

SỰ TẠO PHÔI SOMA QUÝT ĐƯỜNG (*CITRUS RETICULATA* BLANCO) TỪ NUÔI CÂY PHÔI TÂM

Phạm Thị Bích Thủy, Nguyễn Bảo Toàn

Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Quýt đường là cây trồng khá phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long. Nghiên cứu tạo phôi soma có nhiều ứng dụng sau này trong lĩnh vực vi nhân giống hoặc tạo giống mới bằng kỹ thuật chọn lọc *in vitro*. Kỹ thuật nuôi cấy phôi tâm (nucellar culture) là để đạt được các tế bào soma có đặc tính giống tế bào cây mẹ. Đặc điểm của phôi soma là các cây con có đặc điểm di truyền giống nhau vì cùng phát sinh từ tế bào soma. Nghiên cứu này nhằm mục đích xác định hiệu quả của các loại đường lên sự phát sinh phôi soma. Các thí nghiệm bao gồm tạo callus từ nuôi cấy phôi tâm, xác định hiệu quả của các loại đường sucrose, galactose và lactose lên sự tạo phôi soma, biến đổi phôi soma thành cây con. Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng callus có nguồn gốc từ phôi tâm được hình thành trên môi trường cơ bản BM là môi trường MS được bổ sung 1 mg/l pyridoxine-HCl, 1 mg/l nicotinic acid, 0,2 mg/l thiamine-HCl, 100 mg/l myo-inositol, 500 mg/l malt extract, 50 g/l đường sucrose, 8 g/l agar và 1 mg/l 2,4 D. Sự cảm ứng phát sinh phôi soma từ callus đạt được trên môi trường BM có đường galactose thay thế đường sucrose với hàm lượng 20 g/l. Hai dạng phôi soma được hình thành: trong quá trình phát sinh phôi soma là phôi bình thường và phôi bất thường. Phôi bình thường nảy mầm và phát triển thành cây hoàn chỉnh trên môi trường cơ bản bổ sung 2 g/l than hoạt tính. Phôi bất thường tạo được cây con hoàn chỉnh được lấy từ chồi phát sinh từ phôi bất thường. Các chồi này được tạo rễ trên môi trường cơ bản BM có 2 g/l than hoạt tính.

Từ khóa: Callus, nuôi cấy phôi tâm, phôi bất thường, phôi bình thường, Quýt đường (*Citrus reticulata* Blanco), tạo phôi soma

MỞ ĐẦU

Quýt đường là cây trồng khá phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long. Nghiên cứu tạo phôi soma có nhiều ứng dụng sau này trong lĩnh vực vi nhân giống hoặc tạo giống mới bằng kỹ thuật chọn lọc *in vitro*. Kỹ thuật nuôi cấy phôi tâm (nucellar culture) là để đạt được các tế bào soma có đặc tính giống tế bào cây mẹ. Nuôi cấy phôi tâm là một trong các phương pháp tạo cây sạch bệnh trên họ cam quýt vì các bệnh do virus không truyền qua hạt (Navarro, Juarez, 1977). Phương pháp nuôi cấy này có nhiều lợi ích. Trước hết các cây con xuất phát từ phương pháp này có các đặc điểm giống cây mẹ vì phát sinh từ các tế bào soma, hệ số nhân giống cao. Một lợi ích khác là các callus xuất phát từ nuôi cấy phôi tâm có thể được sử dụng như là nguồn nguyên liệu ban đầu để chọn lọc *in vitro* các biến dị thích nghi với môi trường bất lợi như mặn, phèn, khô hạn. Tuy nhiên, mặt hạn chế của kỹ thuật này là callus phải được tái sinh thành cây thông qua sự hình thành phôi soma (somatic embryos). Sự hình thành phôi soma trên cây có múi chịu tác động bởi nhiều yếu tố. Kochba và Button

(1974) cho rằng, tuổi của callus và nồng độ đường sucrose ảnh hưởng đến sự tạo phôi soma. Các tác giả khác nghiên cứu về chất điều hòa sinh trưởng trên sự hình thành phôi soma trên cây có múi cho rằng auxin, ethephon và abscisic acid (ABA) là các chất có hiệu quả trên sự hình thành phôi soma của cây cam Shamouti (Kochba, Spiegel-Roy, 1977). Trong khi đó, Kobayashi và đồng tác giả (1984) cho rằng cytokinin cũng có hiệu quả trên sự tạo phôi soma. Kochba và đồng tác giả (1982) sử dụng đường galactose, lactose để biến đổi callus của giống cam shamouti thành phôi soma. Ben-hayyim và Neuman (1983) cho rằng glycerol thích hợp sự tạo phôi soma trên cam. Nghiên cứu này nhằm xác định các loại đường trên sự hình thành phôi soma quýt đường (*Citrus reticulata* Blanco).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Quả quýt đường (*Citrus reticulata* Blanco), ở giai đoạn 4 đến 5 tháng tuổi, có đường kính từ 2,5

đến 3 cm, được thu nhận tại vườn quýt của huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường sử dụng trong thí nghiệm là môi trường cơ bản (BM). Môi trường cơ bản BM là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) được bổ sung 1 mg/l pyridoxine-HCl, 1 mg/l nicotinic acid, 0,2 mg/l thiamine-HCl, 100 mg/l *myo*-inositol, 500 mg/l malt extract, 50 g/l đường sucrose và 8 g/l agar Hải Phòng. pH của môi trường được chỉnh ở 5,7 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Các thí nghiệm được đặt trong phòng sinh trưởng có nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$ dưới quang kỳ 16 h được cung cấp bằng các ống đèn huỳnh quang 1,2 m với mật độ dòng photon quang hợp PPFD (photosynthetic photon flux density) là $43 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được sử dụng trong thí nghiệm bao gồm

2,4 Diclorophenoxy acetic acid (2,4 D), Benzyl adenine (BA), Naphthalene acetic acid (NAA) của hãng Merck.

Phương pháp

Phương pháp nghiên cứu dựa trên các thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Tạo callus từ nuôi cấy phôi tâm làm nguồn vật liệu nghiên cứu

Quả quýt sau khi rửa sạch bằng xà phòng và rửa dưới vòi nước 15 phút, được cho vào bình nuôi cấy có chứa cồn 70° lắc trong 2 phút, rửa lại với nước cất vô trùng. Cuối cùng, quả được khử trùng với dung dịch calcium hypochlorite 10% trong 10 phút và rửa 3 lần với nước cất vô trùng. Trong tủ cấy vô trùng, dùng kim mũi giáo cố định quả, sử dụng dao mổ, mổ quả thu nhận hạt non. Hạt quýt non được loại bỏ phôi hữu tính thu nhận phôi tâm theo phương pháp của Tisserat (1987). Hạt non sau khi loại bỏ phôi hữu tính sẽ được cấy vào bình nuôi cấy có đường kính 8 cm và cao 12 cm chứa 30 ml môi trường cơ bản BM bổ sung thêm chất điều hòa sinh trưởng thực vật như sau:

BM + 1 mg/l 2,4D; BM + 1 mg/l NAA; BM + 2 mg/l NAA; BM + 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2,4D; BM + 1 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l BA; BM + 1 mg/l 2,4D + 0,2 mg/l BA

Các bình nuôi cấy được đặt trong tối, chuyển ra phòng tăng trưởng sau hai tuần nuôi cấy. Thí nghiệm

được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely randomized design) với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một bình nuôi cấy chứa 5 hạt. Sau 8 tuần, callus hình thành, chọn các callus rời rạc (friable callus) những callus nén chặt (compact callus) sẽ loại bỏ. Các callus rời rạc được nhân lên trong môi trường cơ bản BM để làm nguồn vật liệu thí nghiệm.

Thí nghiệm 2: Hiệu quả của các loại đường lên sự hình thành phôi soma

Callus quýt đường được tạo từ thí nghiệm 1 ở 32 tuần tuổi được sử dụng thí nghiệm trên môi trường cơ bản BM bổ sung 8 g/l agar, thay thế 50 g/l sucrose bằng các loại và hàm lượng đường khác nhau như galactose (Ga); lactose (La); sucrose (Su). Các thí nghiệm thực thí nghiệm như sau:

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

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 10 lần lặp lại, mỗi lần là một bình nuôi cấy có 6 khối callus (30 mg/khối tương đương đường kính khối khoảng 2,5 mm). Mỗi bình nuôi cấy chứa 30 ml môi trường đặc. Chỉ tiêu theo dõi bao gồm phần trăm cụm callus có sự xuất hiện phôi. Đánh giá số lượng phôi được tạo thành trên mỗi cụm callus.

Thí nghiệm 3: Hiệu quả của nồng độ đường sucrose lên sự phát triển của phôi soma

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

Thí nghiệm 4: Sự biến đổi từ phôi thành cây hoàn chỉnh

Từ phôi hoàn chỉnh

Chọn những phôi trưởng thành chuyển vào môi trường cơ bản BM bổ sung 2 g/l than hoạt tính. Sau bốn tuần nuôi cấy xác định số lượng phôi tái sinh thành cây.

Biến đổi phôi bất thường thành cây hoàn chỉnh

Đối với những phôi bất thường (6 đến 8 tuần) trên môi trường BM có sự xuất hiện chồi. Các chồi này được cắt và cấy vào môi trường cơ bản BM có hoặc không có than hoạt tính nhằm kích thích sự tạo rễ. Số rễ được đếm, đo chiều dài sau bốn tuần nuôi cấy.

Xử lý số liệu

Các số liệu được phân tích thống kê với phép thử F và Duncan bằng phần mềm SPSS version 10.0

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo callus từ phôi tâm hạt non làm vật liệu cho nghiên cứu

Kết quả bảng 1 cho thấy, sau 4 tuần nuôi cấy, tất cả nghiệm thức đều hình thành callus. Các callus được hình thành ở thời điểm này thường ở dạng nén chặt và có màu hơi vàng (Hình 1A). Callus nén là các callus bao gồm các tế bào phát triển vô trật tự và gắn dính nhau theo thành vách tế bào, vì vậy hình thành một khối mô vô định hình.

Bảng 1. Phần trăm (%) mẫu tạo callus trên môi trường cơ bản BM bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (CĐHST) khác nhau ở 4 và 8 tuần sau khi cấy.

BM + CĐHST (mg/l)	4 tuần	8 tuần
	Callus nén	Callus rời rạc
2,4D (1)	92d	24b
NAA (1)	16ab	0 a
NAA (2)	8a	4a
NAA (2) + 2,4D (0,5)	42c	4a
2,4D (1) + BA (0,5)	28bc	0 a
2,4D (1) + BA (0,2)	20ab	4a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột được kèm theo sau bởi các chữ giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan.

Hầu hết các nghiệm thức có NAA đều có phần trăm tạo ra callus nén thấp (Bảng 1). Khi mẫu cấy đạt 8 tuần, ở một số nghiệm thức có sự xuất hiện các cụm callus rời rạc (Hình 1B). Đa số các cụm callus rời rạc đều xuất hiện trên nghiệm thức có 2,4-D hoặc có NAA ở nồng độ cao. Callus rời rạc là các callus

đễ tách rời thành cụm nhỏ. Sự hình thành callus rời rạc có thể là do khi tế bào phân chia đến một giai đoạn nào đó thành vách tế bào không đủ sức kết dính các tế bào với nhau, lúc đó chúng sẽ tự tách rời ra thành các cụm tế bào có kích thước nhỏ hơn. Các cụm tế bào nhỏ này rất dễ dàng định lượng dưới kính hiển vi.

Trong hai loại auxin 2,4-D và NAA thì 2,4-D là auxin có hoạt tính mạnh, thường được sử dụng để kích thích quá trình hình thành callus ở các mô thực vật. Các callus rời rạc này có nguồn gốc từ các tế bào phôi tâm là các tế bào soma có đặc tính giống cây mẹ. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy callus rời rạc bao gồm những tế bào có cấu trúc tròn, tế bào chất đậm đặc và có rất nhiều hạt tinh bột, trong khi những tế bào của callus nén chặt hình đa giác, xếp khít nhau và không có hoặc rất ít các hạt tinh bột hiện diện trong tế bào trên môi trường chứa 2,4-D đều hình thành callus rời rạc tốt hơn các nghiệm thức có NAA và BA.

Ảnh hưởng của các loại đường khác nhau lên sự hình thành phôi soma

Kết quả thí nghiệm ở bảng 2 cho thấy rằng, các nghiệm thức có sự hiện diện của đường sucrose (Su) riêng rẽ hoặc kết hợp với loại đường khác đều không có sự hình thành phôi soma ở 2 tuần sau khi cấy. Khối callus của các môi trường này được tiếp tục cấy chuyển và sinh trưởng nhanh, sau 4 tuần và không tiếp tục sinh trưởng sau 6 tuần. Sau đó, các khối callus này chuyển sang màu vàng và hóa nâu. Chỉ có nghiệm thức có đường galactose 30 và 50 g/l thì có xuất hiện phôi. Sau bốn tuần nuôi cấy có nhiều nghiệm thức xuất hiện phôi soma.

Đa số các phôi đều xuất hiện ở các nghiệm thức có đường galactose và galactose kết hợp lactose. Số lượng phôi được tạo thành ở các nghiệm thức này đạt tỷ lệ cao. Sau 6 tuần nuôi cấy, ở các nghiệm thức có lactose (La) riêng rẽ có sự xuất hiện phôi.

Nghiệm thức galactose 20 g/l xuất hiện phôi soma nhiều nhất (69,9%), tiếp đến là nghiệm thức kết hợp galactose (20 g/l) và lactose (20 g/l), nhưng hai nghiệm thức này không khác biệt theo phân tích thống kê.

Trong một cụm callus, phôi xuất hiện với nhiều dạng. Để phân biệt cụm callus nào có phôi xuất hiện phôi sớm nhất, chúng tôi dựa trên màu sắc của cụm callus. Cụm callus nào có màu sắc hơi vàng xanh hoặc màu xanh thì được lấy ra quan sát dưới kính phóng đại để xác định các dạng cấu trúc. Cụm callus

vàng xanh thường xuất hiện các phôi hình cầu nhỏ xen kẽ rải rác trên các khối callus. Cụm callus màu xanh thì xuất hiện các phôi hình tim hoặc phôi thủy lôi (torpedo) (Hình 2). Sự hình thành phôi soma được bắt đầu từ dạng hình cầu (globular shape) kế đến dạng hình tim (heart shape) và sau cùng là dạng thủy lôi (torpedo). Sự phát triển thêm có thể hình thành dạng tử diệp (cotyledonary embryo). Như vậy là có sự tạo phôi không đồng bộ ở các kiểu phôi trên các cụm callus. Điều này chứng tỏ rằng các tế bào phát sinh phôi khi đủ điều kiện có thể hình thành phôi soma.

Số phôi trên mỗi cụm callus

Kết quả bảng 3 cho thấy, môi trường có đường galactose 20 g/l cho số lượng phôi trên mỗi cụm callus nhiều nhất và sự gia tăng lượng đường galactose làm số phôi giảm. Nhưng khi môi trường có

galactose được bổ sung thêm lactose số phôi gia tăng.

Thí nghiệm trên hai loại đường galactose và lactose ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp cũng cho thấy là hai loại đường này có hiệu quả trên sự hình thành phôi soma (Bảng 2, 3). Có nhiều giải thích cho sự hình thành phôi soma này. Mặc dù Gross và đồng tác giả, (1981) cho rằng galactose độc cho sự sinh trưởng *in vitro* của callus trực thượng diệp cây Dưa Leo. Nhưng Kochba và đồng tác giả (1982) cho rằng galactose và lactose rất hiệu quả cho sự kích thích sự tạo phôi từ các callus của giống Cam Shamouti (*Citrus sinensis*). Họ cũng đã chứng minh rằng galactose và lactose ngăn cản sự tổng hợp của auxin. Các kết quả này cũng được Kunitake và Mii (1995) xác nhận trên các thí nghiệm được thực hiện với galactose và lactose trên nhiều giống và loài *Citrus*. Họ đã ghi nhận sự đáp ứng khác nhau trong quá trình tạo phôi chủ yếu là sự khác biệt giữa các loài.

Bảng 2. Hiệu quả của các loại đường sucrose (Su), galactose (Ga) và lactose (La) trên phần trăm (%) cụm callus phát sinh phôi soma theo thời gian.

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

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột được kèm theo sau bởi các chữ giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan.

Bảng 3. Số phôi trên mỗi cụm callus ở các môi trường có đường galactose riêng rẽ hoặc kết hợp ở 6 tuần sau khi cấy.

BM + các loại đường (g/l)	Số phôi trên mỗi cụm callus
BM + Ga (20)	299 ± 11 c
BM + Ga (30)	180 ± 10 b
BM + Ga (50)	31 ± 30 a
BM + Ga (20) + La (20)	313 ± 20c

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột được kèm theo sau bởi các chữ giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan.

Ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose (Su) lên sự phát triển của phôi soma

Phôi soma được gọi là phôi từ điệp khi phôi có các từ điệp rõ ràng. Cấu trúc phôi từ điệp có 2 loại: phôi từ điệp bình thường và bất thường. Kết quả bảng 4 cho thấy, sau 20 ngày nuôi cấy trên môi trường cơ bản BM có bổ sung 2 g/l than hoạt tính ở các nồng độ đường sucrose khác nhau đều có sự thay đổi hình thái phôi từ điệp.

Tỷ lệ phần trăm phôi từ điệp bình thường (có hai từ điệp, có sự phân cực chồi và cực rễ) chiếm tỷ lệ thấp so với phôi từ điệp bất thường. Phôi từ điệp bình thường đạt tỷ lệ cao nhất ở nghiệm thức 50 g/l sucrose (2,3%). Ở nồng độ đường thấp tỷ lệ hình thành phôi bất thường cao, trong khi nồng độ đường sucrose gia tăng tỷ lệ hình thành phôi bất thường giảm.

Bảng 4. Phần trăm (%) phôi từ điệp (Ptd) bình thường và phôi từ điệp bất thường trên môi trường BM có than hoạt tính ở các nồng độ đường sucrose (Su) sau 20 ngày nuôi cấy.

BM+Su (g/l)	Ptd	Ptd bình thường	Ptd bất thường
Su (10)	14,8 a	0,4a	14,4b
Su (20)	9,3 a	1,0a	8,3ab
Su (25)	8,6 a	0,6a	8,0ab
Su (30)	7,2 a	0,4 a	6,8a
Su (40)	6,6 a	0,3 a	6,3a
Su (50)	8,3 a	2,3 b	6,0a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột được kèm theo sau bởi các chữ giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan.

Đường là nguồn cung cấp năng lượng cho sự phát triển của tế bào và cơ quan. Lượng sucrose trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự phát triển của cấu trúc phôi và phát triển thành cây con. Kết quả thí nghiệm này cho thấy hàm lượng sucrose ảnh hưởng đến sự thay đổi hình thái phôi. Sự định hình cấu trúc phôi soma ở dạng phôi từ điệp bình thường hay bất thường có lẽ đã được hình thành trong quá trình phát triển phôi. Sự hình thành cấu trúc phôi bình thường có lẽ được phát sinh từ một tế bào ban đầu sau đó phân chia và phân cực trên và dưới trong quá trình hình thành phôi. Trong khi sự hình thành phôi bất thường có lẽ là do sự phát sinh cùng lúc các tế bào còn dính nhau và khi phát triển

hình thành cụm phôi gồm nhiều tế bào phân cực lên hoặc xuống để có thể phát triển thành nhiều cực chồi (Hình 3C). Sự hình thành các dạng cấu trúc phôi từ điệp bất thường đã được nhiều tác giả báo cáo trong quá trình phát triển phôi soma của các cây cam (Topoonyanont, 1999; Mácio *et al.*, 2001). Có lẽ đây là một đặc tính riêng của loài này trong quá trình phát sinh phôi soma.

Sự biến đổi từ phôi soma bình thường thành cây hoàn chỉnh

Các phôi có từ điệp bình thường được cấy vào môi trường cơ bản BM có 2 g/l than hoạt tính sẽ phát triển thành cây bình thường (Hình 3 A, B). Cây con đạt chiều cao từ 1,8 - 2,0 cm sau 4 tuần và đạt kích thước từ 4 - 5 cm sau 12 tuần nuôi cấy. Các cây con này có thể đem thuần dưỡng ở nhà lưới.

Sự biến đổi từ phôi soma bất thường thành cây hoàn chỉnh

Các phôi bất thường được nuôi cấy trên môi trường cơ bản bổ sung 2 g/l than hoạt tính, những phôi soma bất thường sẽ tạo chồi (Hình 3C, D). Tỷ lệ trung bình của các phôi từ điệp bất thường phát triển chồi được ghi nhận khoảng 78,6% sau 8 tuần nuôi cấy. Các chồi này được sử dụng như là nguồn vật liệu để nhân cây con bằng kỹ thuật tạo rễ *in vitro* nhưng không có auxin (Bảng 5). Chồi được tách ra và tạo rễ bất định trên môi trường cơ bản có hoặc không có than hoạt tính, sau 4 tuần nuôi cấy tỷ lệ % tạo rễ từ 81 - 83% và có trên 1 rễ với chiều dài khoảng 3 cm (Bảng 5).

Bảng 5. Tỷ lệ phần trăm (%) chồi ra rễ, số rễ và chiều dài rễ trên môi trường BM có than hoạt tính (2 g/l) hoặc không có than hoạt tính.

BM (than g/l)	% ra rễ	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
BM (0 g/l)	83,7 ± 2,3	1,2 ± 0,1	3,4 ± 0,3
BM (2g/l)	81,2 ± 3,1	1,1 ± 0,1	3,5 ± 0,2

KẾT LUẬN

Đã tạo callus rời rạc từ nuôi cấy phôi tâm của hạt non quýt đường trên môi trường cơ bản BM bổ sung 1 mg/l 2,4 D.

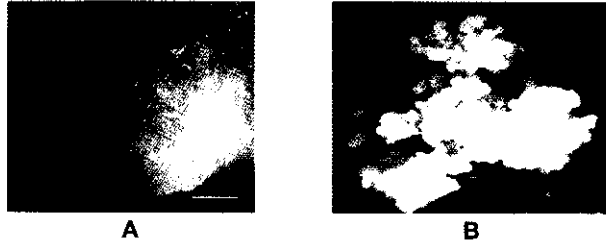
Sự cảm ứng phát sinh phôi soma từ callus rời rạc có nguồn gốc phôi tâm đạt được trên môi trường BM được bổ sung đường galactose 20 g/l.

Phôi soma bình thường nảy mầm và phát triển thành cây trên môi trường cơ bản BM được bổ sung 2 g/l than hoạt tính.

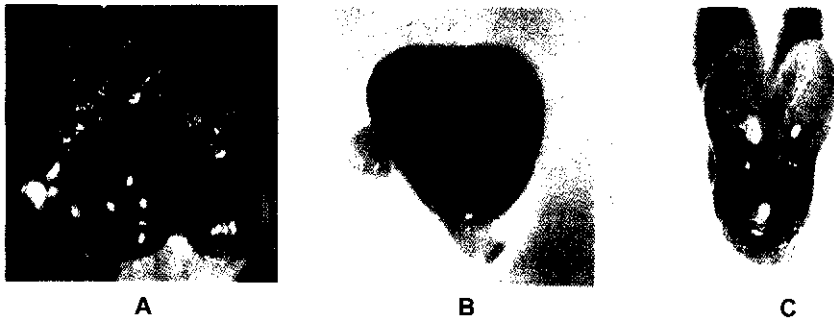
Chồi của các phôi soma bất thường được tạo rỗ *in vitro* để thành cây con hoàn chỉnh trên môi trường

cơ bản BM có hoặc không có than hoạt tính.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo, Đại học Cần Thơ đã xét duyệt kinh phí cho nghiên cứu này.



Hình 1. Cúm callus nén chặt (A) và callus rời rạc (B).



Hình 2. Các dạng cấu trúc phôi được hình thành trên môi trường có đường galactose. A: phôi dạng cầu; B: phôi dạng trái tim; C: phôi torpedo.



Hình 3. Sự biến đổi phôi soma thành cây hoàn chỉnh. A. Phôi tử diệp bình thường; B. Cây con từ phôi tử diệp bình thường; C. Phôi tử diệp bất thường; D. Phôi tử diệp bất thường phát triển chồi; E. Chồi từ phôi tử diệp bất thường được tạo rỗ; F. Chồi từ phôi tử diệp bất thường đã ra rễ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ben-Hayyim G, Neuman H (1983) Stimulatory effect of glycerol on growth and embryogenesis in citrus callus culture. *Z Pflanzenphysiol* 110 : 331-337.
- Gross KC, Pharr DM, Locy RD (1981) Growth of callus initiated from cucumber hypocotyls on galactose and galactose containing oligosaccharides. *Plant Sci Lett* 20: 333-341.
- Kochba J, Button J (1974) The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the Shamouti Orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. *Z Pflanzenphysiol* 73: 415-421.
- Kochba J, Spiegel-Roy P (1977) The effects of auxin, cytokinin and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*) *Z Pflanzenphysiol* 81: 283-288.
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Neuman H, Saad S (1982) Effects of carbohydrate on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of Citrus cultivars. *Z Pflanzenphysiol* 105 : 359-368.
- Kunitake H, Mii H (1995) Somatic embryogenesis in Citrus species. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. Vol 30: 283-298.
- Mácio LT, Beatriz M Januzzi Mendes, Francisco De Assis A, Moãao Filho, Clarice GB Demétrio, Naratip Jansakul, Adriana P Martinelli Rodriguez (2001) Somatic embryogenesis in *Citrus* spp.: carbohydrate stimulation and histodifferentiation. *Biol Plant* 37: 446-452.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Navarro L, Juarez J (1977) Elimination of citrus pathogens in propagative bud wood, II in vitro propagation. *Proc Int Soc Citriculture* 3: 978-987.
- Tisserat B (1987) Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration, In: *Plant cell culture: A practical approach*, Oxford, Washington DC: 79-104.
- Topoonyanont N (1999) Abnormalities in Citrus somatic embryogenesis, In: *The versatility of plant development in vitro: Case studies, PhD Thesis, Gent, University, Belgium*.

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF DUONG MANDARIN (*CITRUS RETICULATA* BLANCO) FROM NUCELLAR CULTURE

Pham Thi Bich Thuy, Nguyen Bao Toan*

Cantho University

SUMMARY

Duong mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) has been cultivated popularly in The Mekong Delta. Study on embryogenesis of Duong mandarin could be very useful in further applications such as micro propagation or creating new cultivar via *in vitro* selection. In order to obtain somatic cells with characteristics similar to mother plants, nucellar culture should be applied. Somatic embryos were genetically similar to the plantlets because they derived from the same somatic cells. This study was carried out to determine the effects of sugar types on formation of somatic embryos. Experiments were conducted to create calli from nucellar culture, to determine effects of sugar types such as sucrose, galactose and lactose on embryogenesis and development of embryos to plantlets. Results showed that nucellar calli formed on basal medium (BM) containing MS medium supplemented with 1 mg/l pyridoxine-HCl, 1 mg/l nicotinic acid, 0.2 mg/l thiamine-HCl, 100 mg/l myo-inositol, 500 mg/l malt extract, 50 g/l sucrose, 8 g/l agar and 1 mg/l 2,4 D. Embryogenesis from nucellar calli was achieved on BM medium, to which was galactose added at concentration 20 g/l. Two types of somatic embryos appeared were normal and abnormal embryos. Normal embryos developed to complete plantlets on basal

* Author for correspondence: Tel: 84-710-3893179; Fax: 84-710-3830814; E-mail: nbtoan@ctu.edu.vn

medium (BM) supplemented with 2 g/l of activated charcoals. Abnormal embryos developed to plantlets via shoots rooted on basal BM medium added 3 g/l of activated charcoals.

Keywords: *Abnormal embryo, callus, duong mandarin (Citrus reticulata Blanco), normal embryo, nucellar culture, somatic embryogenesis*