

XÂY DỰNG HỆ THỐNG TÁI SINH *IN VITRO* TRÊN CÂY LÚA

Phan Thị Hương¹, Nguyễn Thị Phương Thảo^{2*}, Nguyễn Thị Thùy Linh²
Nguyễn Tràn Hiếu², Ninh Thị Thảo²

¹Trung tâm khảo nghiệm Khuyến nông Khuyến ngư Thái Bình

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: ninhthao85@gmail.com

Ngày gửi bài: 20.9.2013

Ngày chấp nhận: 20.9.2014

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích đánh giá khả năng tạo mô sẹo và tái sinh của bảy giống lúa bao gồm BM9630, NV1, NV2, NV3, J02 (thuộc nhóm *japonica*), Hương cốm và BC15 (thuộc nhóm *indica*). Tỷ lệ tạo mô sẹo của các giống lúa nghiên cứu trong khoảng 72-98%; trong đó, giống Hương cốm, NV1 và J02 có tỷ lệ tạo mô sẹo trên 90% (tương ứng 97%, 92% và 98%). Môi trường tạo mô sẹo thích hợp đối với giống Hương cốm và các giống *japonica* là môi trường muối N6 + vitamin B5 + 3 mg/l 2,4-D + 100 mg/l myo-inositol + 500 mg/l L-proline + 500 mg/l L-glutamin + 300 mg/l casein hydrolysate + 30 g/l sucrose. Khảo sát ảnh hưởng của 3 điều kiện nhiệt độ 22, 28 và 30°C trong giai đoạn cảm ứng tạo mô sẹo cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo cũng như chất lượng mô sẹo. Trong đó nhiệt độ 28°C là thích hợp nhất cho cảm ứng tạo mô sẹo. Nghiên cứu đã xác định được khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của 3 giống Hương cốm, BC15 và J02 trên 4 môi trường khác nhau, trong đó, giống BC15 tái sinh kém trên tất cả các môi trường nghiên cứu. Hai giống J02 và Hương cốm có khả năng tái sinh cao trên môi trường muối N6 + vitamin B5 + 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA + 100 mg/l myo-inositol + 500 mg/l L-proline + 500 mg/l L-glutamin + 300 mg/l casein hydrolysate + 30 g/l sucrose.

Từ khóa: Chuyển gen, lúa, mô sẹo, tái sinh chồi.

Establishing *In Vitro* Regeneration System for Rice

ABSTRACT

The study was carried out to examine callus induction and plant regeneration of seven rice varieties, BM9630, NV1, NV2, NV3, and J02 (*japonica* group) and Huong com and BC15 (*indica* group). Percentage of callus formation of all varieties ranged from 72 to 98%, especially, the callus induction of Huong com, NV1 and J02 was above 90% (97%, 92% and 98%, respectively). The optimum callus induction medium for Huong com variety and other *japonica* varieties was N6 + vitamin B5 + 3 mg/l 2,4-D + 100 mg/l myo-inositol + 500 mg/l L-proline + 500 mg/l L-glutamin + 300 mg/l casein hydrolysate + 30 g/l sucrose. Temperature significantly affected callus formation and its quality; the highest percentage of callus induction was obtained at 28°C. Shoot regeneration from callus of Huong com, BC15, and J02 varieties on four media were obtained, however, BC15 showed poor regeneration capacity on all types of media. High shoot regeneration of J02 and Huong com was obtained on N6 + vitamin B5 + 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA, 100 mg/l myo-inositol, 500 mg/l L-proline, 500 mg/l L-glutamin, 300 mg/l casein hydrolysate, 30 g/l sucrose.

Keywords: Rice, callus induction, shoot regeneration.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đạo ôn lúa do nấm *Magnaporthe grisea* là một trong những bệnh quan trọng, gây thiệt hại lớn về sản lượng lúa toàn cầu. Mỗi năm

bệnh đạo ôn làm thế giới mất một lượng lúa đủ để nuôi sống hơn 60 triệu người (Scardaci, 2003). Với đặc điểm khí hậu nóng ẩm, mưa nhiều, bệnh đạo ôn gây thiệt hại nghiêm trọng ở cả hai miền Nam và Bắc, Việt Nam.

Trong sự hình thành và phát triển bệnh đạo ôn ở lúa, gen *MPG1* đóng vai trò quan trọng, liên quan đến tính gây bệnh được biểu hiện trong suốt quá trình hình thành vôi áp, quá trình phát triển triệu chứng và hình thành bào tử. Do vậy, việc ức chế biểu hiện của gen *MPG1* có thể khiến nấm đạo ôn không gây được bệnh trên lúa. Trên cơ sở đó, Bộ môn CNSH Thực vật - Khoa CNSH - Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã nghiên cứu và thiết kế vector mang miRNA nhân tạo ức chế đặc hiệu sự biểu hiện của gen *MPG1* (Nguyễn Thị Phương Thảo và cs., 2013). Việc chuyển thành công cấu trúc miRNA này vào cây lúa sẽ tạo ra giống lúa có khả năng kháng được nhiều chủng nấm đạo ôn.

Trong quá trình chuyển gen vào cây lúa bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, phôi lúa trưởng thành thường được sử dụng làm vật liệu chuyển gen do đây là vật liệu sẵn có và dễ thao tác hơn so với các loại vật liệu khác (Hoa và cs., 1999; Datta and Datta, 2006; Ozawa, 2008; Rahman et al., 2010; Prasad et al., 2008; Phan Thị Thu Hiền, 2012). Tuy nhiên khả năng cảm ứng mô sẹo từ và tái sinh cây từ callus lúa không cao và bị ảnh hưởng bởi rất nhiều yếu tố như kiểu gen, thành phần môi trường, phương pháp và điều kiện nuôi cấy (Revathi and Pillai, 2011; Verma et al., 2011). Khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh cây của các giống thuộc loài phụ japonica cao hơn so với các giống thuộc loài phụ indica (Ramesh et al., 2009). Nghiên cứu này được tiến hành nhằm chọn được các giống lúa có khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây cao từ vật liệu ban đầu là phôi trưởng thành trong bảy giống lúa khảo sát đang được trồng phổ biến tại Việt Nam nhằm phục vụ chuyển cấu trúc miRNA nhân tạo ức chế đặc hiệu sự biểu hiện của gen *MPG1* giúp kháng nấm đạo ôn do nấm *Magnaporthe grisea* gây ra.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt giống chín, sạch bệnh, có sức nảy mầm tốt của bảy giống lúa trình bày ở bảng 1.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng hạt

Hạt lúa chín, sức nảy mầm tốt, không bị sâu bệnh được bóc bỏ vỏ trấu, không làm tổn thương đến phôi hạt. Sau đó, hạt được ngâm trong cồn 70% trong 1 phút, tiến hành khử trùng bằng NaOCl 5,5% có bổ sung 1-2 giọt Tween 20 trong 30 phút, rồi rửa sạch bằng nước cất vô trùng 4-5 lần. Hạt được thấm khô trên giấy thấm vô trùng và cấy vào môi trường cảm ứng tạo mô sẹo.

2.2.2. Khảo sát cảm ứng hình thành mô sẹo

Các môi trường khảo sát cảm ứng hình thành mô sẹo của các giống lúa được kế thừa và cải biến theo công bố của CIRAD (Trung tâm Hợp tác Quốc tế Nghiên cứu Nông nghiệp phục vụ Phát triển - tổ chức của Pháp); Datta and Datta (2006); Ozawa et al. (2008); Rahman et al. (2010) (Bảng 2).

2.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng cảm ứng tạo mô sẹo và chất lượng mô sẹo

Hạt của bảy giống lúa sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo thích hợp cho từng giống đã được xác định từ thí nghiệm khảo sát môi trường ở nhiệt độ 22°C (điều kiện nhiệt độ buồng nuôi), 28°C và 30°C (sử dụng tủ định ôn).

2.2.4. Khảo sát tái sinh chồi từ mô sẹo

Mô sẹo vàng tươi, khô, kích thước đồng đều của 3 giống J02, Hương cốm, BC15 được chuyển sang môi trường tái sinh nhằm khảo sát khả năng tái sinh cây. Môi trường tái sinh là môi trường cảm ứng tạo mô sẹo thích hợp cho từng giống, có hoặc không bổ sung 2,4-D, bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng và sorbitol theo công bố của CIRAD; Datta and Datta (2006) (Bảng 3).

Môi trường nuôi cấy được bổ sung 30 g/l sucrose, 8,0 g/l agar và điều chỉnh pH = 5,7 trước khi hấp khử trùng ở áp suất 1,1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Điều kiện nuôi cấy cảm ứng tạo mô sẹo: điều kiện tối, 28°C trong 3 tuần. Điều kiện nuôi cấy tái sinh chồi: điều kiện tối,

Bảng 1. Danh sách các giống lúa nghiên cứu

STT	Loài phụ	Tên giống	Nguồn gốc
1	<i>Japonica</i>	BM9630	Trung tâm bảo tồn và phát triển nguồn gen cây trồng - Học viện Nông nghiệp Việt Nam
2		NV1	
3		NV2	
4		NV3	
5		J02	
6	<i>Indica</i>	Hương cốm (HC)	Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng - Học viện Nông nghiệp Việt Nam
7		BC15	Công ty giống cây trồng Thái Bình

Bảng 2. Thành phần môi trường khảo sát khả năng cảm ứng tạo mô sẹo

Môi trường	Thành phần môi trường	Tài liệu tham khảo
M1	MS (Murashige and Skoog, 1962) + 2 mg/l 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) + 300 mg/l casamino acid	Datta and Datta (2006) cải biến
M2	MS + 3 mg/l 2,4-D + 300 mg/l casamino acid	Datta and Datta (2006) cải biến
M3	Muối MS + vitamin B5 (Gamborg et al., 1968) + 1 mg/l 2,4-D + 10 mg/l α -NAA (α -Naphthyl Acetic Acid)	Rahman et al. (2010) cải biến
N1	Muối N6 (Chu et al., 1975) + vitamin B5 + 2,5 mg/l 2,4-D + 100 mg/l myo-inositol + 500 mg/l L-proline + 500 mg/l L-glutamin + 300 mg/l casein hydrolysate	CIRAD cải biến
N2	Muối N6 + vitamin B5 + 3 mg/l 2,4-D + 10 mg/l myo-inositol + 500 mg/l L-proline + 500 mg/l L-glutamin + 300 mg/l casein hydrolysate	CIRAD cải biến
N3	N6 + 2 mg/l 2,4-D + 100 mg/l L-proline + 300 mg/l casein hydrolysate	Ozawa (2008)

Bảng 3. Thành phần môi trường khảo sát khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo

Môi trường	Thành phần môi trường	Tài liệu tham khảo
RN1	N2 (-2,4-D) + 3 mg/l BAP (6-Benzylaminopurine) + 1 mg/l α -NAA	CIRAD cải biến
RN2	N2 + 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA	CIRAD cải biến
RN3	N2 (-2,4-D) + 2 mg/l kinetin + 1 mg/l α -NAA + 10 g/l sorbitol	Datta and Datta (2006)
RN4	N2 + 2 mg/l kinetin + 1 mg/l α -NAA + 10 g/l sorbitol	Datta and Datta (2006)
RM1	M2 (-2,4-D) + 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA	CIRAD cải biến
RM2	M2 + 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA	CIRAD cải biến
RM3	M2 (-2,4-D) + 2 mg/l kinetin + 1 mg/l α -NAA + 10 g/l sorbitol	Datta and Datta (2006)
RM4	M2 + 2 mg/l kinetin + 1 mg/l α -NAA + 10 g/l sorbitol	Datta and Datta (2006)

Ghi chú: Thành phần môi trường N2, M2 được trình bày ở bảng 2
-2,4-D: Không chứa 2,4 D trong môi trường

28°C trong 10 ngày trong tủ định ôn, sau đó chuyển sang buồng nuôi có chế độ chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối và nhiệt độ trong khoảng 24-25°C. Tỷ lệ hạt cảm ứng tạo mô sẹo, tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi, số chồi/cụm mô sẹo được ghi nhận sau 3-6 tuần nuôi cấy.

2.2.5. Xác định ảnh hưởng của kháng sinh đến sự sinh trưởng của mô sẹo phục vụ chuyển gen

Mô sẹo của 2 giống Hương cốm và J02 được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng mô sẹo có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin ở các nồng

độ khác nhau. Tỷ lệ mô sẹo sống được ghi nhận sau 3 tuần nuôi cấy.

2.2.6. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí 100 mẫu đối với thí nghiệm khảo sát khả năng cảm ứng tạo mô sẹo, 50 mẫu đối với thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng cảm ứng tạo mô sẹo, 30 mẫu đối với thí nghiệm tái sinh chồi từ mô sẹo và 100 mẫu đối với thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của kháng sinh đến sinh trưởng của mô sẹo.

Số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Excel và IRRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng cảm ứng tạo mô sẹo

Tỷ lệ hạt cảm ứng tạo mô sẹo có sự khác biệt lớn giữa các môi trường và giữa các giống. Giống J02 có tỷ lệ hạt cảm ứng tạo mô sẹo đạt cao nhất (trung bình 82,67%), theo sau là giống NV1 (75,83%), NV2 (69,83%), Hương cốm (68,67%). Ba giống có tỷ lệ hạt cảm ứng tạo mô sẹo thấp là BC15 (53,00%), BM9630 (53,50%) và NV3 (56,17%). Môi trường M3 cho tỷ lệ hạt tạo mô sẹo thấp nhất ở cả bảy giống. Tuy nhiên, môi trường cho tỷ lệ hạt tạo mô sẹo đạt cao nhất ở các giống khác nhau là khác nhau. Trong khi tỷ lệ hạt cảm ứng tạo mô sẹo của giống BM9630 (69,0%), J02 (98,0%), NV1 (92%), NV3 (75%) và

Hương cốm (97%) đạt cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường N2, giống NV2 (83%) và BC15 (72%) có tỷ lệ hạt tạo mô sẹo cao nhất trên môi trường M2 (Bảng 4).

Mức độ phản ứng hình thành mô sẹo của từng giống trên các môi trường cũng có sự khác nhau rất rõ rệt. Trong khi tỷ lệ hạt cảm ứng tạo mô sẹo của giống J02 trên bảy môi trường không có sự sai khác nhiều, dao động từ 60-98%, các giống còn lại có tỷ lệ hạt tạo mô sẹo trên các môi trường khác nhau rất khác nhau, đặc biệt là giống Hương cốm với tỷ lệ hạt tạo mô sẹo dao động từ 28-97% (Bảng 4).

Như vậy, có thể thấy cả bảy giống lúa trong nghiên cứu này đều có khả năng tạo mô sẹo tốt (đạt tỷ lệ tạo mô sẹo > 50%). Khả năng tạo mô sẹo của các giống bị ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường và bản chất di truyền, do vậy các giống lúa khác nhau có môi trường tối ưu để cảm ứng tạo mô sẹo khác nhau. Kết luận này cũng trùng với kết quả nghiên cứu của Phan Thị Thu Hiền, 2012; Rahman et al. (2010). Theo Phan Thị Thu Hiền (2012), có sự khác biệt rất lớn về tỷ lệ tạo mô sẹo của 31 giống lúa nương miền Bắc trên 3 môi trường khảo sát, dao động từ 28,3-85%. Rahman et al. (2010) đã công bố kết quả tỷ lệ hình thành mô sẹo của giống MR232 thuộc loài phụ *indica* trên môi trường M3 lên tới 91-97%. Tuy nhiên, 2 giống *indica* trong nghiên cứu này chỉ có tỷ lệ hình thành mô sẹo đạt 15-28% trên môi trường M3.

Bảng 4. Tỷ lệ hạt tạo mô sẹo của bảy giống lúa nghiên cứu sau 3 tuần nuôi cấy

Giống	Tỷ lệ hạt tạo mô sẹo (%)						Trung bình (%)
	M1	M2	M3	N1	N2	N3	
BM9630	55,0	62,0	30,0	48,0	69,0	57,0	53,50
J02	80,0	95,0	60,0	82,0	98,0	81,0	82,67
NV1	73,0	91,0	47,0	78,0	92,0	74,0	75,83
NV2	72,0	83,0	39,0	73,0	82,0	70,0	69,83
NV3	58,0	63,0	31,0	50,0	75,0	60,0	56,17
Hương cốm	65,0	91,0	28,0	69,0	97,0	62,0	68,67
BC15	52,0	72,0	15,0	61,0	68,0	50,0	53,00

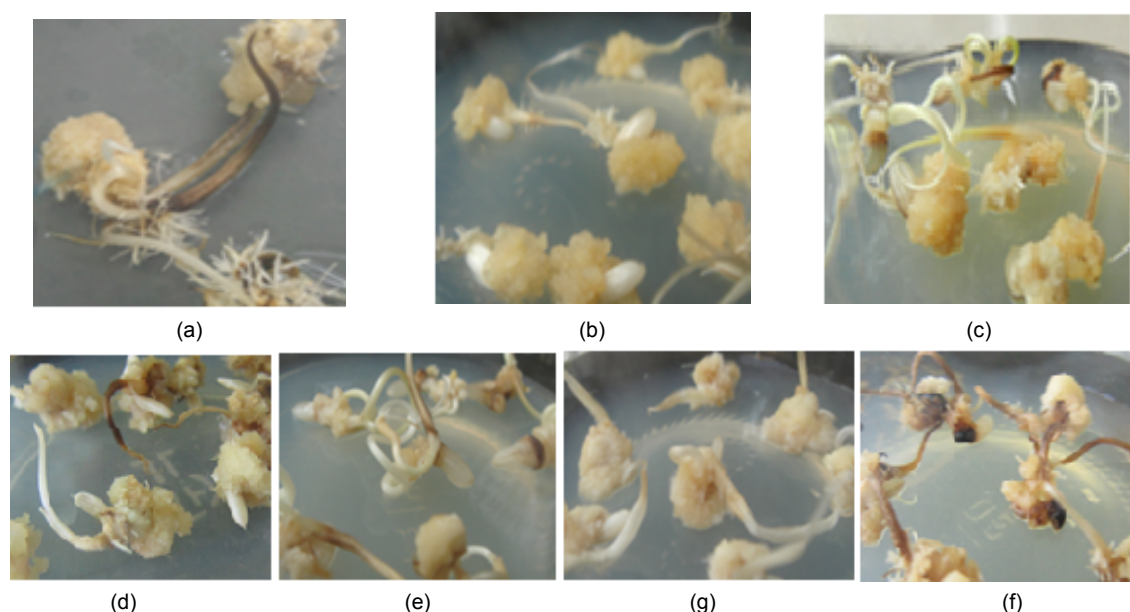
Ghi chú: M1 = MS + 2 mg/l 2,4-D + 300 mg/l casamino acid; M2 = MS + 3 mg/l 2,4-D + 300 mg/l casamino acid; M3 = Muối MS + vitamin B5 + 1 mg/l 2,4-D + 10 mg/l α-NAA; N1 = Muối N6 + vitamin B5 + 2,5 mg/l 2,4-D + 100 mg/l myo-inositol + 500 mg/l L-proline + 500 mg/l L-glutamin + 300 mg/l casein hydrolysate; N2 = Muối N6 + vitamin B5 + 3 mg/l 2,4-D + 10 mg/l myo-inositol + 500 mg/l L-proline + 500 mg/l L-glutamin + 300 mg/l casein hydrolysate; N3 = N6 + 2 mg/l 2,4-D + 100 mg/l L-proline + 300 mg/l casein hydrolysate.

Quan sát hình thái mô sẹo cho thấy, mô sẹo của các giống thuộc loài phụ *japonica* và Hương cốm không khác nhau nhiều, tuy nhiên mô sẹo của giống BC15 lại khác biệt so với giống Hương cốm thuộc cùng loài phụ *indica* và các giống thuộc loài phụ *japonica*. Mô sẹo của các giống *japonica* và Hương cốm thường tròn, xốp, có màu vàng hoặc trắng. Mô sẹo của giống BC15 thường không tròn, rắn, màu vàng nhạt và có vết thâm đen (Hình 1). Trong quá trình quan sát cho thấy, đến tuần thứ 4 trở đi mô sẹo của giống BC15 bị đen dần, đến tuần thứ 7 toàn bộ khối mô sẹo bị thâm đen, không có khả năng hình thành mô sẹo thứ cấp. Tuy nhiên, giống Hương cốm có khả năng hình thành mô sẹo thứ cấp sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường N2. Nhìn chung, các giống thuộc loài phụ *japonica* có khả năng phát sinh mô sẹo thứ cấp trong đó,

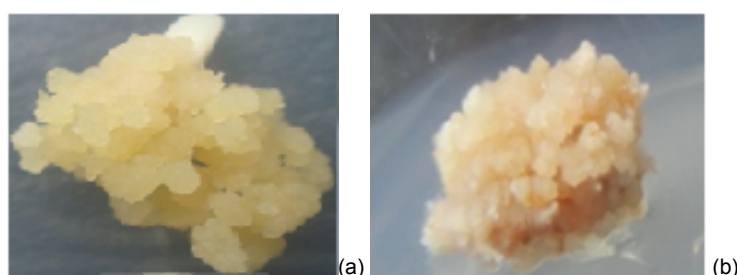
giống J02 có khả năng phát sinh mô sẹo thứ cấp tốt nhất. Hầu hết mô sẹo sơ cấp của J02 đều có khả năng phát sinh mô sẹo thứ cấp to, màu vàng tươi, khô, tròn, kích thước đồng đều hơn mô sẹo thứ cấp của Hương cốm (Hình 2).

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tạo mô sẹo và chất lượng mô sẹo

Tỷ lệ hạt tạo mô sẹo của các giống lúa khi nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C đạt cao hơn so với khi nuôi cấy ở nhiệt độ 22°C và 30°C với mức sai khác có ý nghĩa thống kê ($p = 0,05$). Tỷ lệ hạt tạo mô sẹo của bảy giống ở nhiệt độ 28°C dao động từ 68% (giống BM9630) đến 98,7% (giống J02). Khi nuôi cấy ở nhiệt độ cao hơn (30°C) hoặc thấp hơn (22°C), tỷ lệ hạt tạo mô sẹo giảm đáng kể, đặc biệt là nuôi cấy ở nhiệt độ thấp, dao động từ 20,7% (giống BC15) đến 86,0%



Hình 1. Mô sẹo sơ cấp 3 tuần tuổi của giống BM9630 (a), J02 (b), NV1 (c), NV2 (d), NV3 (e), Hương cốm (f) trên môi trường N2. Mô sẹo sơ cấp 3 tuần tuổi của giống BC15 (g) trên môi trường M2



Hình 2. Mô sẹo thứ cấp 6 tuần tuổi của giống J02 (a) và giống Hương cốm (b) trên môi trường N2

(giống J02). Các mô sẹo tạo ra khi nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C có màu vàng tươi, khô và kích thước đồng đều. Trong khi đó, các mô sẹo cảm ứng ở nhiệt độ 22°C và 30°C thường có màu trắng đục hoặc vàng nhạt, ướt và kích thước không đồng đều (Bảng 5). Qua quá trình thử nghiệm, mô sẹo có màu vàng tươi, khô, có khả năng tái sinh thành cây cao hơn so với mô sẹo trắng, vàng, ướt. Do vậy, điều kiện nhiệt độ nuôi cấy 28°C là thích hợp để tạo mô sẹo cho các giống lúa nghiên cứu.

Theo kết quả nghiên cứu của Jaruwan et al. (2008), tỷ lệ hình thành mô sẹo của giống lúa KMDL 105 không sai khác nhiều khi nuôi cấy ở nhiệt độ 25±2°C và 30±2°C. Tuy nhiên hình thái mô sẹo khi nuôi cấy ở 2 khoảng nhiệt độ này có sự khác biệt đáng kể. Mô sẹo nuôi cấy ở nhiệt độ 25±2°C thường có màu vàng, khô và rắn trong khi mô sẹo nuôi cấy ở nhiệt độ 30±2°C màu kem, ướt và mềm.

3.3. Tái sinh cây từ mô sẹo

Dựa trên hình thái mô sẹo, mô sẹo của ba giống J02, Hương cốm và BC15 được lựa chọn để đánh giá khả năng tái sinh cây làm tiền đề cho quá trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Môi trường tái sinh sử dụng môi trường cơ bản, là môi trường tạo mô sẹo thích hợp cho từng giống bổ sung thêm chất điều tiết sinh trưởng BAP hoặc kinetin, α -

NAA, sorbitol. Kết quả bảng 6 cho thấy, khả năng tái sinh cây của mô sẹo giống J02, Hương cốm và BC15 rất cao với 100% cụm mô sẹo tạo cây trên môi trường RN1, RN2, RN3 và RN4 đối với giống J02, Hương cốm và trên môi trường RM1, RM2, RM3 và RM4 với giống BC15. Số cây/cụm mô sẹo của cả 3 giống trên môi trường không bổ sung 2,4-D (RN1, RN3, RM1 và RM3) cao hơn so với môi trường chứa 2,4-D (RN2, RN4, RM2 và RM4). Môi trường tái sinh bổ sung 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA (RN1, RN2, RM1, RM2) là môi trường tái sinh tốt hơn môi trường bổ sung 2 mg/l kinetin, 1 mg/l α -NAA và 10 g/l sorbitol (RN3, RN4, RM4, RM4).

Đối với giống lúa J02 và Hương cốm, môi trường tái sinh RN1 sử dụng nền môi trường tạo mô sẹo N2 (-2,4-D) bổ sung 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA cho kết quả số cây tái sinh cao nhất, tương ứng 16,33 và 13,67 cây/cụm mô sẹo. Trên môi trường tái sinh RN2 có chứa 2,4-D, số cây tái sinh thu được ít hơn so với môi trường RN1. Môi trường tái sinh RN3 và RN4 cùng bổ sung 2 mg/l kinetin, 1 mg/l α -NAA và 10 g/l sorbitol cho kết quả số cây tái sinh/cụm mô sẹo thấp hơn so với môi trường tái sinh RN1 và RN2. Mô sẹo tái sinh cây chậm trên môi trường RN3 và RN4, số cây tái sinh/cụm mô sẹo thu được tương ứng là 11,67% và 5,33% với giống J02, 4,33% và 2,67% với giống Hương cốm (Bảng 6). Quan sát hình thái cho thấy, ở giai đoạn đầu tái sinh (bao

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến tỷ lệ hạt tạo mô sẹo và hình thái mô sẹo sau 3 tuần nuôi cấy

Giống	Tỷ lệ hạt tạo mô sẹo (%)			Hình thái mô sẹo		
	22°C	28°C	30°C	22°C	28°C	30°C
BM9630	27,3 ^a	68,0 ^b	57,3 ^c	+	++	+
J02	86,0 ^a	98,7 ^b	88,7 ^c	+++	+++	+++
NV1	57,3 ^a	91,3 ^b	69,3 ^c	++	+++	+++
NV2	53,3 ^a	81,3 ^b	71,3 ^c	++	+++	+++
NV3	44,7 ^a	74,7 ^b	63,3 ^c	++	+++	++
Hương cốm	40,7 ^a	94,7 ^b	82,0 ^c	+	+++	++
BC15	20,7 ^a	71,3 ^b	64,7 ^c	+	++	+

Ghi chú: Các chữ cái trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,05$) giữa các giá trị trung bình
 +: Mô sẹo màu trắng đục, ướt, kích thước không đều; ++: Mô sẹo vàng nhạt, khô, kích thước không đều; +++: Mô sẹo vàng tươi, khô, kích thước đồng đều.

Bảng 6. Khả năng tái sinh cây của mô sẹo sau 6 tuần nuôi cấy

Môi trường	Tỷ lệ cụm mô sẹo tái sinh cây (%)			Số cây/cụm mô sẹo (cây)		
	J02	HC	BC15	J02	HC	BC15
RN1	100	100	-	16,33	13,67	-
RN2	100	100	-	9,00	5,67	-
RN3	100	100	-	11,67	4,33	-
RN4	100	100	-	5,33	2,67	-
RM1	-	-	100	-	-	1,33
RM2	-	-	100	-	-	0,20
RM3	-	-	100	-	-	0,16
RM4	-	-	100	-	-	0,10

Ghi chú: RN1 = N2 (-2,4-D) + 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA; RN2 = N2 + 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA; RN3 = N2 (-2,4-D) + 2 mg/l kinetin + 1 mg/l α -NAA + 10 g/l sorbitol; RN4 = N2 + 2 mg/l kinetin + 1 mg/l α -NAA + 10 g/l sorbitol; RM1 = M2 (-2,4-D) + 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA; RM2 = M2 + 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA; RM3 = M2 (-2,4-D) + 2 mg/l kinetin + 1 mg/l α -NAA + 10 g/l sorbitol; RM4 = M2 + 2 mg/l kinetin + 1 mg/l α -NAA + 10 g/l sorbitol; N2 = Muối N6 + vitamin B5 + 3 mg/l 2,4-D + 10 mg/l myo-inositol + 500 mg/l L-proline + 500 mg/l L-glutamin + 300 mg/l casein hydrolysate; M2 = MS + 3 mg/l 2,4-D + 300 mg/l casamino acid; -2,4-D: Không chứa 2,4 D trong môi trường.

gồm giai đoạn 10 ngày trong tối và khoảng 5 ngày đầu ở điều kiện sáng), sinh khối mô sẹo trên môi trường tái sinh có 2,4-D tăng nhanh hơn trên môi trường tái sinh không có 2,4-D; mô sẹo trên môi trường tái sinh không có 2,4-D lục hóa sau 5 ngày ở điều kiện sáng và bắt đầu hình thành chồi. Trong khi đó, sau 10 ngày ở điều kiện sáng, mô sẹo trên môi trường tái sinh có 2,4-D mới bắt đầu lục hóa (Hình 3). Như vậy, môi trường tái sinh RN1 không chứa 2,4-D cho kết quả số cây tái sinh/cụm mô sẹo cao hơn môi trường tái sinh RN2 có chứa 2,4-D và các môi trường còn lại; đồng thời sự phân hóa chồi của cả 2 giống J02 và Hương cốm trên môi trường RN1 sớm hơn RN2. Trong trường hợp giống BC15, số cây/cụm mô sẹo đạt được cao nhất (1,33 chồi) khi nuôi cấy mô sẹo trên môi trường RM1 sử dụng nền môi trường tạo mô sẹo M2 (- 2,4-D) bổ sung 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA. Trên môi trường RM2, RM3 và RM4, số cây tái sinh/cụm mô sẹo đạt được rất thấp, dao động từ 0,1-0,2 cây/cụm mô sẹo. Khả năng tái sinh kém của giống BC15 có thể do nguyên nhân mô sẹo rần, không có hình dạng nhất định và bị thâm đen nhiều nên sau một thời gian chuyển mô sẹo sang môi trường tái sinh, mô sẹo thường có màu vàng đậm và dần hóa nâu, chỉ có những mô sẹo có dạng tròn hoặc gần tròn, khô, màu vàng tươi mới có khả năng tái sinh cây. Do vậy, cần thiết phải tiến hành khảo

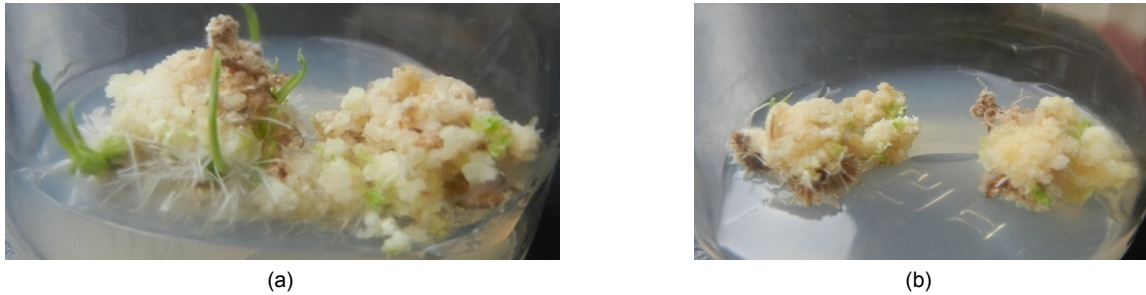
sát thêm các môi trường khác để tìm ra môi trường tái sinh cây từ mô sẹo giống BC15 cho số cây tái sinh/cụm mô sẹo đạt cao hơn.

Nhìn chung, mô sẹo của ba giống J02, Hương cốm và BC15 trên môi trường tái sinh không chứa 2,4-D cảm ứng phát sinh chồi nhanh hơn và số chồi tái sinh/cụm mô sẹo cao hơn so với môi trường tái sinh chứa 2,4-D. Tuy nhiên, môi trường thích hợp nhất để tái sinh cây từ mô sẹo lúa là rất khác nhau giữa các giống. Trong khi cần thiết phải bổ sung 2,4 D vào môi trường tái sinh các giống lúa Kalijira, Chinigura (Mannan et al., 2013), BR29, IR64 (Datta and Datta, 2006), các giống Pakhi Biroin, Hati Bromashi, Kacha Biorin (Hoque et al., 2013), MR81 (Rahman, 2010) lại tái sinh tốt trên môi trường không chứa 2,4D.

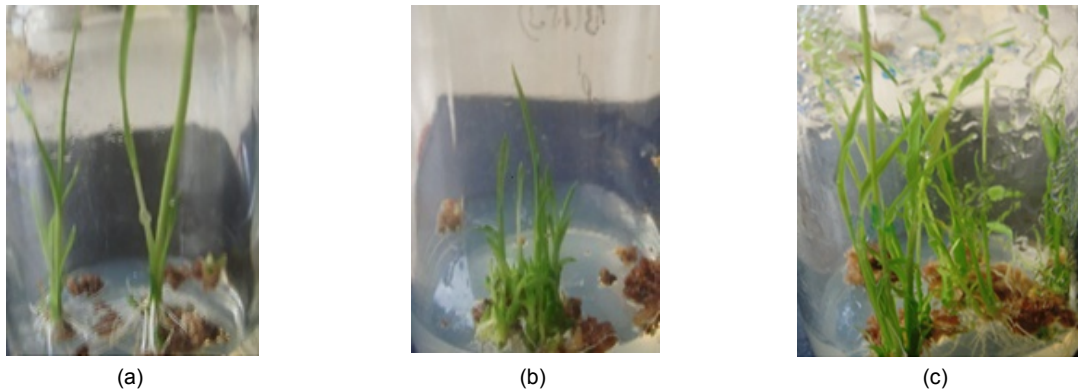
Như vậy, nghiên cứu đã chỉ ra được môi trường tái sinh cây thích hợp từ mô sẹo đối với giống J02 và Hương cốm là môi trường RN1. Đối với giống BC15, đã xác định được môi trường tái sinh chồi là môi trường RM1, tuy nhiên, hệ số tái sinh chồi chưa cao, chỉ đạt 1,33 chồi/cụm.

3.4. Ảnh hưởng của kanamycin đến sự sinh trưởng của mô sẹo

Thí nghiệm được tiến hành với mục đích đánh giá ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh



Hình 3. Mô sẹo giống J02 (a) và giống Hương cốm (b) trên môi trường RN1 sau 3 tuần nuôi cấy



Hình 4. Cây tái sinh từ mô sẹo giống BC15 trên môi trường RM1 (a), giống Hương cốm (b) và giống J02 (c) trên môi trường RN1 sau 6 tuần nuôi cấy

Bảng 7. Ảnh hưởng của kanamycin đến tỷ lệ sống của mô sẹo sau 3 tuần nuôi cấy

Nồng độ kháng sinh (mg/l)	Số lượng mô sẹo thí nghiệm	Tỷ lệ mô sẹo sống (%)	
		J02	Hương cốm
0	100	100	100
30	100	89	76
50	100	65	59
70	100	35	28
90	100	18	12

kanamycin đến sự sinh trưởng của mô sẹo để lựa chọn nồng độ kháng sinh phù hợp (vừa chọn được cây chuyển gen, vừa không làm giảm khả năng tái sinh của mẫu) nhằm chọn lọc mô sẹo cho chuyển gen sau này nếu sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* chứa vector mang gen kháng kanamycin.

Kết quả bảng 7 cho thấy, bổ sung kanamycin vào môi trường nuôi cấy đã làm giảm tỷ lệ sống của mô sẹo. Khi bổ sung kanamycin ở nồng độ 30 mg/l, 89% mô sẹo giống

J02 và 76% mô sẹo giống Hương cốm sống. Tỷ lệ mô sẹo sống giảm dần khi tăng dần nồng độ kanamycin trong môi trường nuôi cấy. Đặc biệt, chỉ 18% mô sẹo giống J02 và 12% mô sẹo giống Hương cốm sống khi 90 mg/l kanamycin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Do khả năng tái sinh cây từ mô sẹo của các giống nghiên cứu thấp, bên cạnh đó, nồng độ kháng sinh cao cũng ảnh hưởng rõ rệt đến sự sống và khả năng tái sinh của mô sẹo, vì vậy, nên dùng kanamycin ở nồng độ 70 mg/l để chọn lọc mô sẹo của giống J02 và Hương cốm trong quá trình chuyển gen.

4. KẾT LUẬN

- Bảy giống lúa khảo sát gồm BM9630, NV1, NV2, NV3, J02 (thuộc nhóm *japonica*), Hương cốm và BC15 (thuộc nhóm *indica*) đều có khả năng cảm ứng tạo mô sẹo tốt (đạt > 50%).

- Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp để cảm ứng tạo mô sẹo là 28°C.

- Môi trường tạo mô sẹo thích hợp cho giống BM9630 (69,0%), J02 (98,0%), NV1 (92%), NV3 (75%) và Hương cốm (97%) là môi trường muối N6 + vitamin B5 + 3 mg/l 2,4-D + 100 mg/l myo-inositol + 500 mg/l L-proline + 500 mg/l L-glutamin + 300 mg/l casein hydrolysate + 30 g/l sucrose; môi trường tạo mô sẹo thích hợp cho giống NV2 (83%) và BC15 (72%) là môi trường MS + 3 mg/l 2,4-D + 300 mg/l casamino acid + 30 g/l sucrose.

- 100% mô sẹo của ba giống lúa J02, BC15 và Hương cốm tái sinh cây trên bốn môi trường khảo sát. Số cây tái sinh/cụm chồi của giống J02 (16,33 cây); Hương cốm (13,67 cây) và BC15 (1,33 cây) đạt cao nhất trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo thích hợp cho từng giống, không chứa 2,4-D, bổ sung 3 mg/l BAP + 1 mg/l α -NAA.

- Nồng độ kháng sinh kanamycin thích hợp để chọn lọc mô sẹo phục vụ chuyển gen sử dụng các vector mang gen chọn lọc kháng kanamycin là 70 mg/l.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp trường trọng điểm “Thiết kế vector RNAi phục vụ tạo giống lúa chuyển gen kháng bệnh đạo ôn”, mã số: T2011-12-8TĐ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bartels D. and Ramanjulu S. (2005). Drought and salt tolerance in plant. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 23-58.

Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S., Msu C., Yin K.C., Chu C.Y. and Bi F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther cultures of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Science China Mathematics*, 18(5): 659-668.

Datta K. and Datta S.K. (2006). *Indica rice (Oryza sativa, BR29 and IR64). Agrobacterium protocols, methods in biology*, 343: 201-212.

Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.

Hoa T.T.C., Bahagiawati A. and Hodges T.K. (1999). *Agrobacterium* - mediated transformation of *Indica* rice cultivars grown in Vietnam. *Omonrice*, 7: 70-79.

Hoque K.M.A., Azdi Z.A. and Shamsul H.P. (2013). Development of callus initiation and regeneration system of different indigenous indica rice varieties. *Journal of Biology* 1(2): 46-51.

Jaruwan S., Sanha P., Preecha P. and Pornthap T. (2008). Callus induction and influence of culture condition and culture medium on growth of Thai Aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, cell culture. *World Applied Sciences Journal* 5(2): 246-251.

Mannan M.A., Sarker T.C., Akhter M.T., Kabir A.H. and Alam M.F. (2013). Indirect plant regeneration in aromatic rice (*Oryza sativa* L.) var. “*Kalijira*” and “*Chinigura*”. *Acta agriculturae Slovenica* 101 (2): 231-238.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.

Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Trùng Hiếu, Phan Thị Hương, Nguyễn Thị Thùy Linh (2013). Thiết kế vector mang miRNA nhân tạo ức chế đặc hiệu sự biểu hiện của gen MPG1 ở nấm đạo ôn (*Magnaporthe grisea*) gây bệnh trên lúa. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11(6): 857- 867.

Ozawa K. (2009). Establishment of a high efficiency *Agrobacterium* - mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 176: 522-527.

Phan Thị Thu Hiền (2012). Khả năng tạo callus và tái sinh cây của tập đoàn 31 giống lúa nương miền Bắc Việt Nam phục vụ công tác chuyển gen. *Tạp chí khoa học và Phát triển*, 10(4): 567-575.

Prasad B.D., Jha S. and Chattoo B.B. (2008). Transgenic indica rice expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial protein (*Mj-AMP2*) shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Science* 175: 364-371.

Rahman Z.A. (2010). Production of transgenic Indica rice (*Oryza sativa* L.) Cv. *MR 81* via particle bombardment system. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 22(5): 353-366.

Ramesh M., Murugiah V. And Gupta A. K. (2009). Efficient in vitro plant regeneration via leaf base segments of india rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Experimental Biology*: 47: 68.

Revathi S. and Pillai M. A. (2011). In vitro callus induction in rice (*Oryza sativa* L.). *Research in Plant Biology* 1(5): 13-15.

Scardaci S.C., Webster R.K., Greer C.A., Hill J.E., Williams J.F., Mutters R.G., Brandon D.M., McKenzie K.S. and Oster J.J. (2003). Rice blast: A new diseases in California. *Agronomy Fact Sheet Series*.

Verma D., Joshi R., Shukla A. And Kumar P. (2011). Protocol for in vitro somatic embryogenesis and regeneration of rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Experimental Biology*, 49: 958-963.