

Nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* noãn và bao phấn ớt (*Capsicum sp.*) phục vụ tạo dòng đơn bội kép

Hồ Thị Cẩm Nguyên, Nguyễn Thị Nhã*

Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành

*ntnha@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu tiến hành nuôi cấy bao phấn và noãn chưa thụ tinh trên 4 giống ớt gồm ớt hiểm (ớt chỉ thiên), ớt sừng bò, ớt chuông và ớt sừng giống Nhật. Chồi đơn bội có thể được thu nhận khi nuôi cấy bầu noãn hoặc bao phấn *in vitro*. Đây là bước quan trọng đầu tiên của qui trình tạo dòng đơn bội kép bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật. Quá trình khảo sát cho thấy việc sốc nhiệt lạnh giúp làm giảm tình trạng mẫu chết và cải thiện tỉ lệ tạo mô sẹo từ noãn và bao phấn. Bao phấn và noãn của cả 4 giống ớt đều có khả năng cảm ứng mô sẹo trong các môi trường nuôi cấy thích hợp. Có 2,7 – 4,7% bao phấn ớt chuông hình thành phôi hoặc mô sẹo phôi hóa trên môi trường MS + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l kinetin hoặc MS + 0,5mg/l TDZ, và 42,86% trong số đó tái sinh thành công chồi trên môi trường MS bổ sung 0,5mg/l BA. Mô sẹo ớt hiểm không có khả năng tái sinh chồi trong phạm vi nghiên cứu. Mô sẹo của 3 giống ớt còn lại có đặc điểm của mô sẹo có khả năng phôi hóa.

Nhận 19.06.2019

Được duyệt 04.12.2019

Công bố 25.12.2019

Từ khóa

chồi đơn bội, mô sẹo, capsicum, nuôi cấy bao phấn, nuôi cấy noãn

© 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Ớt không chỉ là một loại gia vị trong mỗi gia đình, được sử dụng phổ biến trong công nghiệp chế biến thực phẩm, mà còn là nguyên liệu để sản xuất dược phẩm chữa các bệnh như phong thấp, nhức mỏi, cảm lạnh... Mặc dù trồng ớt mang lại giá trị kinh tế cao nhưng cơ cấu giống ớt của Việt Nam vẫn chưa phong phú, không đủ nhu cầu cho sản xuất qui mô lớn và xuất khẩu. Hầu hết các giống ớt đang được canh tác ở nước ta hiện nay là giống lai F1 có nguồn gốc nước ngoài với giá thành cao, trong khi các giống nội địa với giá thành thấp, thích hợp với điều kiện tự nhiên nước ta thì khả năng chống chịu sâu bệnh kém, đã làm giảm đi số lượng và chất lượng các giống ớt. Do đó, cần tạo ra các giống ớt lai nội địa vừa có những phẩm chất tốt của giống ớt F1 ngoại nhập, vừa phù hợp với điều kiện tự nhiên nước ta, để chủ động hơn về nguồn giống. Từ đó, việc tạo ra dòng thuần từ các giống lai F1 để làm nguyên liệu cho chọn tạo giống là rất cần thiết. Bên cạnh đó, việc tạo ra các giống lai trong nước hiện nay đang gặp khó khăn trong việc tạo ra các dòng thuần, dùng phương pháp truyền thống thường tốn rất nhiều thời gian và công sức, thông qua thụ phấn cưỡng bức và chọn lọc liên tục cũng phải qua 7-8 thế hệ mới nhận được các dòng thuần để đánh giá khả năng kết hợp của các giống, và trong nhiều trường hợp vẫn không thu được các dòng bố mẹ đồng hợp từ ở tất cả các cặp alen. Kỹ thuật nuôi

cây tạo thể đơn bội *in vitro* thông qua nuôi cấy túi phấn và bầu noãn, ứng dụng trong tạo dòng thuần đang thu hút sự quan tâm không chỉ của giới nghiên cứu khoa học mà cả các doanh nghiệp kinh doanh giống cây trồng; là một bước tiến mới trong công tác chọn tạo giống, đặc biệt đối với những loại cây rau củ quả có giá trị kinh tế cao. Các thể đơn bội *in vitro* thường nhân đôi số lượng nhiễm sắc thể một cách tự nhiên và khi sử dụng colchicine thì quá trình nhân đôi *in vitro* xảy ra dễ dàng hơn để trở thành dạng đơn bội kép đồng hợp tử[1]. Từ cây đơn bội kép sau khi qua sàng lọc và tuyển chọn sẽ trở thành dòng thuần, dùng trong quá trình chọn tạo giống cây trồng. Kỹ thuật này vừa tiết kiệm được thời gian, công sức, diện tích đất; vừa không bị phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên mà vẫn cho ra nguồn giống đồng đều về chất lượng, có thể lợi dụng nguồn vật liệu là các giống thương mại đang trồng phổ biến để tạo dòng thuần làm nguồn vật liệu cho tổ hợp lai mới.

Đối với cây ớt, đã có nhiều nghiên cứu về nuôi cấy túi phấn tạo chồi đơn bội trên thế giới. Công bố đầu tiên về tái sinh cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn trên đối tượng ớt đã được Wang và cộng sự (1973) báo cáo; theo đó, chồi và mô sẹo bắt đầu xuất hiện từ bao phấn giống ớt Yeo Hsien sau 33 ngày nuôi cấy trên môi trường Murashige và Skoog (MS)[2] bổ sung một số vi lượng và vitamin, bổ sung 4,65mM kinetin, 5,37mM naphthalene acetic acid (NAA) hoặc

4,52mM 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)[3]. Tiếp nối đó, các nghiên cứu về nuôi cấy túi phần tạo chồi đơn bội đã được tiến hành. Phần lớn nghiên cứu khảo sát về ảnh hưởng của các thành phần môi trường nuôi cấy như nồng độ khoáng, nồng độ đường, than hoạt tính, AgNO₃ cùng các chất điều hòa sinh trưởng benzyladenine (BA), indole acetic acid (IAA), NAA, 2,4-D, kinetin, thidiazuron (TDZ) đến quá trình tái sinh chồi đơn bội từ bao phần ốt[4]. Các yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy bao phần đã được xác định bao gồm môi trường nuôi cấy, điều kiện sốc nhiệt và kiểu gen của cây mẹ, tuy nhiên tỉ lệ tạo cây đơn bội còn rất thấp, từ 0,1 – 1%[4,5]. Nuôi cấy noãn thu chồi đơn bội đã được báo cáo ở nhiều đối tượng như lúa mì, hành tây, khoai tây, bí đao, củ cải đường, ngô, hướng dương, thuốc lá, nho, dưa chuột... tuy nhiên thường chỉ sử dụng khi gặp khó khăn trong nuôi cấy bao phần[6]. Tại Việt Nam, các công bố khoa học về nuôi cấy bao phần và noãn phục vụ tạo dòng còn hạn chế. Gần đây, Viện Nghiên cứu Rau quả (2010) khi tiến hành nghiên cứu trên ốt cay cũng đưa ra các kết luận: MS là môi trường nuôi cấy thích hợp nhất cho nuôi cấy bao phần ốt, môi trường bổ sung 4mg/l NAA và 1mg/l BA cho tỉ lệ tạo callus 70,8%, trong đó 7,33% tái sinh cây thành công trên môi trường bổ sung 1mg/l gibberelic acid 3 (GA₃) và 0,02mg/l TDZ[7]. Đặc biệt, vẫn chưa có công bố khoa học về nuôi cấy bầu noãn ốt tạo chồi đơn bội cả ở Việt Nam và thế giới. Nhìn chung, tạo cây đơn bội bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phần và noãn vẫn còn nhiều khó khăn trong quá trình khảo sát các yếu tố ảnh hưởng và tối ưu hóa qui trình, cần được nghiên cứu nhiều hơn để tìm ra qui trình cụ thể, có thể ứng dụng rộng rãi vào công tác chọn tạo giống.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu và địa điểm nghiên cứu:

Cây ốt thí nghiệm thuộc 4 giống đang trồng phổ biến tại Việt Nam, bao gồm 2 giống ốt cay là ốt chỉ thiên và ốt sừng bò, 2 giống ốt ngọt là ốt chuông và ốt sừng giống Nhật.

Trong đó, ốt chỉ thiên là giống ốt nội địa, 3 giống còn lại là giống lai F1 nhập nội. Cả 4 giống ốt được trồng và chăm sóc trong nhà màng tại Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành. Nụ hoa ốt được lấy ở giai đoạn có chiều dài lá dài bằng chiều dài cánh hoa[8], thời gian lấy mẫu trong khoảng 9 - 11 giờ sáng.

Tạo vật liệu *in vitro* ban đầu:

Nụ hoa ốt hiếm được rửa sơ bộ bằng nước sạch, ngâm lác với xà phòng 10 phút, rửa với dung dịch hydrogen peroxide H₂O₂ 3% trong 5 phút, rửa lại với nước sạch. Trong tủ cấy vô trùng, mẫu được khử trùng bằng dung dịch cồn 70° trong 1 phút, tiếp tục khử trùng bằng dung dịch sodium hypochlorite (NaOCl) ở các nồng độ 2,5% trong 10 phút, rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng.

Loại bỏ những nụ hoa chuyển sang màu đen do bị ngấm nhiều chất khử trùng. Sau đó tiến hành tách lấy từng bao phần riêng lẻ và noãn ốt của nụ hoa, cấy vào trong các môi trường thí nghiệm.

Tiền xử lí bằng sốc nhiệt nụ hoa:

Nụ hoa ốt hiếm sau khi được khử trùng sơ bộ, đặt trong các điều kiện nhiệt độ 4⁰C và 35⁰C trong các khoảng thời gian 12 giờ, 24 giờ và 48 giờ, sau đó đưa vào tủ cấy vô trùng để khử trùng và tiến hành cấy mẫu vào môi trường MS + 30g/l sucrose + 7,5g/l agar + 2mg/l 2,4 dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) + 1mg/l benzyladenine (BA). Sau khi cấy, mẫu được để tối hoàn toàn trong vòng 3 tuần, sau đó để ở điều kiện 16 giờ sáng/8 giờ tối. Kết quả được theo dõi và ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

Cảm ứng hình thành phôi, mô sẹo hoặc mô sẹo phôi hóa

Noãn và bao phần các loại ốt sau khi khử trùng và tiền xử lí ở các điều kiện thích hợp, được nuôi cấy trên môi trường nền MS bổ sung 30g/l sucrose, 7,5g/l agar bổ sung tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng gồm BA, naphthalene acetic acid (NAA), 2,4-D, thidiazuron (TDZ), kinetin ở các mức nồng độ khác nhau nhằm cảm ứng tạo mô sẹo hoặc phôi. Kết quả thí nghiệm được ghi nhận ở thời điểm 4 tuần sau khi cấy.

Bảng 1 Các môi trường nuôi cấy dùng cho cảm ứng tạo mô sẹo, phôi từ noãn và bao phần ốt

| Kí hiệu | Các chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy (mg/l) | | | | | | Kí hiệu | Các chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy (mg/l) | | | | | |
|---------|---|-------|-----|---------|-----|-----|---------|---|-------|-----|---------|-----|-----|
| | Than hoạt tính | 2,4-D | BA | Kinetin | NAA | TDZ | | Than hoạt tính | 2,4-D | BA | Kinetin | NAA | TDZ |
| Mt 1 | - | - | - | - | - | - | Mt 10 | - | 3 | 1 | - | - | - |
| Mt 2 | - | - | - | - | - | 0,5 | Mt 11 | - | - | 0,5 | 1,5 | - | - |
| Mt 3 | - | - | - | - | - | 1 | Mt 12 | - | - | 0,5 | 2 | - | - |
| Mt 4 | - | - | - | - | - | 1,5 | Mt 13 | - | - | 1 | 3 | - | - |
| Mt 5 | - | - | - | - | - | 2 | Mt 14 | - | 1,5 | - | 1 | - | - |
| Mt 6 | - | 2,5 | 0,5 | - | - | - | Mt 15 | - | 2 | - | 1 | - | - |
| Mt 7 | - | 3 | 0,5 | - | - | - | Mt 16 | - | - | 1 | - | 4 | - |
| Mt 8 | - | 2 | 1 | - | - | - | Mt 17 | - | - | - | 2 | - | - |
| Mt 9 | 0,5 | 2 | 1 | - | - | - | | | | | | | |

Các phôi hoặc mô sẹo phôi hóa phát sinh trực tiếp từ mẫu cấy. Sau 8 tuần kể từ lúc cấy, mẫu được cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung 30g/l sucrose, 7,5mg/l agar và 0,5mg/l BA để tái sinh chồi từ phôi.

Tái sinh chồi từ mô sẹo:

Các bao phấn và bầu noãn sau khi nuôi cấy 8 tuần trong môi trường cảm ứng, mô sẹo được cấy chuyển sang các môi trường nuôi cấy khác nhau để tái sinh chồi. Các môi trường nuôi cấy bao gồm môi trường nền MS chỉ bổ sung 30g/l sucrose, 7,5g/l agar hoặc bổ sung thêm chất điều hòa sinh trưởng như BA 1mg/l, kinetin 2mg/l, TDZ 0,5mg/l.

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu:

Tất cả môi trường nuôi cấy dùng trong nghiên cứu được điều chỉnh độ pH 5,8 – 6, khử trùng ở 121⁰C, 1atm trong 18 phút. Điều kiện phòng lưu mẫu có nhiệt độ 25 ± 2⁰C, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 1500 lux.

Đối với thí nghiệm tạo vật liệu vô trùng *in vitro* và sốc nhiệt nụ hoa ốt, mỗi chai thủy tinh cấy 5 mẫu bao phấn hoặc 3 mẫu noãn. Mỗi nghiệm thức cấy 6 mẫu đối với noãn và 30 mẫu đối với bao phấn, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thí nghiệm khảo sát các môi trường nuôi cấy cảm ứng tạo sẹo hoặc phôi, mỗi nghiệm thức cấy ít nhất 25 mẫu đối với bao phấn và 5 mẫu đối với bầu noãn, thí nghiệm được lặp lại 4 lần.

Các thí nghiệm được bố trí theo phương pháp ngẫu nhiên đơn yếu tố. Số liệu thí nghiệm được thu thập và tổng hợp

bằng phần mềm Microsoft Office Excel, phân tích thống kê theo ANOVA và trắc nghiệm phân hạng LSD (Least Significant Difference Test) bằng phần mềm SAS 9.1.

3 Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của tiền xử lý nụ hoa bằng nhiệt độ đến khả năng tạo mô sẹo từ noãn và bao phấn ốt hiêm:

Tiền xử lý với nhiệt độ, đặc biệt sốc nhiệt ở 4⁰C và một số trường hợp ở 35⁰C khi nuôi cấy bao phấn ốt đã được báo cáo ở nhiều nghiên cứu trên thế giới, rằng có khả năng làm tăng hiệu quả tái sinh chồi đơn bội *in vitro*[9]. Việc xử lý lạnh nụ hoa ốt hiêm ở 4⁰C trong khoảng thời gian 24 giờ đến 48 giờ đều làm giảm tỉ lệ chết của noãn và bao phấn so với các nghiệm thức còn lại. Điều này chứng minh rằng, nhiệt độ thấp đã tác động đến sự phát triển bao phấn và noãn. Bajaj (1978) cho rằng tác dụng của việc tiền xử lý bằng nhiệt độ chủ yếu là sốc nhiệt lạnh, làm chậm quá trình lão hóa và đảm bảo phần hoa không bị gián đoạn trong quá trình phát triển, từ đó giúp giữ khả năng tồn tại của phần hoa lâu hơn, giúp làm tăng số lượng hạt phấn hình thành phôi[5]. Ngoài ra việc xử lý lạnh còn ảnh hưởng đến lần phân chia đầu tiên của tiểu bào tử, xu hướng tạo thành hai nhân giống hệt nhau[10]. Dudu Ozkum (2011) đã nhận định việc sốc nhiệt 4⁰C trong 48 – 96 giờ không ảnh hưởng đến tỉ lệ sinh phôi từ bao phấn, nhưng có làm tăng tỉ lệ hình thành mô sẹo[8].

Bảng 2 Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian sốc nhiệt nụ hoa đến khả năng tạo mô sẹo từ noãn và bao phấn ốt

| Nhiệt độ | Thời gian xử lý (giờ) | Mẫu noãn ốt | | Mẫu bao phấn ốt | |
|---------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | | Tỉ lệ chết (%) | Tỉ lệ tạo mô sẹo (%) | Tỉ lệ chết (%) | Tỉ lệ tạo mô sẹo (%) |
| Nhiệt độ phòng | 0 | 66,7 ^b | 0 ^c | 64,4 ^a | 0 ^c |
| 4 ⁰ C | 12 | 83,3 ^{ab} | 0 ^c | 33,3 ^{ab} | 0 ^c |
| 4 ⁰ C | 24 | 30 ^c | 53,3 ^a | 24,4 ^b | 60 ^a |
| 4 ⁰ C | 48 | 26,7 ^c | 26,7 ^b | 26,7 ^b | 20 ^b |
| 35 ⁰ C | 12 | 80 ^{ab} | 0 ^c | 44,4 ^{ab} | 0 ^c |
| 35 ⁰ C | 24 | 86,7 ^a | 0 ^c | 46,7 ^{ab} | 0 ^c |
| 35 ⁰ C | 48 | | | 60 ^a | 0 ^c |
| CV (%) | | 12 | 50 | 29,9 | 93,5 |
| Lsd _{0,01} | | 18,6 | 16,6 | 31,2 | |
| Lsd _{0,05} | | | | | 18,7 |

* Trong cùng 1 cột, các giá trị trung bình có chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê

Thí nghiệm không thu được mẫu sinh phôi ở bất kỳ hình thức tiền xử lý nào, mẫu không trải qua giai đoạn tiền xử lý và xử lý ở 35⁰C không ghi nhận thấy có sự hình thành mô sẹo, hầu như các nụ hoa sau khi xử lý 35⁰C đều có dấu hiệu bị thâm đen, các bao phấn và bầu noãn tách ra từ những nụ hoa này bị chuyển dần sang màu đen sau khoảng 1 tuần nuôi cấy. Qua đó cho thấy việc tiền xử lý lạnh nụ hoa ảnh hưởng tích cực đến việc cảm ứng tạo mô sẹo cho bao phấn và noãn ốt hiêm, trong đó nhiệt độ 4⁰C xử lý trong 24 giờ

thích hợp nhất cho giai đoạn tiền xử lý nụ hoa trong nghiên cứu này.

Khả năng tạo mô sẹo hoặc phôi từ noãn và bao phấn ốt trên một số môi trường nuôi cấy:

Kết quả nghiên cứu cho thấy cả noãn và bao phấn 4 loại thí nghiệm đều có khả năng tạo mô sẹo trên một vài loại môi trường nuôi cấy (Bảng 3). Tuy nhiên, trên môi trường nền MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, dù có trải qua quá trình tiền xử lý ở 4⁰C, vẫn không có sự phát sinh

hình thái từ mẫu cây. Ngược lại với kết quả nghiên cứu của nhóm Trần Khắc Thi, mô sẹo từ bao phần hình thành trên môi trường MS với tỉ lệ 28,8%[7]. Điều này cho thấy sự cảm ứng mô sẹo chịu tác động của nhiều yếu tố khác nhau,

trong đó, chất điều hòa sinh trưởng và kiểu gen của cây cho nụ hoa có ảnh hưởng thiết yếu đến sự phát sinh hình thái từ bao phần và noãn ốt.

Bảng 3 Khả năng tạo mô sẹo hoặc phôi từ noãn và bao phần ốt trên một số môi trường nuôi cấy

| Môi trường | Tỉ lệ tạo mô sẹo (%) | | | | | | | | Tỉ lệ tạo phôi và mô sẹo phôi hóa từ bao phần ốt chuang (%) |
|---------------------|----------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|
| | Ốt hiêm | | Ốt sừng bò | | Ốt sừng Nhật | | Ốt chuang | | |
| | Noãn | Bao phần | Noãn | Bao phần | Noãn | Bao phần | Noãn | Bao phần | |
| Mt 1 | 0 ^c | 0 ^d | 0 ^e | 0 ^e | 0 ^b | 0 ^d | 0 ^b | 0 ^e | 0 |
| Mt 2 | 0 ^c | 0 ^d | 33,8 ^b | 13,6 ^{cd} | 3,6 ^{ab} | 20,1 ^b | 22,3 ^a | 29,3 ^b | 2,7 |
| Mt 3 | 33,3 ^b | 19,7 ^c | - | - | - | - | - | - | - |
| Mt 4 | - | 0,8 ^d | 25 ^{bc} | 14,1 ^{cd} | - | 42,9 ^a | - | - | - |
| Mt 5 | - | - | 10 ^{de} | 0 ^e | - | - | - | - | - |
| Mt 6 | - | - | - | 23,9 ^{bc} | - | - | - | - | - |
| Mt 7 | - | - | - | 36,5 ^{ab} | - | - | - | - | - |
| Mt 8 | 56,7 ^a | 60 ^a | 10,1 ^{de} | 11,7 ^{cde} | - | 0 ^d | 20,0 ^{ab} | 18,0 ^{cd} | 0 |
| Mt 9 | - | 0 ^d | 0 ^e | 16,3 ^{cd} | - | 44,4 ^a | - | 9,8 ^{de} | 0 |
| Mt 10 | - | - | 22,3 ^{bc} | 46,6 ^a | - | 14,8 ^{bc} | - | 17,1 ^{cd} | 0 |
| Mt 11 | 0 ^c | 0 ^d | - | - | - | - | - | - | - |
| Mt 12 | - | - | - | 12,7 ^{cde} | - | - | - | 27,4 ^{bc} | 0 |
| Mt 13 | 0,8 ^c | 0,7 ^d | - | 4,2 ^{de} | 17,7 ^a | 2,4 ^{cd} | - | 0 ^e | 0 |
| Mt 14 | 26,7 ^b | 15,6 ^c | - | - | - | - | - | - | - |
| Mt 15 | - | - | 83,2 ^a | 31,1 ^b | 0 ^b | 8,8 ^{bcd} | 0 ^b | 50,3 ^a | 4,7 |
| Mt 16 | - | 29,0 ^b | 17 ^{cd} | 0 ^e | 8,3 ^{ab} | 5,1 ^{cd} | - | 0 ^e | 0 |
| Mt 17 | - | - | 0 ^e | 0 ^e | 0 ^b | 0 ^d | 0 ^b | 9,2 ^{de} | 0 |
| CV(%) | 52,1 | 32,7 | 29,6 | 46,2 | 196,5 | 50,7 | 129,9 | 34,0 | |
| LSD _{0,01} | 17,5 | 8,0 | 11,6 | 13,3 | | 13,6 | 21,8 | 10,7 | |
| LSD _{0,05} | | | | | 14,4 | | | | |

* Trong cùng 1 cột, các giá trị trung bình có chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê

Đối với ốt hiêm, tỉ lệ tạo mô sẹo từ noãn và bao phần đạt cao nhất ghi nhận ở môi trường bổ sung 2mg/l 2,4D + 1mg/l BA (56,7% noãn và 60% bao phần). Tuy nhiên cũng trong môi trường này, khi bổ sung thêm 0,5g/l than hoạt tính lại không ghi nhận được sự hình thành mô sẹo tại thời điểm 4 tuần nuôi cấy, các bao phần có xu hướng trương lên, chuyển từ vàng sang nâu. Đồng thời, ở môi trường giàu cytokinin cụ thể là kinetin và BA, mô sẹo chỉ được ghi nhận ở nồng độ cytokinin cao (3mg/l kinetin + 1mg/l BA) với tỉ lệ rất thấp (<1%). Riêng đối với TDZ, nồng độ thấp (0,5mg/l) và nồng độ cao (1,5mg/l) không cho hoặc cho tỉ lệ tạo mô sẹo rất thấp, trong khi nồng độ 1mg/l TDZ cho tỉ lệ mô sẹo hình thành ở noãn và bao phần đáng kể. Mô sẹo hình thành từ noãn và bao phần ốt hiêm có kích thước nhỏ (≤ 5 mm), hầu hết có màu trắng hơi bông và dần chuyển sang màu vàng đến vàng nâu trong môi trường (Hình 1-C).

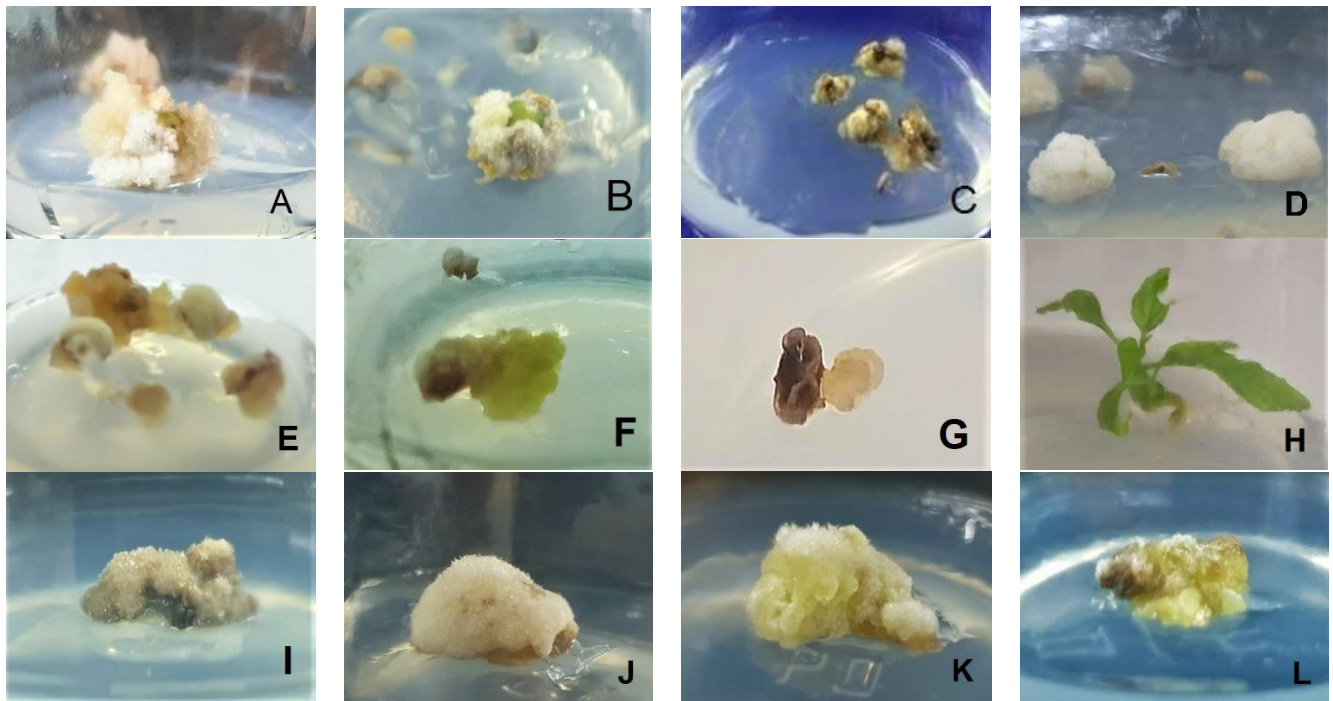
Với ốt sừng bò, TDZ có khả năng cảm ứng tạo mô sẹo từ noãn và bao phần, tuy nhiên khi nồng độ tăng từ 0,5 đến 2mg/l, khả năng tạo mô sẹo bị giảm đi, và không nhận được mô sẹo phát sinh từ bao phần ở nồng độ TDZ 2mg/l. Khảo sát sự kết hợp chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D và BA nhìn chung cho thấy tỉ lệ tạo mô sẹo tăng lên khi tăng nồng độ 2,4-D trong môi trường (Bảng 3). Tỉ lệ tạo mô sẹo từ bao

phần cao nhất trên môi trường bổ sung 3mg/l 2,4-D và 0,5 – 1mg/l BA, trong khi tỉ lệ tạo mô sẹo cao nhất từ noãn thu được từ sự kết hợp 2mg/l 2,4-D và 1mg/l kinetin. Sự kết hợp giữa NAA và BA cho tỉ lệ tạo mô sẹo thấp, chỉ 17% từ noãn và 0% từ bao phần. Riêng môi trường chỉ bổ sung kinetin (2mg/l) không có sự phát sinh mô sẹo từ mẫu cây. Mô sẹo hình thành từ noãn ốt sừng bò có kích thước nhỏ, hơi bông xốp, khác với hầu hết mô sẹo hình thành từ bao phần, thường là một khối cứng có màu trắng sữa đến vàng (Hình 1-D).

Khảo sát trên đối tượng ốt Nhật cho thấy khả năng phát sinh mô sẹo từ bầu noãn ốt Nhật khá thấp, chỉ đạt 8,6 – 11,3% ở môi trường nuôi cấy có bổ sung 4mg/l NAA + 1mg/l BA hoặc 0,5mg/l TDZ và chưa ghi nhận được trên các môi trường thí nghiệm còn lại. Khó khăn trong thí nghiệm này là tỉ lệ mẫu noãn bị chết sau khi vô mẫu khá cao (51,9% tổng số noãn dùng trong thí nghiệm), do đó ảnh hưởng đến tỉ lệ tạo mô sẹo. Môi trường nuôi cấy bổ sung thêm 0,5g/l than hoạt tính, cùng với 2mg/l 2,4-D và 1mg/l BA cho tỉ lệ tạo mô sẹo từ bao phần đạt cao nhất, trong khi không ghi nhận được ở cùng loại môi trường nhưng không bổ sung than hoạt tính, ngoài ra, môi trường nuôi cấy bổ sung 1,5mg/l TDZ cũng cho tỉ lệ tạo mô sẹo tương đương.

Từ bao phấn và noãn khi nuôi cấy có khả năng cảm ứng thành mô sẹo hoặc phôi soma, từ đó tái sinh chồi đơn bội[6,10]. Trong 4 giống ớt khảo sát, chỉ duy nhất ở ớt chuông có sự xuất hiện phôi hoặc mô sẹo phôi hóa hình thành trực tiếp từ bao phấn, thu được với tỉ lệ rất thấp (2,7 – 4,7%) trên 2 loại môi trường: bổ sung 0,5mg/l TDZ và bổ sung 2mg/l 2,4-D + 1mg/l kinetin; và chỉ 42,9% trong số đó tái sinh thành công chồi trên môi trường tái sinh bổ sung 0,5mg/l BA. Mô sẹo phôi hoá sẽ có xu hướng tạo phôi vô tính, từ đó tái sinh chồi trên môi trường có hàm lượng BA

thấp, và có xu hướng phát triển không bình thường ở môi trường có BA nồng độ cao[11]. Ở đây môi trường với nồng độ BA 0,5mg/l đã giúp tái sinh thành công chồi từ phôi và mô sẹo phôi hóa. Nghiên cứu cũng ghi nhận sự hình thành mô sẹo từ noãn ớt chuông chỉ trên 2 loại môi trường: bổ sung 2mg/l 2,4-D và 1mg/l BA hoặc bổ sung 0,5mg/l TDZ với tỉ lệ không cao (Bảng 3). Riêng đối với bao phấn, môi trường thích hợp nhất để cảm ứng tạo mô sẹo cũng là môi trường cảm ứng được mô sẹo phôi hóa tốt nhất – môi trường MS có bổ sung 2mg/l 2,4-D + 1mg/l kinetin.



Hình 1 Nuôi cấy bao phấn và noãn ớt. A – Noãn ớt sừng Nhật trong MS + 3mg/l kinetin + 1mg/l BA; B – Noãn ớt chuông trong MS + 2mg/l 2,4D + 1mg/l BA; C – Bao phấn ớt hiểm trong MS + 2mg/l 2,4D + 1mg/l BA; D – Bao phấn ớt sừng bò trong MS + 2mg/l 2,4D + 1mg/l kinetin; E – Bao phấn ớt chuông trong MS + 2mg/l 2,4D + 1mg/l kinetin; F – Mô sẹo phôi hóa từ bao phấn ớt chuông; G – Phôi vô tính từ bao phấn ớt chuông; H – Chồi tái sinh từ phôi bao phấn ớt chuông; I – Mô sẹo bao phấn ớt hiểm trong MS + 2mg/l kinetin; J – Mô sẹo bao phấn ớt sừng bò trong MS + 0,5mg/l TDZ; K – Mô sẹo bao phấn ớt sừng Nhật trong MS; L – Mô sẹo bao phấn ớt chuông trong MS + 1mg/l BA.

So sánh với kết quả của Trần Khắc Thi và cộng sự (2010), việc xử lí lạnh bao phấn ớt 4°C trong 24 giờ cũng được cho là bước tiền xử lí cần thiết đối với quá trình phát sinh mô sẹo từ bao phấn ớt. Tuy nhiên, đối với giống ớt Hotchili trong thí nghiệm của nhóm tác giả, môi trường MS bổ sung 4mg/l NAA + 1mg/l BA là môi trường thích hợp nhất dùng trong cảm ứng tạo mô sẹo từ bao phấn và cho mô sẹo có màu xanh đặc trưng[7], nhưng trong nghiên cứu này, môi trường với cùng thành phần và nồng độ không cho sự hình thành mô sẹo từ bao phấn ớt sừng bò và ớt chuông, và chỉ cho tỉ lệ hình thành mô sẹo ở bao phấn hai loại ớt còn lại ở mức không cao. Mô sẹo tạo thành có màu trắng hơi hồng. Nhóm nghiên cứu cũng cho rằng những mô sẹo có màu vàng đến xanh cho khả năng tái sinh chồi cao. Trong nghiên cứu này, chỉ có một số mô sẹo tạo thành từ bao phấn

ớt chuông đầu tiên có màu trắng sữa và dần chuyển sang màu xanh hơi vàng trong 4 tuần nuôi cấy tiếp theo. Auxin thường được bổ sung vào môi trường để cảm ứng sự tạo mô sẹo từ mẫu cấy, và thường sử dụng nhất là 2,4-D, tuy nhiên để cảm ứng sự tạo mô sẹo từ cây hai lá mầm, người ta thường sử dụng kết hợp auxin với cytokinin; tỉ lệ auxin/cytokinin cao sử dụng để cảm ứng sinh phôi hoặc rễ, trong khi nồng độ không quá chênh lệch dùng để cảm ứng mô sẹo[10,12]. Nghiên cứu của Qin và Rotino (1995) cũng cho thấy sự kết hợp của 2,4-D với BA hoặc kinetin phù hợp với nuôi cấy bao phấn ớt tạo chồi đơn bội[13]. Do vậy, trong nghiên cứu này, các nghiệm thức kết hợp giữa 2,4-D với BA hoặc kinetin nhìn chung có sự hình thành mô sẹo rất tốt. TDZ sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật với vai trò chính điều hòa sự hình thành và phát triển của mô sẹo[12].

Trong các nghiên cứu về nuôi cấy bao phấn, TDZ rất ít được sử dụng ở giai đoạn cảm ứng phôi, tuy nhiên thường được sử dụng trong nuôi cấy noãn [6]. Đối với sự tạo mô sẹo của 4 giống ốt, TDZ chỉ cho hiệu quả ở bao phấn ốt sừng Nhật và noãn ốt chuông với tỉ lệ < 50%.

Than hoạt tính (AC) sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật có khả năng hấp phụ một số hợp chất gây ức chế mẫu có mặt trong môi trường nuôi cấy bao gồm các hợp chất phenolic và các chất độc khác tiết ra từ mẫu cây [10,12]. Trong nuôi cấy bao phấn, một số nghiên cứu đã ghi nhận rằng AC giúp cải thiện tỉ lệ sinh phôi từ bao phấn cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), lúa mì (*Triticum aestivum*), cải bắp đại (*Brassica oleracea*), cải dầu (*Brassica napus*), cải thìa (*B. rapa* ssp. *chinensis*), cây sồi (*Quercus suber*), ớt cay (*Capsicum annuum*),... Trong đó, AC giúp loại bỏ khí ethylen do bao phấn sinh ra trong bình nuôi cấy, cũng có nhận định cho rằng tác dụng của AC nhờ vào sự hấp thu một số chất gây độc mẫu cây, không phải ethylene [14]. Điều này cũng giải thích cho ảnh hưởng tích cực đến tỉ lệ tạo mô sẹo của AC trong môi trường nuôi cấy bao phấn ốt sừng Nhật có 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BA; tuy nhiên không ghi nhận được ở 3 giống ốt còn lại. Nghiên cứu trên cải dầu và cải bẹ xanh cho thấy AC có thể gây ức chế sự phát triển của phôi soma và làm giảm tỉ lệ tạo mô sẹo từ bao phấn ở lê Nashi [14]. Riêng ốt hiêm, môi trường nuôi cấy tốt nhất để tạo mô sẹo từ bao phấn, khi bổ sung thêm 0,5g/l AC lại không thu nhận được mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy, có thể giải thích do AC hấp thu các chất kích thích sinh trưởng trong môi trường, do đó không hoặc chưa có sự hình thành mô sẹo.

Nhìn chung, cả 4 loại ốt thí nghiệm bao gồm ốt hiêm, ốt sừng bò, ốt chuông và ốt sừng Nhật đều có khả năng hình thành mô sẹo từ bao phấn và noãn khi được tiền xử lí và nuôi cấy trên những môi trường thích hợp. Tuy nhiên, khả năng tạo mô sẹo có sự khác nhau nhiều đối với mỗi loại ốt. Điều này cho thấy, kiểu gen của cây mẹ có sự ảnh hưởng nhất định đến quá trình nuôi cấy bao phấn và noãn ốt, điều này cũng đã được Bajaj (1990) khẳng định trong báo cáo của mình [5].

Khả năng tái sinh chồi *in vitro* từ mô sẹo:

Sự hình thành chồi bất định từ mô sẹo xảy ra khi trong môi trường nuôi cấy có nồng độ auxin thấp và nồng độ cytokinin cao. Trong đó, BA đã được nghiên cứu là cytokinin khá hiệu quả sử dụng trong cảm ứng tạo chồi bất định từ mô sẹo [10]. Tuy nhiên, khi tái sinh chồi từ mô sẹo ốt, Trần Khắc Thi và cộng sự (2010) sử dụng môi trường bổ sung 0,02mg/l TDZ + 1mg/l GA3, cho tỉ lệ cây tái sinh là 7,3% [7]. Trong nghiên cứu này, sau 3 tuần nuôi cấy, 68,42% mô sẹo bao phấn ốt chuông dần chuyển sang màu xanh vàng trong môi trường nuôi cấy, trong đó, 10,5% mô sẹo có hiện tượng hình thành các phôi hình cầu trên môi trường nền MS và MS bổ sung 1mg/l BA; 46,2% mô sẹo chuyển màu xanh vàng trong môi trường bổ sung 1mg/l BA. Mô sẹo bao phấn ốt sừng bò chỉ chuyển sang màu xanh

vàng với tỉ lệ thấp (3,3%) trên môi trường bổ sung 1mg/l BA. Bên cạnh đó, 100% mô sẹo bao phấn ốt Nhật trên cả 4 loại môi trường đều chuyển màu xanh vàng trong môi trường tái sinh chồi. Đối với mô sẹo từ noãn, chỉ thu được mô sẹo chuyển sang màu xanh vàng ở trường hợp noãn ốt sừng bò với tỉ lệ 33,3%. Ở ốt hiêm, mô sẹo ban đầu có sự phát triển phình to, sau 3 tuần nuôi cấy có sự chuyển từ màu trắng sang nâu đến đen, không có khả năng tái sinh chồi. Nhìn chung, môi trường MS bổ sung 1mg/l BA phù hợp nhất cho sự phát triển của mô sẹo tái sinh chồi, tuy nhiên khả năng chuyển màu xanh vàng của mô sẹo phụ thuộc nhiều hơn vào giống ốt.

Bảng 4 Sự phát triển của mô sẹo từ bao phấn và noãn ốt trên môi trường tái sinh chồi

| Loại mẫu | Tỉ lệ mô sẹo chuyển xanh hơi vàng (%) | Tỉ lệ mô sẹo phát sinh phôi (%) | Tỉ lệ mô sẹo chết (%) |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Bao phấn ốt hiêm | 0 | 0 | 70 |
| Noãn ốt hiêm | 0 | 0 | 85 |
| Bao phấn ốt sừng bò | 3,3 | 0 | 2,6 |
| Noãn ốt sừng bò | 33,3 | 0 | 0 |
| Bao phấn ốt sừng Nhật | 100 | 0 | 0 |
| Noãn ốt sừng Nhật | 0 | 0 | 0 |
| Bao phấn ốt chuông | 68,4 | 10,5 | 5,3 |
| Noãn ốt chuông | 0 | 0 | 0 |

Sự hình thành của chồi tái sinh không ghi nhận được sau 3 tuần nuôi cấy, tuy nhiên, các mô sẹo bắt đầu sinh phôi hoặc chuyển dần sang màu xanh nhạt cho thấy sự khả quan trong việc hình thành phôi và tái sinh chồi.

4 Kết luận

Phôi và mô sẹo phôi hóa hình thành từ bao phấn ốt chuông trong môi trường MS + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l kinetin hoặc MS + 0,5mg/l TDZ với tỉ lệ 2,7 – 4,7% và 42,86% trong đó tái sinh thành công chồi trên môi trường MS bổ sung 0,5mg/l BA. Chưa tạo được chồi đơn bội từ nuôi cấy noãn ốt.

4 giống ốt thí nghiệm đều có khả năng cảm ứng mô sẹo từ bao phấn và noãn trên các môi trường phù hợp khác nhau, cụ thể: môi trường MS + 2mg/l 2,4D + 1mg/l BA phù hợp tạo mô sẹo từ ốt hiêm; với ốt sừng bò, tạo mô sẹo từ bao phấn trên môi trường MS + 3mg/l 2,4-D + 0,5 – 1mg/l BA, từ noãn trên môi trường MS + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l kinetin; đối với giống ốt sừng Nhật, môi trường MS + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BA + 0,5g/l than hoạt tính hoặc MS + 1,5mg/l TDZ phù hợp tạo mô sẹo từ bao phấn, tạo mô sẹo từ noãn trên môi trường MS + 3mg/l kinetin + 1mg/l BA, MS + 0,5mg/l TDZ hoặc MS + 4mg/l NAA + 1mg/l BA; tạo mô sẹo từ bao phấn ốt chuông trên môi trường MS + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l kinetin và từ noãn trên môi trường MS + 0,5mg/l TDZ hoặc MS + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BA. Xuất hiện mô sẹo chuyển màu

xanh vàng, thích hợp phát sinh phôi ở 3 giống ớt sừng bò, ớt chuông và ớt sừng Nhật. Mô sẹo của giống ớt hiểm không có khả năng tái sinh chồi.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ NTTU, mã số đề tài: 2018.01.55.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Đức Lương, Lê Thị Thủy Tiên, 2011. Công nghệ tế bào, *Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh*.
2. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15: 473 – 497.
3. Wang Yu-Ying, Sun Ching-San, Wang Ching-chu, Chien Nan-Fen, 1973. The induction of the pollen plantlets of triticale and *Capsicum annuum* from anther culture, *Scientia Sinica*, Vol. 16, Issue 1: 147 – 151.
4. Teodora Irikova, Stanislava Grozeva, Velichka Rodeva, 2011. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*, *Acta Physiol Plant*, 33:1559 – 1570.
5. Bajaj Y.P.S., 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In Bajaj Y.P.S., eds. 1990. Haploids in crop improvement I, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 12, pp. 3 – 44.
6. Jin-Feng Chen, Li Cui, Ahmed Abbas Malik, Kere George Mbira, 2011. *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104: 311 – 319.
7. Trần Khắc Thi, Đoàn Thị Thùy Vân, Đặng Thu Hòa, Phạm Thị Thanh Thìn, Đặng Thị Mai, Chu Thị Lan Hương, Lê Thanh Nhuận, 2010. Nghiên cứu tạo cây dưa chuột và ớt đơn bội bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn *in vitro*, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn* (3/2010).
8. Dudu Ozkum, R. Tipirdamaz, 2011. Effects of L-Proline and cold treatment on pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture. In: H. Gokcekus *et al.*, eds. Survival and Sustainability, *Environmental Earth Sciences*.
9. S.L. Kothari, A. Joshi, S. Kachhwaha, N. Ochoa-Alejo, 2010. Chilli peppers – A review on tissue culture and transgenesis, *Biotechnology Advances* 28: 35 – 48.
10. R.L.M. Pierik, 1987. *In vitro* culture of higher plants, *Martinus Nijhoff Publishers*, Netherlands.
11. Đỗ Năng Vịnh, Vũ Văn Vịnh, Hà Thị Thuý, Trần Thị Hạnh, Nguyễn Hồng Chiên, 2004. Nghiên cứu tạo mô sẹo phôi hoá và phôi vô tính từ nuôi cấy noãn ở một số giống cây ăn quả có múi, *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*, (2004): 2.
12. Saurabh Bhatia, 2015. Plant Tissue Culture. In: Saurabh Bhatia, Kiran Sharma, Randhir Dahiya, Tanmoy Bera, eds. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, *Acedemic Press*, Chapter 2, pp. 31 – 107.
13. Qin, X., Rotino, G.L., 1995. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes, *ISHS Acta Horticulturae* 402: 313 – 316.
14. Dennis Thomas, 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture, *Biotechnology Advances* 26: 618 – 631.

Protocol establishment of culturing doubled dihaploid plants *in vitro* on chilli (*Capsicum* sp.)

Ho Thi Cam Nguyen, Nguyen Thi Nha*

Faculty of Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University

*ntnha@ntt.edu.vn

Abstract Haploid shoots can be obtained by *in vitro* ovary and anther culturing, which is the first step in the process of breeding using plant tissue culturing. Anthers and unfertilized ovaries of 4 kinds of chilli peppers including hot red pepper, horn peppers, bell peppers and bullhorn peppers were cultured. The result showed that the death rate and the rate of callus formation from ovary and anther were improved through cold pretreatment. Callus from anthers and ovaries were obtained from all four types of peppers in suitable culture media. Callus when transferred to regenerating media, changed from white to yellow green and became suitable for shoot regeneration. Embryos and embryonic callus were induced from bell pepper anthers on MS + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l kinetin or MS + 0.5mg/l TDZ (2.7 – 4.67% of anthers), of which only 42.86% regenerated shoots successfully on MS medium added 0.5mg/l BA. It was impossible to regenerate shoot from calluses of hot red peppers. calluses from 3 remaining kinds of peppers were capable of regenerating somatic embryo.

Keywords haploid, capsicum, callus, anther culture, ovary culture

