THU NHẬN PHÔI THỂ HỆ TỪ DỊCH TREO TẾ BÀO LÚA (*Oryza sativa* L.) DÒNG *BẰNG NGỌC*

Đoàn Thị Phương Thùy, Phan Ngô Hoang và Bùi Trang Việt
Bộ môn Sinh lý thực vật-Di truyền, Trường ĐH. KHTN, Đại học Quốc gia TP.HCM
(Bài nhận ngày 01 tháng 3 năm 2002)

TÓM TẮT: *Việc nuôi cấy dịch treo tế bào nhằm tạo ra một quần thể đồng nhất các tế bào có khả năng sinh phôi phục vụ cho các nghiên cứu về sự sinh phôi thể hệ, vi nhân giống và chuyển gen ở thực vật.*

Trong nghiên cứu này chúng tôi tìm phương pháp để tạo dịch treo tế bào lúa (Oryza sativa L.) dòng Bằng Ngọc và duy trì khả năng tái sinh của các tế bào dịch treo này. Mô sẹo được tạo từ việc nuôi cấy hột trưởng thành trên môi trường MS + 2mg/l 2,4- D +1mg/l NAA + 0,5mg/l BA. Các mô sẹo này được đặt vào các Erlen có dung tích 100ml chứa 10ml môi trường MS + 5mg/l 2,4-D với nồng độ đường sacaroz 2%(pH 5,8). Môi trường lỏng được lắc liên tục với vận tốc 80vòng/ phút, ở các điều kiện: ánh sáng 2000 ± 500 lux(12giờ/ ngày), nhiệt độ 28 ± 2^{0}C, ẩm độ 65 ± 5%. Để kiểm tra khả năng tái sinh của các tế bào dịch treo, các mô sẹo được tạo từ dịch treo tế bào được đặt trên môi trường N_6 +2mg/l BA + 0,5mg/l NAA. Các biến đổi hình thái trong quá trình phát triển phôi thể hệ được theo dõi. Các cây con thu được sau giai đoạn phát triển phôi được chuyển sang môi trường MS nhằm kích thích sự tạo rễ.

MỞ ĐẦU

Phương pháp nuôi cấy mô thực vật ngày nay đã phát triển trong các lĩnh vực tăng trưởng, biến dưỡng, di truyền, chuyển gen và lai tạo ở thực vật. Sự nuôi cấy mô lúa bắt đầu từ sự nuôi cấy cơ quan rễ cắt rời vào những năm 1950; sự tái sinh cây được thực hiện từ mô sẹo có nguồn gốc từ hột, rễ và hạt phấn, và từ dịch treo tế bào cũng như từ tế bào trần (Jenes và Pauk 1989, Oono 1984, Terada và Shimaimoto 1993). Trong một nghiên cứu đã công bố, chúng tôi đã tạo mô sẹo từ hột lúa trưởng thành, sau đó thu nhận phôi thể hệ từ mô sẹo nếu giảm lượng auxin trong môi trường nuôi cấy (Trần Thị Bích Trinh và CSV 2000). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm cách tạo dịch treo tế bào và thu nhận phôi thể hệ từ dịch treo tế bào đạt được.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mô sẹo được tạo từ hột lúa trên môi trường MS (Murashige & Skoog 1962) có bổ sung sacaroz 30g/l, 2,4-D 2mg/l, NAA 1mg/l và BA 0,5mg/l như đã mô tả (Trần Thị Bích Trinh và csv. 2000).

Phương pháp

Tạo dịch treo tế bào

Cho 0,5g mô sẹo 4 tuần tuổi vào Erlen có dung tích 100ml chứa 10ml môi trường MS với sacaroz 20g/l, 2,4-D ở các nồng độ thay đổi: 1, 3, 5, 7mg/l. Môi trường lỏng được lắc liên tục với vận tốc 80 vòng/phút, ở các điều kiện: ánh sáng 2000±500 lux (12 giờ/ngày), nhiệt độ 28±2^{0}C, ẩm độ 65±5%.

Để theo dõi sự tăng trưởng tế bào (theo nồng độ 2,4-D), sau 2 tuần nuôi cấy mô sẹo 4 tuần tuổi, dùng micropipet để hút các tế bào riêng rẽ và các nhóm tế bào có đường kính nhỏ hơn 1mm. Sau đó, để lắng các tế bào và nhóm tế bào nầy, loại bỏ môi trường cũ (bằng micropipet) và bổ sung môi trường mới cùng thành phần (10ml/Erlen 100ml).

Sự phát sinh phôi từ dịch treo tế bào

Các nhóm tế bào từ dịch treo tế bào (sau một tháng từ lần cấy chuyền sau cùng với môi trường có 2,4-D 5mg/l) được đặt trên môi trường N6 (Chu *et al.* 1975) với BA 2mg/l và NAA 0,5mg/l và được nuôi ở điều kiện: ánh sáng 2500±500 lux (12 giờ/ngày), nhiệt độ 28±2^{0}C, ẩm độ 65±5%.

Sự tăng trưởng của cây con

Các cây con sau giai đoạn phát triển phôi được chuyển sang môi trường MS không có chất điều hòa tăng trưởng thực vật, ở các điều kiện ánh sáng 2500±500 lux (12 giờ/ngày), nhiệt độ 28±2^{0}C, ẩm độ 65±5%.

Quan sát hình thái giải phẫu

Mô cấy trên các môi trường khác nhau được cắt lát, nhuộm hai màu (đỏ Carmin, xanh Iod) và quan sát dưới kính hiển vi. Tế bào dịch treo được quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi.

Xác định trọng lượng tươi của tế bào dịch treo

Trọng lượng tươi của tế bào được xác định sau sự ly tâm 800vòng/phút, trong 10 phút, và cân phần trầm hiện.

KẾT QUẢ

Sự tạo dịch treo tế bào

Sau 1 tuần kể từ lúc đặt các khối mô sẹo trong môi trường lỏng, có sự phóng thích các nhóm nhỏ tế bào (20-50 tế bào/ nhóm) từ khối mô sẹo lớn (ảnh 1). Sự tăng trưởng của các nhóm tế bào nầy xảy ra nhanh chóng dẫn đến sự hình thành các khối mô sẹo có kích thước 1-4mm.

Ảnh hưởng theo nồng độ của 2,4-D trên sự tăng trưởng dịch treo

Mật độ tế bào gia tăng trong các môi trường có nồng độ 2,4-D thay đổi từ 1 tới 5mg/l nhưng giảm mạnh ở nồng độ 7mg/l, sau 1-2 tuần nuôi cấy. Tương tự, trọng lượng tươi của tế bào dịch treo cũng gia tăng rõ theo nồng độ 2,4-D từ 1-5mg/l (bảng 1).

Bảng 1: Trọng lượng tươi (mg) của tế bào trong môi trường lỏng với nồng độ 2,4-D thay đổi theo thời gian nuôi cấy.

Thời gian (tuần)	2,4-D 1mg/l	2,4-D 3mg/l	2,4-D 5mg/l
1	180 ± 67	280 ± 52	550 ± 28
2	242 ± 45	343 ± 18	1580 ± 24
3	340 ± 18	627 ± 25	1830 ± 21
4	484 ± 44	894 ± 46	2360 ± 19

Sự thu nhận phôi thể hệ

Sau 5 ngày kể từ lúc đặt tế bào dịch treo lên môi trường N6 với BA 2mg/l và NAA 0,5mg/l, phôi hình cầu xuất hiện với biểu bì (ảnh 2). Phôi hình chùy với chỗ khuyết hình miệng núi lửa đặc trưng xuất hiện ở ngày thứ 7 (ảnh 3 và 4). Mô phân sinh ngọn với các phác thể lá xuất hiện sau 7 ngày nuôi cấy (ảnh 5). Phôi trưởng thành xuất hiện ở ngày thứ 10 (ảnh 6). Sau 15 ngày, cụm chồi xuất hiện trên cùng môi trường (ảnh 7). Các chồi sau khi chuyển sang môi trường MS tăng trưởng thành cây hoàn chỉnh với hệ thống rễ (ảnh 8).

THẢO LUẬN

Sự nuôi cấy tế bào và thu nhận phôi thể hệ từ mô sẹo và dịch treo tế bào lúa xảy ra theo cách phổ biến được chứng minh ở các cây đơn tử diệp và song tử diệp. Quá trình nầy nói chung xảy ra theo hai giai đoạn: giai đoạn 1 là sự tạo các tế bào có khả năng sinh phôi (trong mô sẹo hay dịch treo tế bào) với vật liệu ban đầu là mô hay cơ quan non đang tăng trưởng, trên môi trường nhân tạo có chứa một auxin mạnh như 2,4-D; giai đoạn 2 là sự tiến hóa phôi thể hệ từ các tế bào có khả năng sinh phôi trên môi trường giảm hay loại bỏ auxin ngoại sinh, hay thay thế auxin mạnh (như 2,4-D) bởi một auxin yếu hơn (như NAA). Trong các quá trình nầy, cytokinin ngoại sinh (như BA) có vai trò hỗ trợ cho hoạt động của auxin (Ahloowalia 1991, Datta *et al.* 1992, Komamine *et al.* 1992)

2,4-D là auxin thường được dùng nhất để cảm ứng sự tạo mô sẹo ở lúa và nhiều cây đơn tử diệp khác. Nói chung, mô sẹo lúa được cảm ứng bởi 2,4-D nếu được tiếp tục nuôi cấy trên môi trường không auxin sẽ cho phép sự tái sinh cây (Nishi *et al.* 1983).

Tuổi mô sẹo và nồng độ 2,4-D trong môi trường lỏng là hai yếu tố quan trọng trong sự tăng trưởng của dịch treo tế bào lúa dòng Bằng Ngọc. Thật vậy, mô sẹo 4 tuần tuổi cho nhiều tế bào đẳng kính và tế bào chất đậm đặc so với mô sẹo 2 tuần tuổi (tài liệu chưa công bố). Trong thử nghiệm nầy, 2,4-D kích thích mạnh nhất sự phân chia tế bào (gia tăng trọng lượng tươi) ở nồng độ 5mg/l.

Các biến đổi hình thái trong sự tạo phôi thể hệ lúa được trình bày trong khảo cứu nầy xảy ra theo cách rất đặc trưng, từ giai đoạn hình cầu, hình chùy cho tới giai đoạn tạo mô phân sinh ngọn với các phác thể lá. Hơn nữa, như chúng tôi đã chứng minh trong sự thu nhận phôi thể hệ từ mô sẹo lúa (Trần Thị Bích Trinh và csv. 2000), hàm lượng auxin bên trong mô cấy giảm dần trong sự tiến hóa phôi, trong khi hàm lượng cytokinin bên trong mô cấy lại tăng dần. Ý nghĩa của sự thay đổi hàm lượng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nầy chưa được hiểu rõ.

KẾT LUẬN

Hệ thống tế bào lúa dòng Bằng Ngọc đạt được dầu chưa hoàn hảo, nhưng phần nào đã sẵn sàng cho các áp dụng công nghệ sinh học thực vật và một số nghiên cứu về sinh lý tế bào cũng như qúa trình sinh phôi thể hệ.

Cảm ơn: Bài báo trình bày một phần kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cơ bản cấp Bộ (đã nghiệm thu): "Nuôi cấy tế bào Lúa, Chuối và Khoai mì. Sự tạo mô sẹo và dịch treo tế bào" do TS. Bùi Trang Việt chủ trì đề tài. Các tác giả chân thành cảm ơn Bộ giáo dục và đào tạo, Đại học quốc gia TP.HCM và Trường Đại học Khoa học tự nhiên đã xét duyệt và cấp kinh phí, Hội đồng nghiệm thu do GSTS. Mai Trần Ngọc Tiếng làm Chủ tịch hội đồng và Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam đã cung cấp dòng lúa Bằng Ngọc.

HÌNH ẢNH MINH HOẠ

Ảnh 1: Tế bào dịch treo trong môi trường MS có bổ sung 2,4-D 5mg/l, sau 1 tuần nuôi cấy. (Thanh ngang 25μm)

Ảnh 2: Phôi hình cầu từ tế bào dịch treo Lúa dòng Bằng ngọc sau 5 ngày trên môi trường N6 có bổ sung BA 2mg/l và NAA 0,5mg/l. (Thanh ngang 100μm)

Ảnh 3: Phôi hình chùy từ tế bào dịch treo Lúa dòng Bằng ngọc sau 7 ngày trên môi trường N6 có bổ sung BA 2mg/l và NAA 0,5mg/l. (Thanh ngang 100μm)

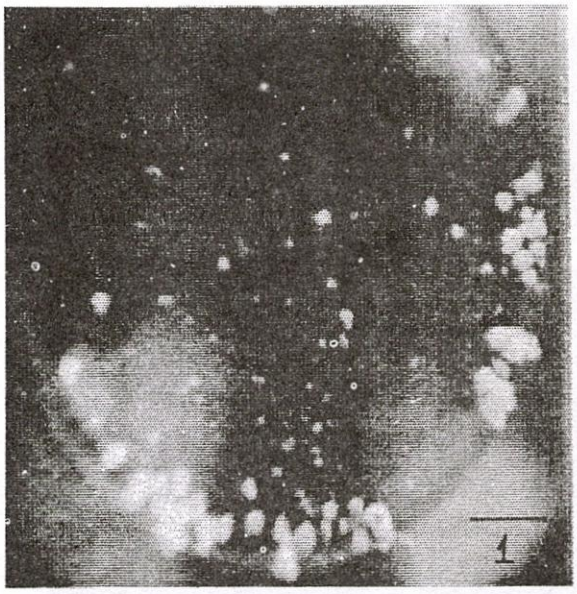
Ảnh 4: Phôi với chỗ khuyết hình núi lửa từ tế bào dịch treo Lúa dòng Bằng ngọc sau 7 ngày trên môi trường N6 có bổ sung BA 2mg/l và NAA 0,5mg/l. (Thanh ngang 100μm)

Ảnh 5: Mô phân sinh ngọn với phác thể lá từ tế bào dịch treo Lúa dòng Bằng ngọc sau 7 ngày trên môi trường N6 có bổ sung BA 2mg/l và NAA 0,5mg/l. (Thanh ngang 100μm)

Ảnh 6: Phôi trưởng thành từ tế bào dịch treo Lúa dòng Bằng ngọc sau 10 ngày trên môi trường N6 có bổ sung BA 2mg/l và NAA 0,5mg/l. (Thanh ngang 100μm)

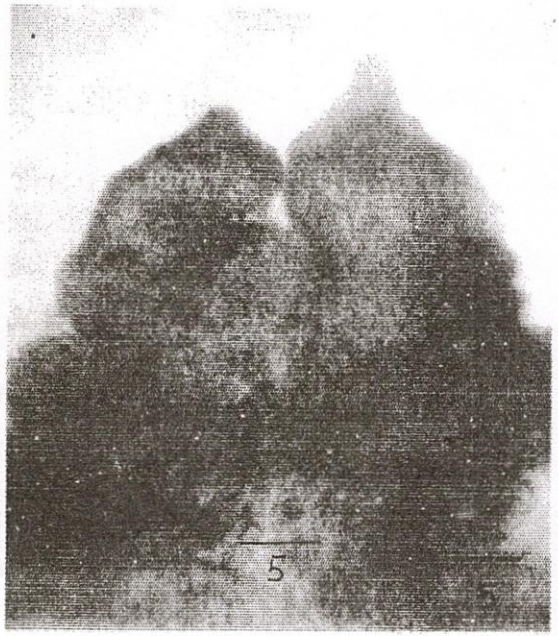
Ảnh 7: Cây từ dịch treo Lúa dòng Bằng ngọc sau 15 ngày nuôi cấy trên môi trường N6 có bổ sung BA 2mg/l và NAA 0,5mg/l. (Thanh ngang 1,5cm)

Ảnh 8: Cây con sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS không hormon. (Thanh ngang 0,5cm)


1

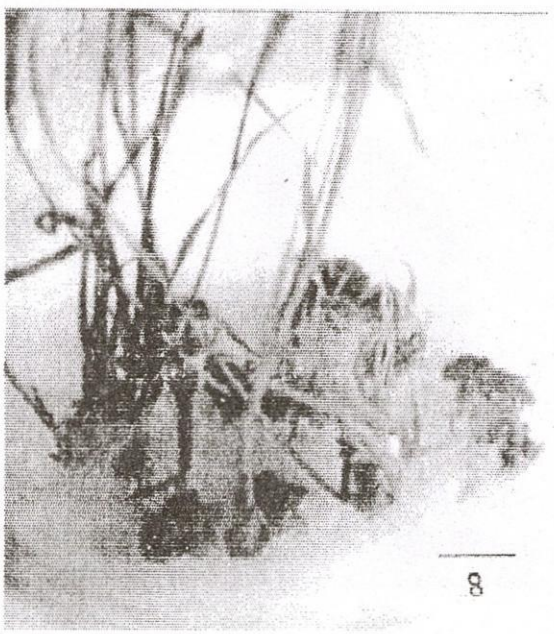
3

4


5

6

7


8

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANTLET REGENERATION FROM CELL SUSPENSION CULTURE IN RICE
(*Oryza sativa* L. cv. Bang Ngoc)

Đoan Thi Phuong Thuy, Phan Ngo Hoang and Bui Trang Viet
Department of Biology, University of Natural Sciences, VNU-HCM
(Received 01 March 2002)

ABSTRACT: Cell suspension culture is a useful source of somatic cell for plant embryogenesis and genetic manipulation studies. The development of a method for establishing and maintaining *Oryza sativa* L. cv. Bang Ngoc cell cultures with high generative capacity was the objective of this study. Callus was obtained from mature seeds, on medium with 2mg/l 2,4-D, 1mg/l NAA, and 0.5mg/l BA. The callus was placed in 100ml Erlenmeyer flasks (0,5g per flask) containing 10 ml of MS medium adjusted to pH 5.8 and supplemented with 5mg/l 2,4-D, and 2% sucrose. The cultures were exposed to a 12-h photoperiod (2500 ±500lux) at 28±2^{0}C with shaking at 80rpm on a gyratory shaker. To test the generative capacity, callus was harvested from the cell suspension cultures and placed on N6 agar medium containing 2mg/l BA and 0.5mg/l NAA. Histological studies confirmed different stages of somatic embryogenesis. The planlets obtained were transferred to a simple and hormone-free MS medium to facilitate regeneration of normal roots.

Key words: callus, cell suspension culture, *Oryza sativa* cv. Bang Ngoc, plant regeneration, somatic embryogenesis.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Ahloowalia B.S., 1991. *Somatic embryos in monocots. Their genesis and genetic stability.* Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot. 14: 223-235

[2] Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S., Hsu C., Yin K.C., Chu C.Y. and Bi F.Y. 1975. *Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources*. Scientia Sinic. 18: 659-668.

[3] Datta K., Potrykus I. and Datta S. 1992. *Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of the Indica rice breeding line IRF2* (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Reports 11: 229-233.

[4] Jenes B. and Paeck J. 1989. *Plant regenetion from protoplast derived calli in rice (Oryza sativa L.) using dicamba.* Plant science, 63: 187-198.

[5] Komamine A., Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Toya T., Fujiwara A., Tsukahara M., Smith J., Ito M., Fukuda H., and Fujimura T. 1992. *Mechanisms of*

somatic embryogenesis in cell cultures: Physiology, Biology and Molecular Biology. In vitro Cell. Dev. Biol. 28: 11 – 14.

[6] Murashige T. and Skoog F. 1962. *A rivesed medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant 15: 473- 497.

[7] Nishi T., Yamada Y. and Takahashi E. 1983. *The role of auxins in differentiation of rice tissue culture in vitro*. Bot. Mag. 86: 183-188.

[8] Oono K. 1984. *Tissue culture and genetic engineering in rice. Biology of Rice*. Japan Sci. Soc. Press, 339-358.

[9] Terada R. and Shimaimoto K. 1993. *Rice as a model cereal for studies of tranformation in monocot*. J. Plant Rep. 3: 201-211.

[10] Trần Thị Bích Trinh, Phan Ngô Hoang và Bùi Trang Việt 2000. *Nuôi cấy tế bào lúa (Oryza sativa L.) dòng Bằng Ngọc*. Tạp chí Phát triển Khoa học Công nghệ, 3: 92 – 97.