

NUÔI CẤY TẾ BÀO LÚA (*ORYZA SATIVA L.*) DÒNG BẰNG NGỌC

Trần Thị Bích Trinh – Phan Ngô Hoang – Bùi Trang Việt

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

(Bài nhận ngày 22/11/2000)

hoàn chỉnh sửa chữa ngày 09/12/2000)

TÓM TẮT : Mục đích của nghiên cứu là đề nghị một hệ thống tế bào in vitro có thể dùng trong các nghiên cứu cải tiến giống lúa Bằng Ngọc. Các hạt trưởng thành được dùng làm vật liệu thực vật. Ảnh hưởng của chất trích thô chứa các chất điều hòa tăng trưởng thực vật (auxin, gibberelin, cytokinin, và abscisic acid) từ mô thực vật trên sự sinh phôi thể hệ được tìm hiểu. Môi trường tạo sẹo chứa 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l và BA 0,5 mg/l. Mô sẹo hình thành từ lớp thuần sau 3 ngày nuôi cấy. Tần số tái sinh cao khi mô sẹo được chuyển sang môi trường chứa NAA 0,5 mg/l và BA 2 mg/l hoặc NAA 0,05 mg/l và BA 0,5 mg/l. Sau 5 ngày trên môi trường tái sinh, phôi ở giai đoạn hình cầu xuất hiện trên bề mặt mô sẹo. Các cây con được chuyển sang môi trường MS không có các chất điều hòa tăng trưởng thực vật để tạo rễ bình thường.

Từ khóa: mô sẹo, phôi, *Oryza sativa* cv. Bằng Ngọc, chất điều hòa tăng trưởng thực vật, tái sinh, sinh phôi thể hệ, thuần.

MỞ ĐẦU

Việt Nam là nước có tiềm năng rất lớn về lúa. Sưu tập tại Viện lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long có hơn 1800 mẫu giống và hàng trăm quần thể lúa hoang (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang 1999). Cây lúa dòng Bằng ngọc có thời gian sinh trưởng 150-156 ngày, năng suất 4,8 tấn/ha, có tính kháng rầy cấp 3 (Nguyễn Thị Cúc và csv. 1993). Sự nghiên cứu nuôi cấy tế bào lúa nhằm tìm phương pháp thích hợp nhất cho từng giống hay từng nhóm lúa, cần thiết cho việc áp dụng các công nghệ sinh học thực vật.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hạt lúa trưởng thành *Oryza sativa*, dòng Bằng ngọc.

Phương pháp

- Sự tạo mô sẹo

Hạt lúa sau khi bóc vỏ được khử trùng bằng hypohloride calcium 10% trong 30 phút; sau đó, cấy các hạt vào môi trường MS (Murashige & Skoog 1962) đặc có bổ sung 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l và BA 0,5 mg/l (môi trường tạo sẹo). Mẫu cấy được đặt trong tối, ở nhiệt độ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- Sự tái sinh cây qua con đường sinh phôi thể hệ

Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo sẹo, các khối mô sẹo từ hạt được tách ra và đặt trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 0,2mg/l; NAA 0,5 mg/l và BA 2mg/l; hay NAA 0,05 mg/l và BA 0,5 mg/l. Mẫu cấy được nuôi ở ánh sáng 3000 ±200 lux (12 giờ chiếu sáng/ngày), nhiệt độ 27± 2⁰C. Theo dõi các biến đổi hình thái tế bào trong quá trình sinh phôi bằng phương pháp nhuộm 2 màu (đỏ carmin/xanh iod) và quan sát dưới kính hiển vi.

- Đo hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được ly trích và phân đoạn bằng phương pháp sắc ký trên giấy; hoạt tính được xác định nhờ các sinh trắc nghiệm, kết quả được qui ra tương đương với µg IAA, GA₃ hay BA/g trọng lượng tươi (Bùi Trang Việt 1992).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự tạo mô sẹo

Trên môi trường tạo sẹo, sau 3 ngày nuôi cấy có sự hình thành mô sẹo từ lớp thuần. Sau 4 tuần, mô sẹo có những nốt tròn và chứa những tế bào có kích thước đồng đều, dẹt kính, vách mỏng, tế bào chất đậm đặc (ảnh 1); đó là những đặc tính của tế bào có khả năng sinh phôi (Bùi Trang Việt 1994).

Sự tái sinh cây từ mô sẹo

Trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 0,2 mg/l, mô sẹo 4 tuần tuổi tiếp tục tạo sẹo. Trong khi trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l và BA 2 mg/l, mô sẹo cho phôi hình cầu sau 5 ngày nuôi cấy (ảnh 2). Sau 7 ngày, phôi hình cầu phân hóa mạch (ảnh 3); và đặc điểm hình thái của phôi thể hệ ở giai đoạn này có thể so sánh với một phôi trưởng thành (ảnh 4). Sau 14 ngày, có sự hình thành các cụm chồi thấy được bằng mắt thường (ảnh 5). Cụm chồi này tiếp tục phát triển với hệ thống rễ sau 1 tuần chuyển sang môi trường MS (ảnh 6).

Tương tự, trên môi trường MS với NAA 0,05 mg/l và BA 0,5 mg/l, mô sẹo cho phôi hình cầu sau 5 ngày nuôi cấy. Sau 14 ngày, có sự xuất hiện chồi; các chồi này phát triển thành cây sau 1 tuần chuyển sang môi trường MS. Các kết quả được trình bày phù hợp với một trong những quan điểm hiện nay (Ahloowalia 1991): để con đường sinh phôi thể hệ xảy ra, cần thay thế 2,4-D (2mg/l) bằng một auxin khác có hoạt tính yếu hơn (NAA) ở nồng độ thấp hơn (0,5mg/l hay 0,05mg/l). Sự giảm nồng độ 2,4-D (từ 2mg/l xuống 0,2mg/l) chưa đủ để khởi phát con đường sinh phôi thể hệ; sự bổ sung cytokinin (BA) cần thiết cho sự tái sinh cây ở lá Bàng ngọc cũng như ở một số cây đơn tử diệp khác.

Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật bên trong mô thực vật

Trong mô sẹo đang tăng trưởng (4 tuần tuổi), hoạt tính auxin, cytokinin và giberelin tăng mạnh chứng tỏ hoạt động kích thích sự phân chia tế bào của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật. Điều không rõ là sự gia tăng auxin và cytokinin là do sự gia nhập của các chất ngoại sinh hay do sự tổng hợp mới (bảng 3).

Bảng 3: Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong mô sẹo 4 tuần tuổi, mô cấy ở giai đoạn phôi hình cầu (1 tuần trên môi trường tái sinh*), và trong mô cấy ở giai đoạn cụm chồi (2 tuần trên môi trường tái sinh*).

Giai đoạn	Auxin ($\mu\text{g/gTLT}$)	Acid abscisic ($\mu\text{g/gTLT}$)	Cytokinin ($\mu\text{g/gTLT}$)	Giberelin ($\mu\text{g/gTLT}$)
Hột nguyên	-	$0,3 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,0$	$1,2 \pm 0,0$
Mô sẹo	$2,1 \pm 0,1$	-	$2,7 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,0$
Phôi hình cầu	$1,6 \pm 0,1$	-	$3,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$
Cụm chồi	$1,8 \pm 0,1$	-	$4,8 \pm 0,0$	$2,9 \pm 0,3$

(-), không có hoạt tính trong sinh trắc nghiệm; (*), môi trường tái sinh: NAA 0,5mg/l và BA 2mg/l

Trên môi trường tái sinh, nếu hoạt tính giberelin thay đổi không đáng kể, hoạt tính acid abscisic rất thấp trong tất cả các kiểu mô cấy thì hoạt tính auxin giảm rõ, trong khi cytokinin tăng mạnh. Kết quả phù hợp với kết quả xử lý chất ngoại sinh đã khởi phát con đường sinh phôi thể hệ: sự giảm auxin (trong môi trường và trong thực vật) cùng với sự tăng cytokinin (trong môi trường và trong thực vật) cần thiết cho sự sinh phôi thể hệ ở lúa Bằng ngọc. Tỷ lệ cytokinin/ auxin cao bên trong mô (so với mô sẹo) chắc chắn cần thiết cho sự phát triển phôi thể hệ và chồi sau đó.

KẾT LUẬN

1. Hột nảy mầm lúa Bằng ngọc là vật liệu thích hợp để tạo mô sẹo trên môi trường dinh dưỡng có 2,4-D 2mg/l, NAA 1mg/l và BA 0,5mg/l.
2. Sự tạo phôi thể hệ ở lúa Bằng ngọc cần sự hiện diện của cytokinin và sự giảm auxin (trong môi trường và trong mô thực vật).

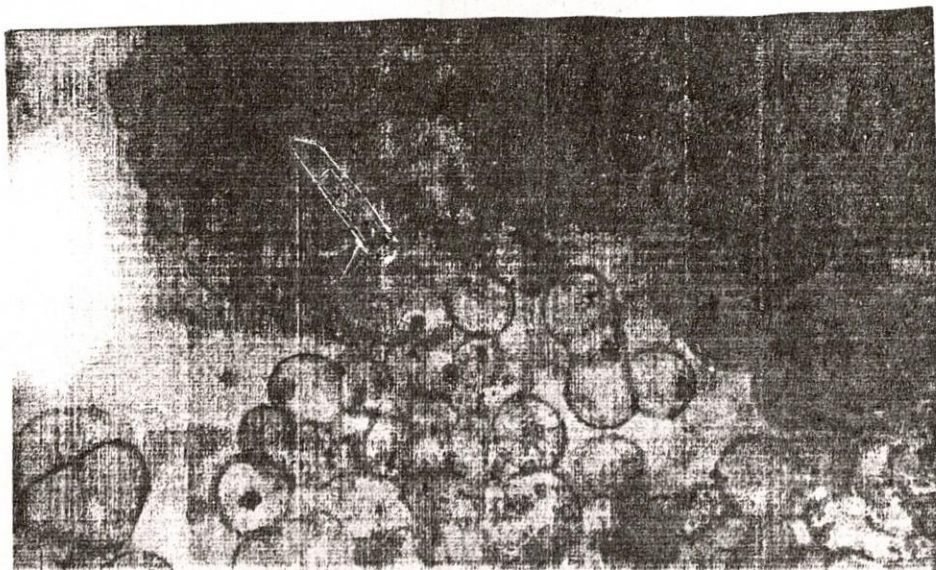
A STUDY FOR THE CHARACTERIZATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS ON RICE (*Oryza sativa* L. cv. Bang ngọc)

Tran Thi Bích Trinh - Phan Ngo Hoang - Bui Trang Viet

ABSTRACT: The objective of our research is to develop an in vitro system which might be used in the improvement of this crop. Mature seeds of a cultivar of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bang Ngọc) were used as plant material. Effects of the crude extracts containing plant growth regulators (auxins, gibberellins, cytokinins, and abscisic acid) from plant tissues on somatic embryogenesis were studied. The callus initiation medium contained 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA, and 0,5 mg/l BA. The scutellum of mature embryos grew into callus after 3 days in culture. Best regeneration frequencies were obtained when pieces of callus were grown on regeneration medium with either 0,5 mg/l NAA and 2 mg/l BA or 0,05 mg/l NAA and 0,5 mg/l BA. After a 5 day period, globular-stage embryos were visible on the surface of calli. The planlets obtained

were transferred to a simple and hormone-free MS medium to facilitate regeneration of normal roots.

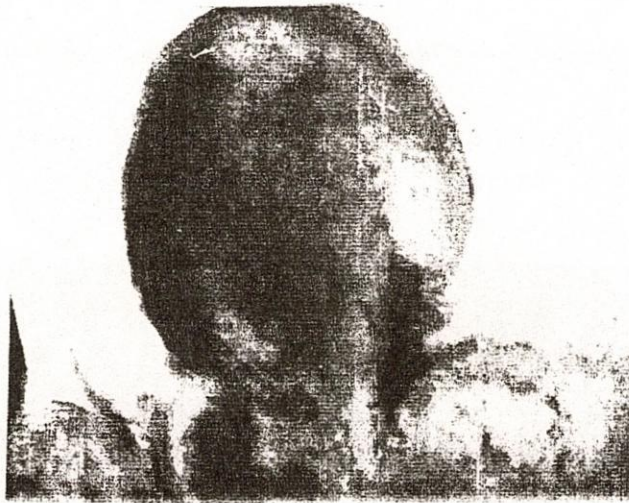
Key words: callus, embryos, *Oryza sativa* cv. Bang Ngoc, plant growth regulators, plant regeneration, somatic embryogenesis, scutellum.



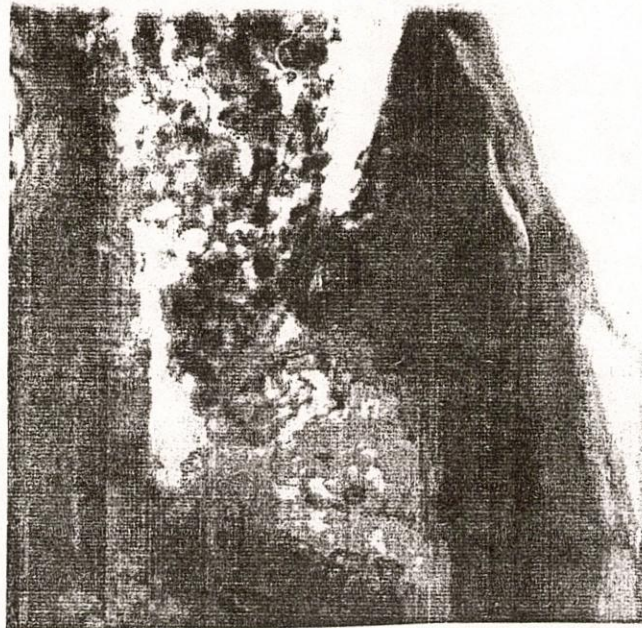
Ảnh 1: Mô sẹo 4 tuần tuổi trên môi trường MS + 2,4 D 2 mg/l +NAA 1mg/l và BA 0,5mg/l. Thanh ngang: 25 μm.



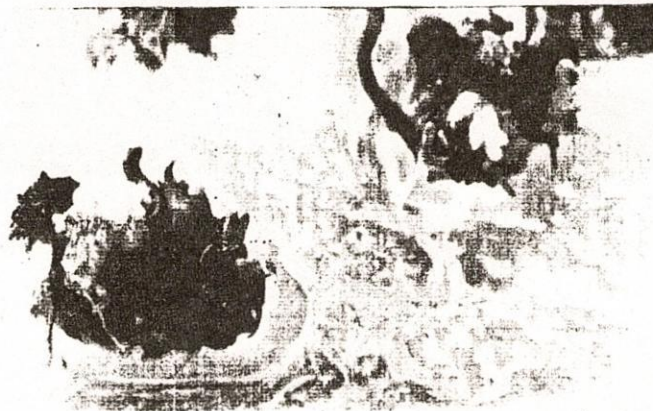
Ảnh 2: Phôi hình cầu xuất hiện từ mô sẹo sau 5 ngày trên môi trường MS + NAA 0,5mg/l+ BA 2mg/l . Thanh ngang 100μm.



Ảnh 3: Chi tiết một phôi hình cầu trên môi trường tái sinh, chú ý hệ thống mạch dẫn bắt đầu xuất hiện Thanh ngang 100 μ m.



Ảnh 4: Cây con sau 1 tuần trên môi trường tái sinh. Thanh ngang 250 μ m.



Ảnh 5: Cây con sau 2 tuần trên môi trường tái sinh. Thanh ngang 3mm.



Ảnh 6: Cây con 1 tuần trên môi trường MS. Thanh ngang 10mm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Ahloowalia B.S., 1991. Somatic embryos in monocots. Their genesis and genetic stability. Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot.

[2] Bùi Bá Bồng và Nguyễn Duy Bảy, 1997. Nghiên cứu biến dị soma trên giống lúa Một bụi và Khao Dawk Mali 105. Kết quả nghiên cứu khoa học 1977-1997 Viện lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.

[3] Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang 1999. Ứng dụng DNA marker trong đánh giá quỹ gen cây Lúa. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, trang 1216-1225. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật.

[4] Bùi Trang Việt 1992. Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng “bông” và “trái non” Tiêu *Pipernigrum* L. Tập san khoa học trường Đại học Tổng hợp TP.HCM. Phần B: Khoa học Tự nhiên, trang 155-165.

[5] Bui Trang Việt 1994. Utilisation de systèmes cellulaires en vue de l'introduction de gènes d'intérêt agronomique pour l'amélioration des bananiers. Thèse Doctorat. Université de Paris-XI (Orsay, France), 271p.

[6] Nguyễn Thị Cúc và csv. 1993. Báo cáo kết quả nghiên cứu khoa học. Viện khoa học nông nghiệp Miền nam.

[7] Phillips G. C. and Collins G. B., 1980. Somatic Embryogenesis from Cell Suspension Cultures of Red Clover. Crop sci. 20: 323 – 326.

[8] Torres K. C., 1989. Tissue Culture Technique for Horticultural Crops. Chapman and Hall. NewYork- London, America. 283 p.

Cảm ơn: Các tác giả chân thành cảm ơn Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền nam đã cung cấp giống lúa Bằng ngọc, vật liệu dùng trong khảo cứu này.