điều khiển sự phát sinh phôi và kiểu gen ngăn cản sự phát sinh phôi nhằm chỉ ra những khác biệt chính giữa chúng (Fehér *et al.*, 2003). Ở củ Linh lăng (*Medicago sativa* spp. *varia*), những kiểu gen có quan hệ mật thiết được chọn lọc dựa trên khả năng phát sinh phôi của chúng (Bögre *et al.*, 1990). Các phản ứng của chúng với auxin được so sánh và những đặc điểm khác nhau được ghi nhận. Những gen đáp ứng với auxin được kích thích hoặc bị ức chế ở nồng độ auxin rất thấp để chống lại những kiểu gen ngăn cản sự phát sinh phôi (Bögre *et al.*, 1990). Ngoài ra, auxin còn có tác dụng ức chế sự ra rễ của những mẫu cắt chồi sinh trưởng *in vitro* ở nồng độ thấp hơn nhiều (Bögre *et al.*, 1990). Mô sẹo của các kiểu gen không phát sinh phôi vẫn tiếp tục sinh trưởng trong môi trường bổ sung 2,4-D có nồng độ tương đương với nồng độ ức chế sự phân bào của những kiểu gen điều khiển sự phát sinh phôi. Những quan sát này đã chỉ ra những khác biệt đáng kể về tính nhạy cảm với auxin của hai kiểu gen này. Vai trò quan trọng của các hormone biến dưỡng nội sinh (bị ảnh hưởng bởi tính di truyền, các dấu hiệu sinh lý và môi trường) trong giai đoạn kích thích phát sinh phôi sinh dưỡng đã được thừa nhận (Jiménez, Thomas, 2005).

Khả năng phát sinh phôi được thể hiện lần cuối cùng vào giai đoạn những tế bào đơn lẻ. Tuy nhiên, rất khó để xác định rõ ràng rằng khả năng này của tế bào mang ý nghĩa gì. Theo một định nghĩa được chấp nhận rộng rãi thì tế bào có khả năng phát sinh phôi là những tế bào có thể biệt hóa thành phôi nếu chúng nhận được những tác nhân biệt hóa (Halperin, 1969). Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, khả năng phát sinh phôi cần phải được kích thích (ví dụ: trong quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng gián tiếp), và

không dễ để phân biệt giữa tín hiệu cảm ứng và điểm nhấn kích hoạt quá trình phát triển phôi. Khả năng phát sinh phôi của tế bào có liên quan đến quá trình phân biệt hóa của những tế bào sinh dưỡng cho phép chúng phản ứng với những dấu hiệu phát triển mới.

Người ta nhận thấy những tế bào có khả năng phát sinh phôi có thể được nhận biết thông qua hình thái là những tế bào nhỏ, được bao bọc bởi khối tế bào chất dày và những không bào nhỏ. Xét về khía cạnh này thì chúng rất giống các tế bào mô phân sinh hay hợp tử và sự giống nhau này được thể hiện rõ trong quá trình phân chia không đối xứng của chúng (Hình 2).



Hình 2. Điểm tương tự về mặt hình thái giữa tế bào phát sinh phôi đang phân chia không đối xứng có nguồn gốc từ tế bào trần của lá cỏ Linh lã (a) và hợp tử của cây Bắp (b) (Fehér *et al.*, 2005).

Những tế bào có khả năng phát sinh phôi có đặc điểm là nhân nằm ở vị trí trung tâm, có những ống siêu nhỏ nổi bật ở gần nhân và những sợi nhỏ actin (Šamaj *et al.*, 2003). Ngoài ra, chúng còn có một thành tế bào có cấu trúc đặc biệt. Các dạng tế bào này vừa có nguồn gốc từ các mô phân sinh (hoặc mô phát sinh phôi) vừa có thể được tạo ra từ những tế bào có khoảng không bào lớn trong một số điều kiện thích hợp; chẳng hạn như sau khi xử lý với 2,4-D. Tuy nhiên, một số loại hormone (abscisic acid, ABA, cytokinin) hoặc stress khác cũng có thể kích thích sự hình thành những kiểu tế bào có khả năng phát sinh phôi (Ikeda-Iwai *et al.*, 2003).

Quá trình phát triển của những tế bào có khả năng phát sinh phôi đã được mô tả một cách cụ thể đối với hệ thống nuôi cấy tế bào đơn (Nomura, Komamine, 1985) hoặc mô tả bằng hình ảnh, video đối với hệ thống nuôi cấy huyền phù tế bào của Cà

rốt; hoặc nuôi cấy tế bào trần của lá cỏ Linh lã (Bögre *et al.*, 1990; Dudits *et al.*, 1991; Pasternak *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2005).

Khi sử dụng kỹ thuật theo dõi tế bào bằng hình ảnh đối với những tế bào đơn Cà rốt trong hệ thống nuôi cấy huyền phù tế bào, mặc dù những hình ảnh thu được không cho thấy rõ những dạng tế bào có thể khởi tạo các tế bào có khả năng hình thành các cụm tế bào tiền phôi nhưng vẫn có thể quan sát được tỷ lệ rất cao các tế bào nhỏ, hình cầu và có khối tế bào chất dày (Toonen *et al.*, 1996). Kỹ thuật tương tự cũng đã được sử dụng thành công để chứng minh rằng sự biểu hiện của các gen SERK1 (somatic embryogenesis receptor kinase) thực ra có liên quan đến trạng thái của các tế bào phát sinh phôi (Schmidt *et al.*, 1997). Sau quá trình phân chia của những tế bào Cà rốt nhỏ, hình cầu và dày đặc tế bào chất này, thành biểu bì JIM8 của các tế bào (JIM8 cell wall epitope) được chuyển một cách không đối xứng sang các tế bào con, và chỉ các tế bào không còn thành biểu bì mới có khả năng phát sinh phôi (Toonne *et al.*, 1996).

Một nghiên cứu khác được tiến hành bởi Nomura và Komamine (1985) dựa trên sự phân đoạn các tế bào huyền phù Cà rốt. Họ đã phân lập được các tế bào nhỏ, dày đặc tế bào chất và có cùng đường kính (trạng thái 0) mà có thể phát triển đồng thời thành phôi sinh dưỡng ở những điều kiện thích hợp (Osuga *et al.*, 1999). Người ta thấy rằng sự hình thành của các tế bào trạng thái 1 (các cụm tế bào phát sinh phôi) thì phụ thuộc vào auxin, tuy nhiên auxin lại ngăn cản sự phát triển sau này của tế bào (Nomura, Komamine, 1985).

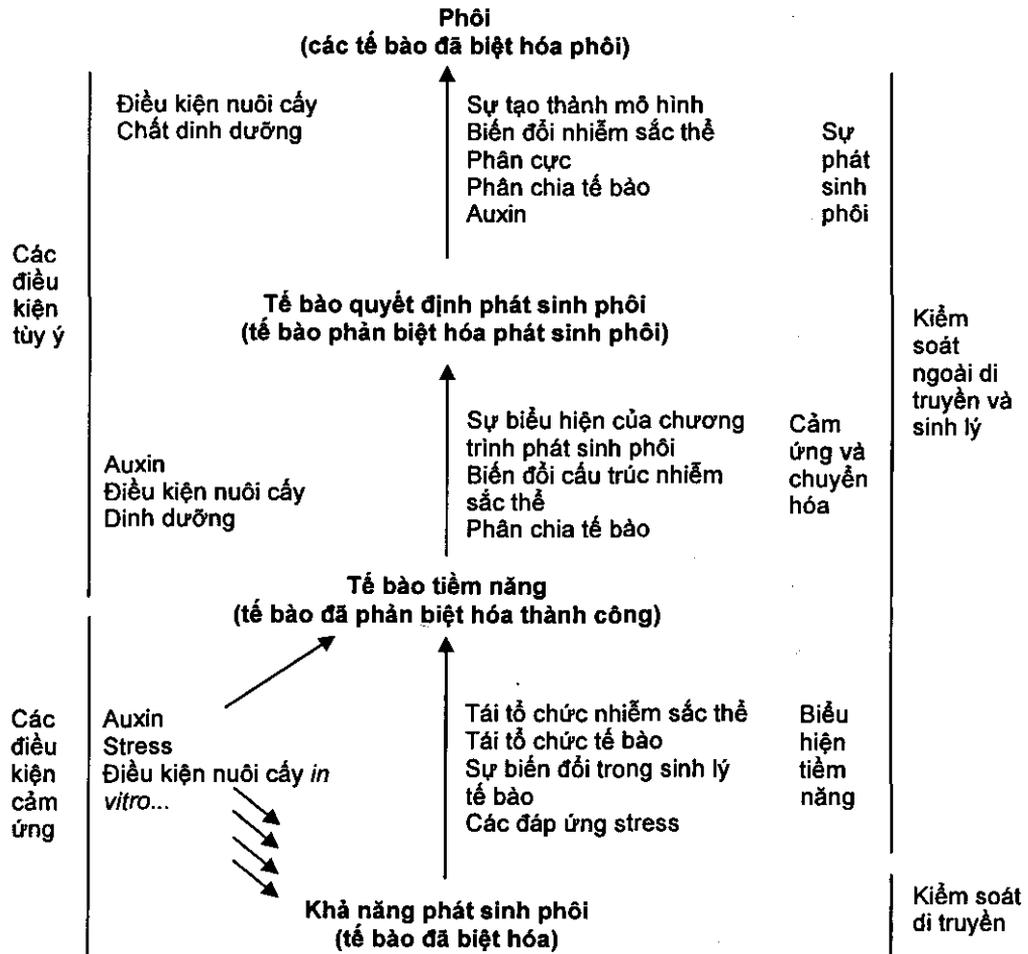
Hệ thống nuôi cấy tế bào trần của lá cỏ Linh lã cho phép tiến hành những nghiên cứu chi tiết ở mức độ tế bào đơn và cả ở mức độ quần thể tế bào (Fehér *et al.*, 2005). Kết quả cho thấy sự phát triển của những tế bào này thì phụ thuộc vào nồng độ 2,4-D: môi trường có bổ sung 1 μM 2,4-D cho phép hình thành những tế bào có khoảng không bào lớn (không có khả năng phát sinh phôi), trong khi môi trường có bổ sung 2,4-D với nồng độ cao gấp 10 lần cho phép hình thành những tế bào nhỏ và dày đặc tế bào chất (có khả năng phát sinh phôi) (Pasternak *et al.*, 2002). Ngoài ra, hệ thống này còn được sử dụng để tiến hành so sánh giữa các kiểu gen có hoặc không có khả năng sinh phôi (Bögre *et al.*, 1990). Kết quả so sánh giữa những tế bào có khả năng phát sinh phôi và những tế bào không có khả năng phát sinh phôi cho thấy cả 2 kiểu gen trên không những thể hiện những khác biệt về đặc điểm

hình thái mà còn thể hiện những biến đổi trong quá trình sinh lý. Những tế bào có khả năng phát sinh phôi sẽ có độ pH trong không bào và tế bào chất cao hơn, đồng thời có sự biến đổi hàm lượng auxin trong tế bào (Pasternak *et al.*, 2002). Những tế bào có nguồn gốc từ tế bào trần này được kích hoạt sớm hơn bằng cách acid hóa môi trường làm quá trình hợp thành cấu trúc BrdU/thymidine DNA của bộ gen cũng như quá trình phân bào xảy ra sớm hơn (Bögre *et al.*, 1990; Pasternak *et al.*, 2002). Sự tương quan giữa độ pH của màng sinh chất ở thời điểm kích hoạt tế bào và sự hình thành các tế bào phát sinh phôi ngày càng được làm rõ bởi rất nhiều những nghiên cứu chuyên sâu. Chẳng hạn, sử dụng 2-morpholinoethanesul-phonic làm dung dịch đệm thì sự acid hóa môi trường bị chậm lại, làm trì hoãn phân chia tế bào, ngăn cản sự hình thành các tế bào phát sinh phôi trong môi trường có 2,4-D ở nồng độ thích hợp cho sự hình thành của các tế bào phát sinh phôi (10 μ M). Mặt khác, việc acid hóa từ môi trường bằng L-galactolactone đã có tác dụng thúc đẩy sự phân bào và đẩy mạnh quá trình hình thành các tế bào phát sinh phôi trong môi trường không phát sinh phôi (1 μ M 2,4-D) (Pasternak *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2005). Các stress oxy hóa (sắt, đồng, oxit nitric) cũng thúc đẩy sự phân bào và sự hình thành các tế bào phát sinh phôi trong môi trường không phát sinh phôi (Pasternak *et al.*, 2002; Ötvös *et al.*, 2005). Một vài trong số những thay đổi này có thể liên hệ tới thời điểm mà hàm lượng auxin nội sinh (IAA) đạt mức cao nhất (Pasternak *et al.*, 2002).

Hệ thống trên cũng tỏ ra hữu dụng trong việc xác định những gen biểu hiện biệt hóa ở các tế bào có khoảng không bào lớn, không có khả năng phát sinh phôi (1 μ M 2,4-D) và những gen biểu hiện biệt hóa ở các tế bào đậm đặc tế bào chất, có khả năng phát sinh phôi (10 μ M 2,4-D). Sử dụng phương pháp tách các phân tử DNA bổ sung (cDNA) từ các phản ứng PCR để thu nhận một quần thể giàu các cDNA mà được ưu tiên biểu hiện trong dạng tế bào phát sinh phôi (Fehér *et al.*, 2003). Việc phân loại chức năng của 36 gen biểu hiện biệt hóa cho thấy hầu hết các loại protein đã được nhận biết thì liên quan đến quá trình tái tổ chức tế bào, bao gồm các phản ứng stress, sự vận chuyển nội bào, sự bài tiết, sự tổng hợp protein và các chức năng của nhân tế bào. Những gen này có các kiểu biểu hiện riêng biệt trong quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng, điều đó cho thấy chúng tham gia vào nhiều quá trình khác nhau trong giai đoạn hình thành phôi từ các tế bào trần.

Những nghiên cứu tương tự trong lĩnh vực sinh học phân tử cũng đã đạt được một số thành quả trong việc xác định rằng những gen có chức năng tương tự thì cũng được biểu hiện ở những hệ thống phát sinh phôi khác (Fehér *et al.*, 2003). Cần phải tiến hành những nghiên cứu chuyên sâu hơn để xác định ý nghĩa của những gen/protein này trong quá trình phát sinh phôi, nhưng tính đa dạng của chúng đã chỉ ra một loạt các thay đổi của tế bào liên quan đến sự hình thành các tế bào phát sinh phôi (Suprasanna, Bapat, 2005). Suprasanna, Bapat (2005) cũng đã nêu ra một số đặc điểm về sự biểu hiện của các gen biệt hóa trong quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng.

Gen đặc trưng nhất liên quan đến tiềm năng phát sinh phôi là gen mã hóa cho enzyme SERK1 (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), được Schmidt và đồng tác giả (1997) phát hiện lần đầu tiên ở Cà rốt. Sử dụng promoter SERK để nối vào đoạn gen mã hóa cho enzyme luciferase và tiến hành theo dõi tế bào bằng video, kết quả cho thấy các tế bào đơn mà có sự biểu hiện của SERK thì thực sự có thể phát triển thành phôi sinh dưỡng (Schmidt *et al.*, 1997). Ngoài ra, sự biểu hiện lệch vị trí của gen *AtSERK* có thể làm cho sự hình thành sinh phôi sinh dưỡng diễn ra một cách dễ dàng (Hecht *et al.*, 2001). Do đó, sự biểu hiện của SERK được sử dụng như là một nhân tố đánh dấu khả năng sinh phôi (Thomas *et al.*, 2004). Người ta nhận thấy ở thực vật, *AtSERK1* được biểu hiện lần đầu tiên trong quá trình phát sinh đại bào tử và sau đó là trong các đại bào tử có chức năng, trong tất cả các tế bào của túi phôi cho đến khi thụ phân và ở trong túi phôi cho tới giai đoạn hình tim (Hình 4; Schaffner, 1906). Sau giai đoạn hình tim này, sự biểu hiện của gen không còn được tìm thấy ở bất kì bộ phận nào của hạt đang phát triển. Tuy nhiên, gen này có sự biểu hiện thấp ở những mô mạch trưởng thành. Sự biểu hiện gen *AtSERK1* cũng được quan sát ở đỉnh chồi, mô phân sinh và lá mầm của hạt cây *Arabidopsis* nuôi cấy trong môi trường có bổ sung auxin trong giai đoạn đầu của quá trình nuôi cấy mô sẹo phát sinh phôi (Hecht *et al.*, 2001). Ở các loài thực vật khác, những gen *SERK* tương đồng cũng được xác định, thậm chí còn được biểu hiện mạnh hơn, điều đó thể hiện vai trò của các gen này trong việc điều hòa sự phát sinh phôi (Baudino *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2003; Somleva *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2004). Do đó, có ý kiến cho rằng protein SERK đơn thuần chỉ là một marker phát sinh hình thái tổng quát chứ không hẳn là một marker phát sinh phôi (Nolan *et al.*, 2003).



Hình 3. Mô hình giả thuyết các sự kiện xảy ra trong quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng. Có vô số những dấu hiệu xảy ra đồng thời, bao gồm auxin (nội sinh hoặc ngoại sinh), gây ra các đáp ứng tế bào bao gồm sự tái tổ chức về mặt cấu trúc và sinh lý ở cấp độ tế bào, nhiễm sắc thể và sự biểu hiện gen. Kết quả là những tế bào phân biệt hóa trở thành những tế bào có khả năng phát sinh phôi. Các tế bào tiềm năng sẽ phát sinh phôi nếu các điều kiện nội bào và ngoại bào cho phép biểu hiện chương trình phát sinh phôi mà trong nhiều trường hợp, nó xảy ra sau hoặc xảy ra đồng thời với quá trình phân bào. Quá trình phân bào tiếp theo cùng với sự phân cực tế bào dẫn tới sự phát triển phôi. Việc tái tổ chức nhiễm sắc thể được giả thuyết là có vai trò chủ yếu trong tất cả các giai đoạn, bao gồm quá trình phân biệt hóa, tái chương trình hóa phát sinh phôi và quá trình biệt hóa phôi. Tất cả chúng có liên quan tới sự hoạt động hay không hoạt động của một số lượng lớn các gen tương đồng.

SỰ CẢM ỨNG PHÁT TRIỂN PHÁT SINH PHÔI

Có nhiều hệ thống nuôi cấy mô sử dụng 2,4-D như là một chất cảm ứng có hiệu quả trong quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng. Nếu chúng ta có thể trả lời được câu hỏi: tại sao trong trường hợp này, loại auxin tổng hợp này lại có hiệu quả cao như vậy, thì chúng ta mới có thể tiếp cận được những hiểu biết về các quá trình xảy ra trong giai đoạn phát sinh phôi. Vấn đề cần phải được giải đáp trước tiên là liệu rằng 2,4-D có cần

thiết cho sự hình thành các tế bào phát sinh phôi, các tế bào tiền phát sinh phôi hoặc cả 2 loại hay không. Vấn đề này không dễ để giải đáp trong trường hợp hệ thống nuôi cấy với 2,4-D được thiết lập trong một thời gian dài và phôi chỉ được hình thành khi cây chuyển sang môi trường không có 2,4-D (ví dụ: trong trường hợp nuôi cấy Cà rốt). Liệu sự phát triển của phôi xảy ra trước hay sau khi mẫu cây được cấy chuyển sang môi trường không có 2,4-D? Hiện nay, mọi người đều nhất trí rằng việc xác định trạng thái của tế bào xảy ra

trong môi trường có 2,4-D, nhưng trong cùng thời điểm đó thì sự phát triển lại bị ức chế. Việc 2,4-D chỉ là một điểm nút chuyển đổi trạng thái của tế bào thì đã được nhấn mạnh bằng các thí nghiệm sử dụng một hệ thống đặc biệt (nuôi cấy huyền phù các vi mô sẹo) nuôi cấy các tế bào *Medicago* trong môi trường có bổ sung một loại auxin tổng hợp khác có tên naphthylacetic acid (NAA) (Dudits *et al.*, 1991; Györgyey *et al.*, 1991, 1997). Nếu cấy chuyển những tế bào này sang môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng thì chúng sẽ tạo rễ với tần số cao. Nếu những tế bào này được xử lý 2,4-D với nồng độ cao (100 μM) trong một khoảng thời gian ngắn (khoảng vài phút) rồi cấy chuyển sang môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng thì những tế bào này sẽ phát triển thành phôi sinh dưỡng. Tuy nhiên, phải 2 - 3 tuần sau khi xử lý thì mới có thể quan sát được những khối phôi đầu tiên trên bề mặt của mô sẹo. Dựa trên cơ sở những thí nghiệm này, một hiệu quả phát sinh phôi cao có thể đạt được trên bề mặt lá mầm của cây Cà rốt sau khi cấy vào môi trường có bổ sung 450 μM 2,4-D trong thời gian 2 h (Kitamiya *et al.*, 2000). Thực ra, những nghiên cứu này đã chỉ ra rằng 2,4-D rất cần thiết để khởi sự chương trình phát sinh phôi. Việc cấy chuyển mẫu cây sang môi trường không có 2,4-D có vai trò quan trọng trong việc thiết lập tính phân cực của tế bào, đây được xem là một trong những sự kiện đầu tiên của quá trình phát triển phôi (Šamaj *et al.*, 2003; Fehér *et al.*, 2003).

2,4-D thường được xem như là chất tương tự auxin, nhưng nó khác và có hiệu quả đa dạng hơn so với auxin tự nhiên. Ví dụ, 2,4-D đã được chứng minh là có tác dụng điều hòa sự kéo dài và phân chia của tế bào theo con đường khác với NAA (Campanoni, Nick, 2005). Việc 2,4-D kích thích phân bào nhưng đồng thời lại ngăn cản sự kéo dài của tế bào thì đã được quan sát trong trường hợp phát sinh phôi ở tế bào trần của cỏ Linh lăng (Pasternak *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2005).

Từ khi 2,4-D được sử dụng như một loại thuốc diệt cỏ thì đã có nhiều nghiên cứu được tiến hành nhằm làm sáng tỏ hoạt tính của nó. Những nghiên cứu gần đây cho rằng ethylene được tạo ra để phản ứng lại với những loại thuốc diệt cỏ có bản chất là auxin (Zheng, Hall, 2001) và ethylene khởi động lại quá trình sinh tổng hợp ABA (Grossmann, Hansen, 2001). Việc tăng cường biểu hiện của các gen mã hóa cho enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase xúc tác giai đoạn giới hạn tốc độ sinh tổng hợp ethylene cũng như sự liên quan đến enzyme 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, một chất điều

hòa chủ yếu trong sinh tổng hợp ABA, đã được chứng minh là do tác dụng của các chất diệt cỏ có bản chất auxin như 2,4-D (Hansen, Grossmann, 2000; Woeste *et al.*, 1999). Sự tổn thương và chết của tế bào được cho là do sự hình thành cyanide, một đồng sản phẩm của quá trình sinh tổng hợp ethylene (Grossmann, 1996). Việc phân tích những thay đổi trong sự biểu hiện gen của toàn bộ vốn gen ở *Arabidopsis* khi tiến hành xử lý với 1 μM 2,4-D (gấp đôi nồng độ mà Kitamiya và đồng tác giả sử dụng để cảm ứng phát sinh phôi sinh dưỡng ở Cà rốt) cũng đã được tiến hành (Raghavan *et al.*, 2005). Trong thí nghiệm này, có tổng cộng 148 gen có biểu hiện tăng cường phiên mã và 85 gen biểu hiện sự giảm phiên mã. Ngoài 25% các gen chưa được nhận biết và phân loại thì một phổ rộng các hoạt tính của 2,4-D được biểu thị qua nhiều lớp gen biến đổi khác nhau, bao gồm những gen liên quan đến sự phiên mã, biến dưỡng, truyền tín hiệu, thông tin nội bào, luân chuyển protein, định vị các tiểu bào, sự vận chuyển của tế bào và sự tương tác với các tế bào xung quanh.

Những phát hiện này phù hợp với kết quả của nhiều thí nghiệm sử dụng 2,4-D làm điểm nhấn kích hoạt quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng. Ngoài ra, ABA đã được báo cáo là có khả năng cảm ứng phát sinh phôi tế bào sinh dưỡng ở cây con (Nishiwaki *et al.*, 2000). Việc áp dụng ABA trong nuôi cấy phôi hợp tử non của hoa Hướng dương đã tỏ ra có hiệu quả trong việc cảm ứng phát sinh phôi sinh dưỡng trong môi trường có chứa đường, là môi trường chỉ cho phép phát sinh tạo mô sẹo nếu không có ABA (Charrière *et al.*, 1999). Senger và đồng tác giả (2001) đã đưa ra những bằng chứng thực nghiệm về sự tham gia của ABA nội sinh trong giai đoạn cảm ứng phôi sinh dưỡng. Họ đã chỉ ra rằng việc giảm hàm lượng ABA nội sinh ở *Nicotiana glauca* làm rối loạn quá trình phát sinh hình thái trong giai đoạn bắt đầu hình thành phôi hình cầu, việc này có thể được đảo ngược bằng cách bổ sung ABA ngoại sinh. ABA được xem là một hormone stress ở thực vật. Thật ra, việc áp dụng các điều kiện stress mà có thể cảm ứng hay thúc đẩy sự hình thành phôi sinh dưỡng thì đã được công bố rộng rãi (Fehér *et al.*, 2003). Ở các tế bào trần của lá cỏ Linh lăng, nhiều tác nhân cảm ứng oxy hóa khác nhau đã được tìm thấy để cảm ứng sự hình thành các tế bào phôi trong điều kiện mà những tế bào đã được kéo dài, có không bào lớn có thể phát triển (Pasternak *et al.*, 2002). H_2O_2 và oxit nitric cũng có tác dụng thúc đẩy sự phát sinh phôi sinh dưỡng (Kairong *et al.*, 1999).

Việc những stress oxy hóa và những phản ứng

stress là một phần vốn có của quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng cảm ứng bởi 2,4-D thì đã được chứng minh bởi một nghiên cứu microarray. Lá mầm của hạt Đậu nành được đặt ngửa trên môi trường có bổ sung 40 mg/l 2,4-D (khoảng 200 μ M) (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003). Sau 21 ngày nuôi cấy, phôi chi xuất hiện ở mặt úp của mầm cây. Dạng biểu hiện gen của phần mặt úp và mặt ngửa của mầm cây được so sánh ở những thời điểm khác nhau trên một microarray của cDNA dòng 9280. Các số liệu microarray cho thấy sự oxy hóa/giải, sự cải biến thành tế bào và sự phân chia tế bào liên quan đến sự gia tăng biểu hiện đáng kể của chúng sau 7 ngày nuôi cấy. Sau 14 ngày nuôi cấy, sự phân chia tế bào bị giảm xuống, nhưng sự phiên mã của những gen phản ứng với stress lại được gia tăng. Tiến hành phân tích protein trong quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng ở cây *M. truncatula* thì xác định được thioredoxin và l-Cys-peroxiradoxin trong số 16 protein có liên quan sự phát triển phát sinh phôi (Imin *et al.*, 2005).

Ngoài tác dụng kích thích tổng hợp ABA và ethylene, 2,4-D còn có tác dụng làm tăng mức auxin nội sinh (IAA) trong tế bào thực vật (Michalczuk *et al.*, 1992a, b). Vai trò chính của auxin trong việc kích hoạt quá trình phát sinh phôi đã được củng cố bằng những nghiên cứu cho thấy hàm lượng của auxin tăng cao trong quá trình thụ phấn của Cà rốt (Ribnicky *et al.*, 2001) và 2,4-D có khả năng cảm ứng sự phát triển của các noãn chưa thụ phấn của cây Lúa mì *in vitro* (Kranz *et al.*, 1995). Lượng auxin nội sinh thích hợp của mầm cây có thể là yêu cầu chủ yếu trong quá trình phát sinh phôi. Ngay cả ở những hệ thống mà không đòi hỏi phải có auxin để cảm ứng tạo phôi sinh dưỡng thì vẫn dễ dàng nhận thấy tầm quan trọng của các auxin nội sinh. Ví dụ, ABA chỉ có khả năng cảm ứng phát sinh phôi đối với những mầm cây Cà rốt còn chồi đỉnh, là vùng tổng hợp auxin (Nisiwaki *et al.*, 2000). Ikeda-Iwai và đồng tác giả (2003) báo cáo rằng việc sử dụng những biện pháp xử lý stress khác nhau cũng có tác dụng đẩy mạnh sự cảm ứng phôi của các mầm cây chồi đỉnh và nụ hoa. Ở tế bào trần của lá cỏ Linh lăng, nitroprusside natri – có vai trò cung cấp NO – chỉ thể hiện khả năng kích thích sự hình thành các tế bào phôi khi có mặt auxin trong môi trường nuôi cấy (Ötvös *et al.*, 2005).

TRANG THÁI CỦA CÁC TẾ BÀO PHÁT SINH PHÔI

Trước đây, việc khởi sự quá trình phát triển phát

sinh phôi ở các tế bào đã biệt hóa thì đòi hỏi một quá trình tái chương trình hóa tế bào hoàn chỉnh. Các chức năng đã biệt hóa thì bị loại bỏ và sau một giai đoạn chuyển đổi, một chương trình mới để phát triển phôi lại được khởi động. Mặc dù quá trình tái tổ chức này đi kèm với những thay đổi hoàn toàn về mặt hình thái và sinh lý, việc tái chương trình hóa kiểu biểu hiện tổng thể của các gen là hết sức quan trọng. Trong những năm gần đây, việc kiểm soát nghiêm ngặt sự cải biến của các nhiễm sắc thể phản ứng lại các tín hiệu môi trường và tín hiệu phát triển nhằm xác định chính xác vị trí và thời điểm biểu hiện của các gen này thì đã được chấp nhận rộng rãi (Li *et al.*, 2002). Mức độ tổ chức cao của nhiễm sắc thể sẽ tạo ra tính ổn định về kiểu biểu hiện của những gen xác định vùng nào của bộ gen là im lặng hay hoạt động trong tế bào hoặc trong giai đoạn phát triển đang khảo sát (Wagner, 2003). Những bằng chứng thực nghiệm đã chứng tỏ được tầm quan trọng của cấu trúc nhiễm sắc thể trong việc điều hòa sự chuyển vị sinh phôi. Ví dụ, việc bất hoạt một số gen trong bộ nhiễm sắc thể có vai trò quan trọng trong việc quyết định sự sinh trưởng của phôi và nội nhũ của *Arabidopsis*. Người ta đã xác định được những gen đột biến mã hóa cho những protein tương tự như những protein có chức năng bất hoạt nhiễm sắc thể (nhóm Polycomb) trong suốt quá trình phát triển của ruồi giấm ở *Arabidopsis*. Kết quả của những đột biến này là sự hình thành hạt hoặc nội nhũ mà không lệ thuộc vào quá trình thụ phấn (Chaudhury *et al.*, 2001; Grossniklaus *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 1999; Ohad *et al.*, 1999). Dạng đột biến *medea* gây ra sự thiếu hụt protein trong cùng một con đường điều hòa (Grossniklaus *et al.*, 1998; Kiyosue *et al.*, 1999). Các kết quả nghiên cứu cho thấy chương trình phát sinh phôi bị ức chế bởi các gen im lặng trong nhiễm sắc thể và sau đó được kích hoạt nhằm đáp ứng với sự thụ phấn.

Một dạng đột biến nữa ở *Arabidopsis*, *pickle* (*pkl*), có kiểu hình được xác định dựa trên sự biểu hiện của các marker phôi chuyên biệt trong giai đoạn hậu phát sinh phôi và quá trình tái sinh tự phát của các phôi sinh dưỡng ở rễ (Ogas *et al.*, 1997, 1999). Sản phẩm của gen *pkl* được mô tả như là một nhân tố tái tổ chức nhiễm sắc thể mà có thể ức chế sự biểu hiện của những gen liên quan đến sự phát sinh phôi cũng như điều hòa sự chuyển vị phát triển từ trạng thái phát sinh phôi sang trạng thái sinh dưỡng (Ogas *et al.*, 1999). Ngoài việc tổ chức nhiễm sắc thể, sự điều hòa trực tiếp của các gen liên quan đến các nhân tố phiên mã đặc hiệu. Cho tới nay, nhiều nhân tố phiên mã (*leafy cotyledon 1* và *2*, *wuschell*, *baby woom*) đã được xác định là có liên quan đến sự phát sinh phôi hợp tử và gây ra sự lệch vị trí trong quá trình hình thành phôi

nếu chúng được biểu hiện trong mô sinh dưỡng (Boutillier *et al.*, 2002; Lotan *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2002). Mỗi liên hệ giữa sự tái tổ chức nhiễm sắc thể và những nhân tố phiên mã này đã được chứng minh bằng cách làm giảm tác dụng ức chế biểu hiện của *lec1* trong đột biến *pickle*, và điều này đã dẫn tới sự phát triển phôi ở rễ (Ogas *et al.*, 1999). *Pickle* được nhận định là nhân tố ức chế tế bào phát sinh phôi trong tất cả các mô sinh dưỡng (Henderson *et al.*, 2004), nhưng người ta cũng đã chứng minh được rằng có thể chọn lọc được những chức năng không ức chế sự phát sinh phôi trong những đột biến *pickle* (Dean Rider *et al.*, 2003).

Dựa vào những bằng chứng trên, chúng ta có thể đưa ra giả thiết rằng trong suốt quá trình cảm ứng phát sinh phôi sinh dưỡng, sự tái tổ chức của nhiễm sắc thể đã làm giảm chương trình phát sinh phôi, mặt khác bị ức chế bởi các cơ chế bất hoạt nhiễm sắc thể trong các tế bào sinh dưỡng thực vật. Những protein có chứa vùng nhiễm sắc thể có cấu trúc tương tự Polycomb đã được tìm thấy trong quá trình phát sinh phôi hợp tử và phôi sinh dưỡng của Cà rốt (Kiyosue *et al.*, 1998). Ngoài ra, sự biểu hiện của *lec1* trong suốt quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng đã được chứng minh ở Cà rốt và cỏ Linh lăng (Yazawa *et al.*, 2004; Fehér *et al.*, kết quả chưa công bố). Ở Cà rốt, gen *c-lec1* xuất hiện trong các mẫu cây phôi và gen này biểu hiện rõ chỉ 1 ngày sau khi cây chuyển sang môi trường không có 2,4-D (Yazawa *et al.*, 2004), nhưng ở cỏ Linh lăng, khi gây shock mẫu cây bằng 2,4-D trong 1 h sau nhiều tuần nuôi cấy trong môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng, sự biểu hiện của *ms-lec1* chỉ gia tăng vào giai đoạn biệt hóa phôi (3 tuần sau khi cảm ứng, Fehér *et al.*, 2003). Nghiên cứu này đã củng cố cho giả thuyết rằng ở hệ thống nuôi cấy phát sinh phôi cây Cà rốt thì quá trình phát sinh phôi diễn ra trước khi mẫu cây được cấy chuyển sang môi trường không có 2,4-D.

Nếu chúng ta chấp nhận vai trò quan trọng của sự tái tổ chức nhiễm sắc thể trong giai đoạn đầu của chương trình phát sinh phôi, thì câu hỏi chính vẫn là: dấu hiệu chính là gì và làm thế nào mà dấu hiệu đó gây ra sự tái tổ chức nhiễm sắc thể và tái chương trình hóa sự biểu hiện của gen trong suốt quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng? Về khía cạnh này, cần chú ý là sự biểu hiện sai vị trí của nhân tố phiên mã *wuschel* trong rễ cây, cộng với auxin, đã cho tác dụng cảm ứng tạo các tế bào thân rễ, cảm ứng sự phát triển lá, sự phát triển hoa và quá trình phát sinh phôi (Gallois *et al.*, 2004). Những kết quả này đã chỉ ra rằng mặc dù sự có mặt của auxin là cần thiết, nhưng một mình nó vẫn

chưa đủ để khởi sự quá trình phát sinh phôi ở các tế bào sinh dưỡng thực vật. Vì vậy, một hệ thống hợp lý để cảm ứng phát sinh phôi sinh dưỡng có thể được thiết lập dựa trên 2 nhân tố: auxin (chịu trách nhiệm tạo môi trường nội bào thích hợp) và một số nhân tố chưa biết khác (bao gồm stress - điểm nhấn kích hoạt chương trình phát sinh phôi).

MỘT SỐ THÀNH QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA PHÂN VIỆN SINH HỌC TẠI ĐÀ LẠT

Bắt đầu từ năm 1996, Phân Viện Sinh học tại Đà Lạt đã tiến hành nghiên cứu thử nghiệm một số hệ thống nuôi cấy phát sinh phôi trên một số đối tượng cây trồng và bước đầu đã thu được một số kết quả nhất định.

Đầu tiên là kết quả sự phát sinh phôi sinh dưỡng trên đối tượng cây hoa Lily (*Lilium longiflorum*) bằng việc sử dụng các phương pháp khác nhau: (1) **Phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL – thin cell layer)**. Sự phát sinh phôi sinh dưỡng có thể đạt được trực tiếp thông qua quá trình nuôi cấy lớp mỏng cắt ngang (tTCL) các tế bào giả hành của Lily. Sau 45 ngày nuôi cấy các mẫu cây tTCL có kích thước khác nhau trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 5,4 μM NAA và 1,1 μM TDZ thì thu được các cấu trúc giống phôi (phôi hình cầu). Các cấu trúc giống phôi này sau đó được tách ra và cho tăng sinh khối trên môi trường MS có chứa 5,4 μM NAA và 0,4 μM TDZ sau mỗi 45 ngày. Mẫu cây có độ dày 0,8 - 1,0 mm được cho là tối ưu để đạt được số lượng những cấu trúc giống phôi cao nhất. Để tái sinh thành cây con thì những cấu trúc này được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose và không chứa chất điều hòa sinh trưởng. Tất cả các cấu trúc này sẽ hình thành cây con sau 90 ngày nuôi cấy (Nhut *et al.*, 2002). (2) **Phương pháp nuôi cấy lá**. Mục đích của nghiên cứu này là thiết lập một phương pháp đơn giản và hiệu quả nhất nhằm đạt được sự tỷ lệ phát sinh phôi sinh dưỡng và tái sinh cây cao nhất ở *Lilium longiflorum* 'Easter Lily'. Sự hình thành các tế bào phát sinh phôi đã đạt được từ các tế bào mô sẹo xộp được nuôi cấy trong môi trường MS rắn hoặc lỏng ở những thể tích khác nhau có bổ sung 1,0 mg/l NAA và 0,2 mg/l TDZ. Tuy nhiên, số lượng phôi sinh dưỡng đạt được từ việc nuôi cấy các tế bào mô sẹo có khả năng phát sinh phôi trong môi trường lỏng, đặc biệt ở thể tích 20 ml, thì cao hơn so với môi trường rắn, 170 phôi so với 28 phôi, và hình thái của phôi sinh dưỡng trong các giai đoạn phát triển khác nhau (hình cầu,

hình tim, hình lá mầm) thì được phân biệt rõ ràng dưới kính hiển vi. Các tế bào mô sẹo chìm trong môi trường lỏng thì bị chết do không thể hô hấp trong khi các tế bào mô sẹo nổi trên bề mặt thì trải qua quá trình phát sinh phôi. Các phôi sinh dưỡng trưởng thành được cấy chuyển sang môi trường 1/2 MS không chứa chất điều hoà sinh trưởng để nảy mầm và phát triển thành cây con. Có khoảng 78% phôi phát triển thành cây con với rễ và lá mầm bình thường (Hình 7). Những cây tái sinh 1 tháng tuổi được chuyển ra vườn ươm và tỷ lệ sống sót là 98%. Sau 6 tháng, các cây tái sinh từ phôi sinh dưỡng (hơn 1500 cây) tỏ ra khỏe mạnh hơn so với những cây tái sinh từ quá trình phát sinh cơ quan trực tiếp (Nhut *et al.*, 2001). (3) **Phương pháp nuôi cấy giả hành.** Phương pháp này sử dụng giả hành từ các đốt thân có nguồn gốc từ chồi đỉnh *in vitro*. Các chồi đỉnh từ thân của các củ ngũ đồng được nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS. Thân của những cây tái sinh từ chồi đỉnh được cắt ra thành từng nốt, sau đó được nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 1,0 μM BA. Khi nuôi cấy các mẫu cây giả hành trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 2,3 μM BA thì một số lượng lớn chồi được hình thành. Những chồi này được cấy chuyển sang môi trường 1/2 MS có bổ sung 1,1 μM NAA để cho ra rễ. Một hệ thống nhân giống liên tục bằng cách nhân giả hành không trải qua giai đoạn ngủ đông được phát triển. 80 cây có hoa tái sinh từ nuôi cấy chồi đỉnh được chuyển ra vườn ươm trong 3 tháng và sau đó được trồng trong vườn thực nghiệm trong 8 tháng (Nhut, 1998).

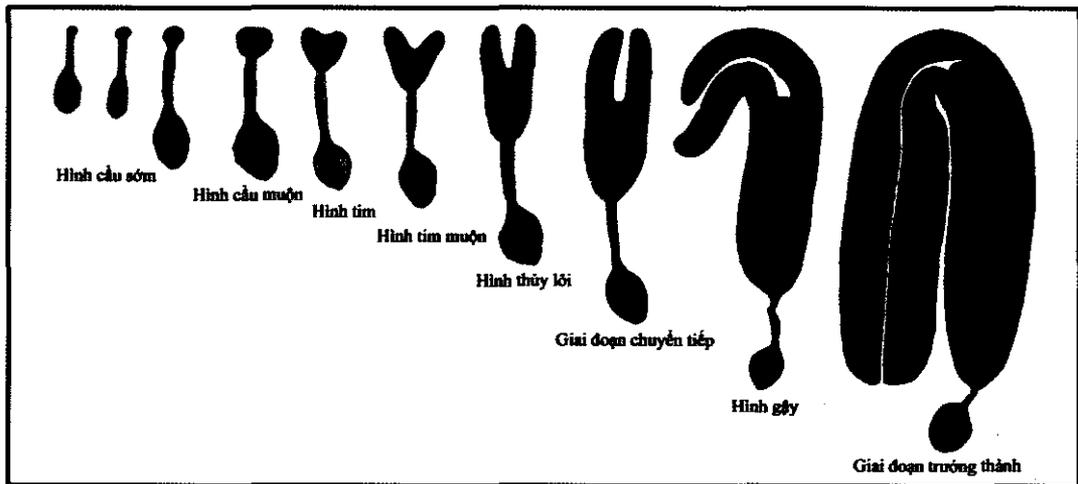
Với đối tượng hoa Cát tường (*Eustoma grandiflorum*), chúng tôi tiến hành cảm ứng phát sinh phôi sinh dưỡng thông qua hệ thống nuôi cấy lá *in vitro*. Mỗi lá của cây *in vitro* được cắt thành hai mảnh theo chiều ngang và được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA, NAA và 2,4-D riêng rẽ hoặc kết hợp. Những tế bào mô sẹo có khả năng phát sinh phôi được hình thành từ các mẫu cấy trong môi trường MS có bổ sung 2,4-D với các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 hoặc 4,0 mg/l) trong điều kiện nuôi cấy tối hoàn toàn. Tỷ lệ hình thành các tế bào mô sẹo có khả năng phát sinh phôi là 85,5% trong tất cả các mảnh lá được cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D sau 30 ngày nuôi cấy. Các tế bào mô sẹo có khả năng phát sinh phôi này được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 1 mg/l NAA và BA (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 và 5,0 mg/l) nhằm cảm ứng tạo các cấu trúc giống phôi (ELS) hay phôi hình cầu. Một tỷ lệ ELS cao đạt được khi nuôi cấy các tế bào mô sẹo có khả năng phát sinh phôi trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA và 0,1

mg/l NAA sau 15 ngày nuôi cấy. Sự hình thành phôi sinh dưỡng diễn ra trong môi trường có bổ sung BA với các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 và 5,0 mg/l) và 100% phôi sinh dưỡng tái sinh thành cây con sau khi cấy chuyển các phôi trưởng thành sang môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l BA. Sau 21 ngày nuôi cấy, quá trình phát triển vẫn diễn ra bình thường (Nhut *et al.*, 2006).

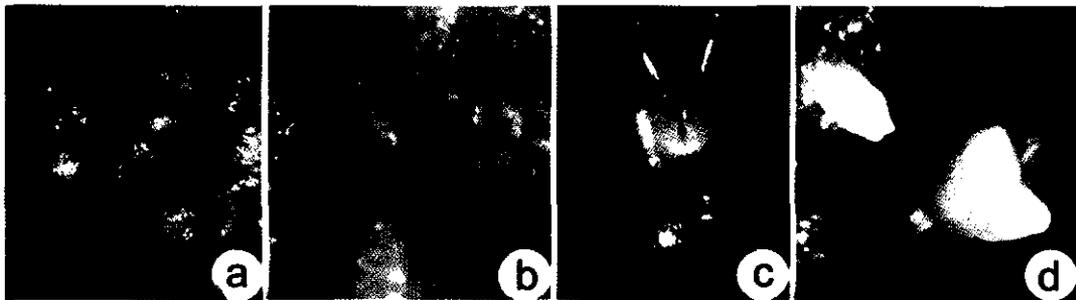
Trên đối tượng cây Lúa (*Oryza sativa* L.), chúng tôi đã thiết lập một hệ thống mới và đơn giản nhằm tái sinh chồi của cây Lúa trực tiếp trong một thời gian ngắn với số lượng lớn. Các mẫu cây tTCL được cắt từ các mô phân sinh đỉnh chồi của các cây 2 tuần tuổi đã được tiền xử lý trong tối với 2,4-D (nồng độ từ 1,0 - 20 $\mu\text{M/l}$). Các phôi sinh dưỡng và các cấu trúc giống phôi (sẽ phát triển thành chồi) được giữ trong tối 2 tuần sau khi cấy các mẫu tTCL, và đã tạo ra tối đa là 6 phôi sinh dưỡng và 16 chồi trên mỗi mẫu cây tTCL. Giai đoạn nuôi cấy 2 tuần trong tối rồi sau đó chuyển ra sáng cũng quan trọng trong sự tái sinh chồi. Các chồi tái sinh sau đó được cấy chuyển sang môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng để cho ra rễ. Có hơn 95% cây con phát triển bình thường khi chúng được chuyển ra vườn ươm (Nhut *et al.*, 2000).

Bên cạnh đó, chúng tôi cũng tiến hành nghiên cứu tái sinh và vi nhân giống hoa Lay-on (*Gladiolus*) bằng hệ thống nuôi cấy lỏng lác. Trong hệ thống này, mẫu được sử dụng là những chồi lấy từ thân hành cắt dọc nuôi cấy trên môi trường MS lỏng có bổ sung 2,2 μM BA và 30 g/l đường sucrose. Bốn nguồn mẫu cây (đỉnh chồi, lát cắt ngang thân hành, đế củ và thân hành con) được sử dụng để kiểm tra khả năng hình thành chồi đồng nhất. Sáu chồi đồng nhất và khỏe mạnh lấy từ mẫu cắt dọc của thân hành (ổn định nhất và có khả năng tăng sinh tốt nhất) trên môi trường MS rắn có bổ sung 2,2 μM BA và 30 g/l đường sucrose sau 15 ngày nuôi cấy. Để tiếp tục nhân chồi thì những chồi mới này được cấy chuyển sang môi trường lỏng tương tự có thể tích 50 ml. Sự hình thành cây con và thân hành đã đạt được khi nuôi cấy những chồi này trên môi trường MS rắn có bổ sung IBA (từ 1,0 - 2,5 μM) với cường độ dòng photon quang hợp lần lượt là 30 và 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ở điều kiện nhiệt độ lần lượt là 15, 20 và 25°C (Nhut *et al.*, 2004).

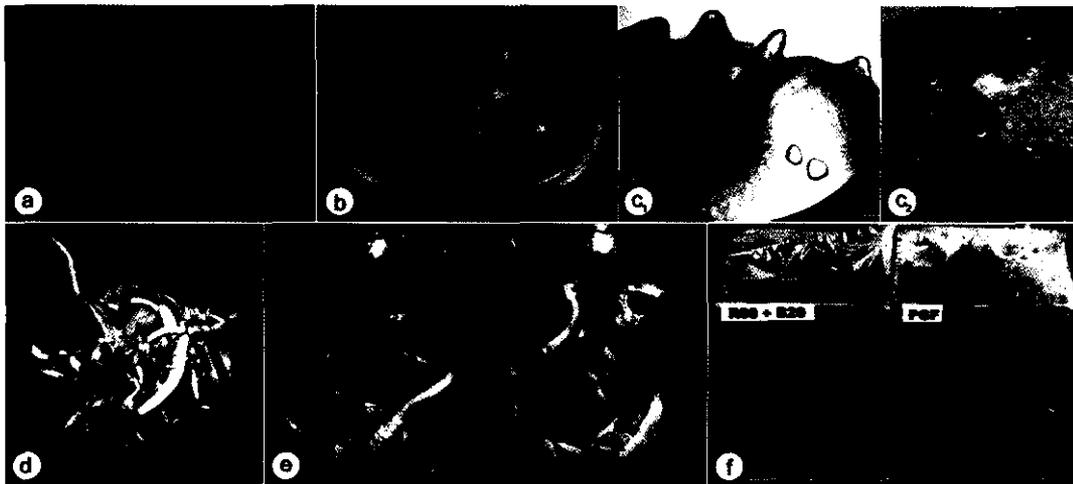
Ngoài ra, chúng tôi còn tiến hành nghiên cứu phát sinh phôi trên một số đối tượng khác như: Địa lan (Hình 5), lan Hồ điệp (Hình 6), hoa African violet (Hình 8), Sâm Ngọc linh (Hình 9), hoa Cẩm chướng, hoa Hồng, hoa Chuông, một số giống Phong lan, cây Hồng, Khoai tây, Dâu tây, Chè, Hồng Môn... (số liệu chưa công bố).



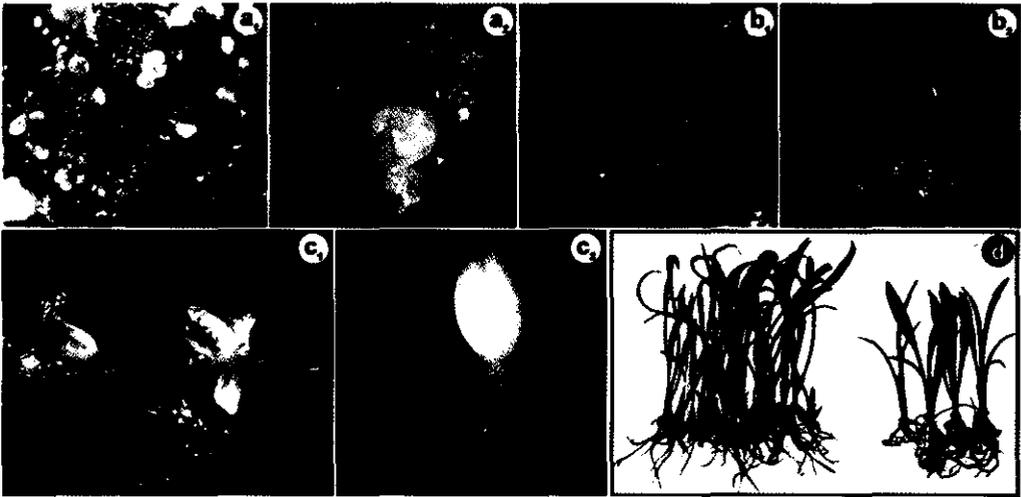
Hình 4. Các biến đổi hình thái phôi hợp tử cây Tè thái (*Capsella bursa-pastoris*) (Schaffner, 1906).



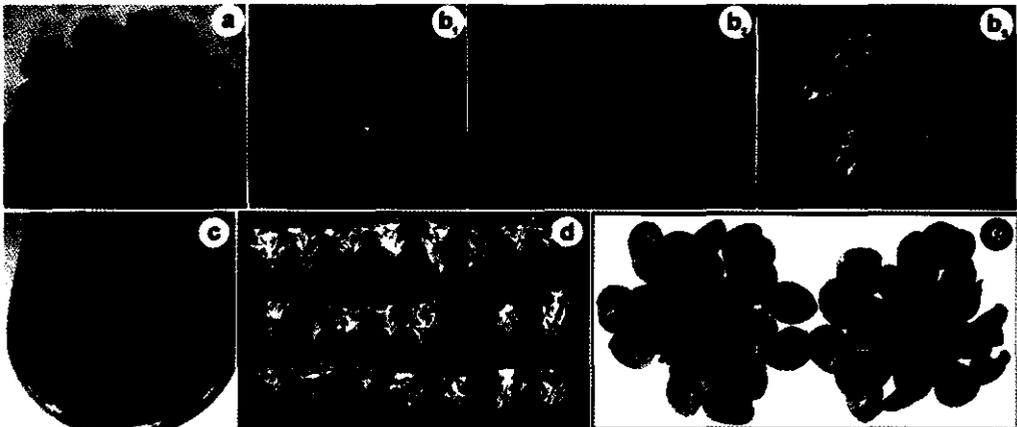
Hình 5. Các giai đoạn phát triển của phôi Địa lan (*Cymbidium* spp.). a. Phôi hình cầu; b. Phôi hình tim; c. Phôi hình thùy lõi; d. Phôi dạng có lá mầm.



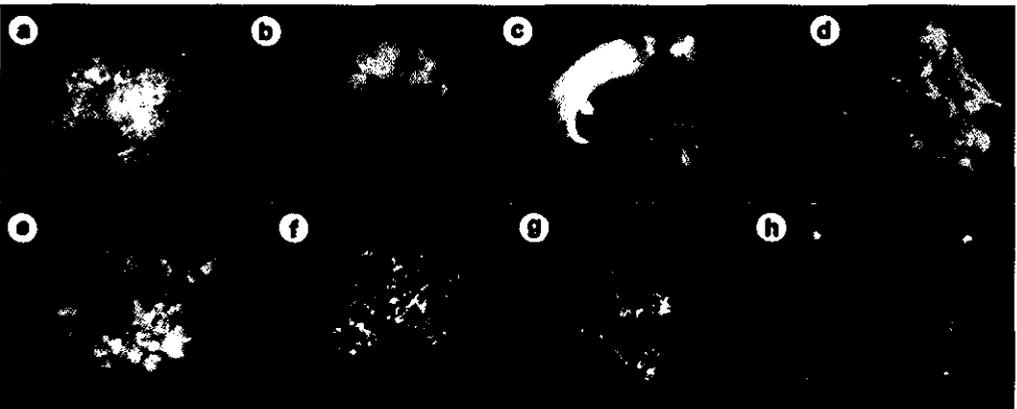
Hình 6. Các giai đoạn phát sinh phôi và ứng dụng trong nhân giống cây lan Hồ điệp (*Phalaenopsis* spp.). a. Mô sẹo có cấu trúc phôi trong môi trường nuôi cấy có đường; b. Phôi biệt hóa thành PLB trong môi trường nuôi cấy không đường; c₁, c₂. Quan sát cấu trúc giống phôi dưới kính hiển vi soi nổi; d. Phôi biệt hóa thành cây non; e. Cây con sinh trưởng trong môi trường chuyển tiếp; f. Cây lan Hồ điệp có nguồn gốc từ phôi nuôi cấy quang tự dưỡng dưới hệ thống chiếu sáng đơn sắc và hệ thống film.



Hình 7. Các giai đoạn sinh trưởng phát triển của phôi vô tính cây hoa Lily (*Lilium longiflorum*). a₁, a₂. Phôi ở giai đoạn hình cầu; b₁, b₂. Phôi ở giai đoạn hình tim; c₁, c₂. Sự phát triển của phôi thành các cây hoàn chỉnh; d. Cây có nguồn gốc từ vảy củ (trái) và cây có nguồn gốc từ phôi (phải).



Hình 8. Các giai đoạn sinh trưởng phát triển của phôi vô tính cây hoa African violet (*Saintpaulia inoantha*). a. Mô sẹo có cấu trúc giống phôi; b₁, b₂, b₃. Sự phát triển của phôi từ mô sẹo; c. Các cây được tái sinh từ phôi; d. Cây có nguồn gốc từ phôi; e. Cây hoa African violet có nguồn gốc từ phôi.



Hình 9. Các giai đoạn sinh trưởng phát triển của phôi vô tính cây Sâm Ngọc linh (*Panax vietnamensis*). a. Mô sẹo có cấu trúc giống phôi; b. Sự phát triển của phôi từ mô sẹo; c, d, e, f, g. Sự phát sinh cơ quan của phôi; h. Cây có nguồn gốc từ phôi.

KẾT LUẬN VÀ NHỮNG TRIỂN VỌNG TRONG TƯƠNG LAI

Trong khi các nhân tố cảm ứng phát sinh phôi sinh dưỡng là rất phong phú, thì những đáp ứng tế bào thông thường vẫn còn rất tổng quát. Sự phát sinh phôi sinh dưỡng *in vitro* liên quan đến một số các điều kiện nhân tạo, mức nồng độ cao của các chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh và nhiều nhân tố stress khác. Những điều kiện này có thể gây ra một phản ứng stress thông thường ở các tế bào đang tái tổ chức nhiễm sắc thể. Sự hiện diện của auxin như là một nhân tố điều hòa sinh trưởng có thể quan trọng trong việc cung cấp cho các tế bào này sự linh động cần thiết trong quá trình phát triển, ví dụ: thúc đẩy quá trình phân biệt hóa. Theo quan điểm này, khả năng áp dụng 2,4-D để cảm ứng phát sinh phôi sinh dưỡng thì dựa vào khả năng gây ra các phản ứng stress và auxin (trong cùng một thời điểm) của nó.

Việc tăng cường sự tái tổ chức nhiễm sắc thể được gây ra bởi các điều kiện cảm ứng có thể ngẫu nhiên tạo ra các chương trình phát sinh phôi bình thường mà bị ức chế bởi các cơ chế bất hoạt một số gen trong nhiễm sắc thể. Auxin (ngoại sinh hay nội sinh) là rất cần thiết cho sự biểu hiện của các chương trình phát sinh phôi, nó đảm bảo cho sự sống sót của các tế bào, cung cấp các điều kiện sinh lý phù hợp, cảm ứng phân bào hoặc cung cấp một số con đường cần thiết. Có rất nhiều sự kiện xảy ra trong quá trình hình thành các tế bào phát sinh phôi. Đó là lý do tại sao tất cả các tế bào của mẫu cấy trong cùng một nghiệm thức đều có khả năng phát triển thành phôi, và là lý do tại sao các loại mẫu cấy, kiểu gen và các loài khác nhau thì cần những điều kiện cảm ứng phôi khác nhau. Giả thuyết này được tóm tắt trong hình 3 và nó cần phải được chứng minh bằng các dữ liệu thực nghiệm của các nghiên cứu về quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng và phôi hợp tử.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn Phòng Công nghệ thực vật, Phân Viện Sinh học tại Đà Lạt đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành những nghiên cứu về phôi vô tính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, Hecht VF, Dresselhaus T, Lorz H, Dumas C, Rogowsky PM (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* 213: 1-10.

Bicknell RA, Koltunow AM (2004) Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell* 16: 228-245.

Bögre L, Stefanov I, Abraham M, Somogyi I, Dudits D (1990) Differences in the responses to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) treatment between embryo-genic and nonembryogenic lines of alfalfa. In: Nijkamp HJJ, van der Plaas LHW, Van Aartrijk J (eds.) *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer, Dordrecht: 427-436.

Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AA, Miki BL, Custers JB, Lookeren Campagne MM (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14: 1737-1749.

Bowley SR, Kielly GA, Anandarajah K, McKersie BD, Senaratna T (1993) Field-evaluation following 2 cycles of backcross transfer of somatic embryogenesis to commercial alfalfa. *Germplasm. Can J Plant Sci* 73: 131-137.

Campanoni P, Nick P (2005) Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol* 137: 939-948.

Charrière F, Sotta B, Miginiac É, Hahne G (1999) Induction of adventitious or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiol Biochem* 37: 751-757.

Chaudhury AM, Koltunow A, Payne T, Luo M, Tucker MR, Dennis ES, Peacock WJ (2001) Control of early seed development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 677-699.

Chuck G, Hake S (2005) Regulation of developmental transitions. *Curr Opin Plant Biol* 8: 67-70.

Dean Rider SJr, Henderson JT, Jerome RE, Edenberg HJ, Romero-Severson J, Ogas J (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in Arabidopsis. *Plant J* 35: 33-43.

Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J Cell Sci* 99: 475-484.

Dương Tấn Nhựt (2007) *Công nghệ sinh học thực vật, tập 1*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, thành phố Hồ Chí Minh.

Dương Tấn Nhựt, Trần Ngọc Thùy Tiên, Mai Thị Ngọc

- Hương, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Phan Xuân Huyền, Bùi Văn Lê, Đỗ Năng Vịnh (2004) Một số kết quả nghiên cứu về hạt nhân tạo của hoa Lily (*Lilium sp.*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(3): 359-370.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 201-228.
- Fehér A, Pasternak TP, Ötvös K, Dudits D (2005) Plant protoplasts: consequences of lost cell walls. In: Murch S, Saxena PK (eds.) *Journey of a single cell to a plant*. Science Publishers Inc., Enfield, NH, USA: 59-89.
- Gallois JL, Nora FR, Mizukami Y, Sablowski R (2004) WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev* 18: 375-380.
- Grimanelli D, Perotti E, Ramirez J, Leblanc O (2005) Timing of the maternal-to-zygotic transition during early seed development in maize. *Plant Cell* 17: 1061-1072.
- Grossmann K (1996) A role for cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the development of stress symptoms. *Physiol Plant* 97: 772-775.
- Grossmann K (2000) Mode of action of auxinic herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends Plant Sci* 5: 506-508.
- Grossmann K, Hansen H (2001) Ethylene-triggered abscisic acid: a principle in plant growth regulation? *Physiol Plant* 113: 9-14.
- Grossniklaus U, Spillane C, Page DR, Kohler C (2001) Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Curr Opin Plant Biol* 4: 21-27
- Grossniklaus U, Vielle-Calzada JP, Hoepfner MA, Gagliano WB (1998) Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280: 446-450.
- Györgyey J, Gartner A, Nemeth K, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Bors E, Dudits D (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol* 16: 999-1007.
- Györgyey J, Nemeth K, Magyar Z, Kelemen Z, Alliotte T, Inze D, Dudits D (1997) Expression of a novel-type small proline-rich protein gene of alfalfa is induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in dedifferentiated callus cells. *Plant Mol Biol* 34: 593-602.
- Halperin W (1969) Morphogenesis in cell cultures. *Annu Rev Plant Physiol* 20: 395-418.
- Hansen H, Grossmann K (2000) Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol* 124: 1437-1448.
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt ED, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC (2001) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* 127: 803-816.
- Henderson JT, Li HC, Rider SD, Mordhorst AP, Romero-Severson J, Cheng JC, Robey J, Sung ZR, de Vries SC, Ogas J (2004) PICKLE acts throughout the plant to repress expression of embryonic traits and may play a role in gibberellin-dependent responses. *Plant Physiol* 134: 995-1005.
- Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 34: 107-114.
- Imin N, Nizamudin M, Daniher D, Nolan KE, Rose RJ, Rolfe BG (2005) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiol* 137: 1250-1260.
- Jiménez VM, Thomas C (2005) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. In: Mujib A, Šamaj J (eds.) *Somatic embryogenesis*, *Plant Cell Monogr*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 103-118.
- Kairong C, Gengsheng X, Xinmin L, Gengmei X, Yafu W (1999) Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci* 146: 9-16.
- Kamada H, Ishikawa K, Saga H, Harada H (1993) Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tiss Cult Lett* 10: 38-44.
- Kielly GA, Bowley SR (1992) Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome* 35: 474-477.
- Kitamiya E, Suzuki S, Sano T, Nagata T (2000) Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Rep* 19: 551-557.
- Kiyosue T, Ohad N, Yadegari R, Hannon M, Dinneny J, Wells D, Katz A, Margossian L, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (1999) Control of fertilization-independent endosperm development by the MEDEA polycomb gene in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4186-4191.
- Kiyosue T, Shiota H, Higashi K, Kamada H, Shinozaki

- K (1998) A chromo box gene from carrot (*Daucus carota* L.): its cDNA structure and expression during somatic and zygotic embryogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1398: 42-46.
- Kranz E (1999) *In vitro* fertilization with isolated single gametes. *Methods Mol Biol* 111: 259-267.
- Kranz E, von Wiegen P, Lörz H (1995) Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following *in vitro* fertilization with angiosperm gametes. *Plant J* 8: 9-23.
- Krishna Raj S, Vasil IK (1995) Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In: Thorpe TA (ed.) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer, Dordrecht: 417-470.
- Li G, Hall TC, Holmes-Davis R (2002) Plant chromatin: development and gene control. *Bioessays* 24: 234-243.
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MAL, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195-1205.
- Luo M, Bilodeau P, Koltunow A, Dennis ES, Peacock WJ, Chaudhury AM (1999) Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 296-301.
- Michalczuk L, Cooke TJ, Cohen JD (1992) Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* 31: 1097-1103.
- Michalczuk L, Ribnicky DM, Cooke TJ, Cohen JD (1992) Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol* 100: 1346-1353.
- Moltrasio R, Robredo CG, Gomez MC, Paleo AHD, Diaz DG, Rios RD, Franzone PM (2004) Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77: 119-124.
- Mordhorst AP, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) Plant embryogenesis. *Crit Rev Plant Sci* 16: 535-576.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Neumann KH (2000) Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/>
- Nguyễn Văn Uyên (2006) *Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Nhut DT (1998) Micropropagation of Lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant Cell Rep* 17: 913-916.
- Nhut DT, Le BV, Tran Thanh Van K (2000) Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture of apical meristematic tissue. *J Plant Physiol* 157(5): 559-565.
- Nhut DT, Le BV, da Silva JAT, Aswath CR (2001) Thin cell layer culture system in *Lilium*: regeneration and transformation perspective. *In Vitro Cell Biol Dev - Plant* 37: 516-523.
- Nhut DT, Le BV, Minh NT, da Silva JAT, Fukai S, Tanaka M, Tran Thanh Van K (2002) Direct somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. *Plant Grow Reg* 37(2): 193-198.
- Nhut DT, da Silva JAT, Huyen PX, Paek KY (2004) The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture. *Sci Hort* 102(4): 407-414.
- Nhut DT, Hanh NTM, Tuan PQ, Nguyet LTM, Tram NTH, Chinh NC, Nguyen NH, Vinh DN (2006) Liquid culture as a positive condition to induce and enhance quality and quantity of somatic embryogenesis of *Lilium longiflorum*. *Sci Hort* 110: 93-97.
- Nhut DT, Tuan NS, Ngoc HM, Uyen PN, Don NT, Mai NT, da Silva JAT (2006) Somatic embryogenesis induction from *in vitro* leaf cultures of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* L.). *Prop Orn Plants* 6(3): 121-127.
- Nishiwaki M, Fujino K, Koda Y, Masuda K, Kikuta Y (2000) Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 211: 756-759.
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003) Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol* 133: 218-230.
- Nomura K, Komamine A (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiol* 79: 988-991.
- Ogas J, Cheng JC, Sung ZR, Somerville C (1997) Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science* 277: 91-94.
- Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative

- development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13839-13844.
- Ohad N, Yadegari R, Margossian L, Hannon M, Michaeli D, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (1999) Mutations in FIE, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* 11: 407-416.
- Osga K, Masuda H, Komamine A (1999) Synchronization of somatic embryogenesis at high frequency using carrot suspension cultures: model systems and application in plant development. *Methods Cell Sci* 21: 129-140.
- Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szűcs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J* 43: 849-860.
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Fehér A (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol* 129: 1807-1819.
- Raghavan C, Ong EK, Dalling MJ, Stevenson TW (2005) Effect of herbicidal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Funct Integr Genomics* 5: 4-17.
- Reynolds TL (1997) Pollen embryogenesis. *Plant Mol Biol* 33: 1-10.
- Ribnicky DM, Cohen JD, Hu WS, Cooke TJ (2001) An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta* 214: 505-509.
- Šamaj J, Baluška F, Pretová A, Volkmann D (2003) Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmic to cortical cytoskeletal arrays. *Plant Cell Rep* 21: 940-945.
- Schaffner M (1906) The embryology of the Shepherd's Purse. *Ohio Nature* 7: 1-8.
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen MA, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049-2062.
- Senger S, Mock HP, Conrad U, Manteuffel R (2001) Immunomodulation of ABA function affects early events in somatic embryo development. *Plant Cell Rep* 20: 112-120.
- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep* 19: 718-726.
- Sprunck S, Baumann U, Edwards K, Langridge P, Dresselhaus T (2005) The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant J* 41: 660-672.
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11806-11811.
- Suprasanna P, Bapat VA (2005) Differential gene expression during somatic embryogenesis. In: Mujib A, Šamaj J (eds.) Somatic embryogenesis, *Plant Cell Monogr*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 305-320.
- Taylor RL (1967) The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. *Can J Bot* 45: 1553-1556.
- Thibaud-Nissen FO, Shealy RT, Khanna A, Vodkin LO (2003) Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiol* 132: 118-136.
- Thomas C, Meyer D, Himber C, Steinmetz A (2004) Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol Biochem* 42: 35-42.
- Thorpe TA (1995) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer, Dordrecht Toonen MAJ, Hendriks T, Schmidt EDL, Verhoeven HA, van Kammen A, de Vries SC (1994) Description of somatic-embryo forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194: 565-572.
- Toonen MAJ, Schmidt EDL, Hendriks T, Verhoeven HA, van Kammen A, de Vries SC (1996) Expression of the JIM8 cell wall epitope in carrot somatic embryogenesis. *Planta* 200: 167-173.
- Wagner D (2003) Chromatin regulation of plant development. *Curr Opin Plant Biol* 6: 20-28.
- Woeste KE, Ye C, Kieber JJ (1999) Two *Arabidopsis* mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiol* 119: 521-530.
- Yarbrough JA (1932) Anatomical and developmental studies of the foliar embryos of *Bryophyllum calycinum*. *Am J Bot* 19: 443-453.
- Yazawa K, Takahata K, Kamada H (2004) Isolation of

the gene encoding Carrot leafy cotyledon 1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiol Biochem* 42: 215-223.

Zheng H, Hall C (2001) Understanding auxinic herbicide resistance in wild mustard: physiology,

biochemical, and molecular genetic approaches. *Weed Sci* 49: 276-281.

Zuo J, Niu QW, Frugis G, Chua NH (2002) The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J* 30: 349-359.

THE EMBRYOGENESIS OF PLANT SOMATIC CELLS

Duong Tan Nhut*, Nguyen Thanh Hai, Nguyen Duc Huy, Luong Ngoc Thuan

Dalat Affiliate Institute of Biology

SUMMARY

Embryogenesis in plants is not restricted to the fertilized egg cell but can be naturally or artificially induced in many different cell types, including somatic cells. Although genetic components clearly determine the potential of species/genotypes to form somatic embryos, the expression of embryogenic competence at the cellular level is defined by developmental and physiological cues. Competent cells can respond to a variety of conditions by the initiation of embryogenic development. In general, these conditions include alterations in auxin (exogenous and/or endogenous) levels and evoke stress responses. Recent experimental results in the field of developmental and molecular plant biology emphasize the role of chromatin remodelling in the coordination of overall gene expression patterns associated with developmental switches. It can be hypothesized that the initiation of somatic embryogenesis is a general response to a multitude of parallel signals (including auxin and stress factors). In addition to cellular and physiological reorganization, this response includes the extended remodelling of the chromatin and a release of the embryogenic programme otherwise blocked in vegetative cells by chromatin-mediated gene silencing. In this paper we attempt to give a general overview of experimental results supporting the aforementioned hypothesis. In addition, we also outline our results at The Dalat Affiliate Institute of Biology (Vietnam) on somatic embryogenesis of Potato, *Lilium* spp., Carnation, *Phalaenopsis* spp., *Lisianthus* spp., *Paulownia* spp., *Oryza sativa* L., Rose, Strawberry, *Cymbidium* spp., Gloxinia, *Panax vietnamensis*, Tea, *Anthurium* spp., and some native Orchids.

Keywords: Auxin, chromatin remodelling, competent cell, reorganization, somatic embryogenesis, stress responses

* Author for correspondence: Tel: 84-63-831056; Fax: 84-63-831028; E-mail: duongtannhut@yahoo.com