

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.156

HOÀN THIỆN QUY TRÌNH TÁI SINH *in vitro* CHO GIỐNG LÚA NÀNG THƠM CHỢ ĐÀO

Nguyễn Văn Mạnh¹, Đỗ Tiến Phát², Trần In Đô¹ và Huỳnh Kỳ^{3*}

¹Học viên cao học, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Công nghệ Sinh học Việt Nam, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Bộ môn Di truyền và Chọn giống Cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Kỳ (email: hky@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/03/2021

Ngày nhận bài sửa: 19/05/2021

Ngày duyệt đăng: 29/10/2021

Title:

The effectiveness method for regeneration in rice tissue culture of Nang Thom Cho Dao variety

Từ khóa:

Mô sẹo, Nàng Thơm Chợ Đào, phôi vô tính, tái sinh

Keywords:

Callus, Nang Thom Cho Dao, regeneration, somatic embryogenesis

ABSTRACT

In plant breeding, transgenic is one of the most effective approaches because of the introduction of the target gene directly into the varieties. This approach needs to be through a complete tissue culture system. One of the most problems of tissue culture in indica rice varieties is the conversion of callus into somatic embryogenesis and regeneration at very low rate. Therefore, this study is aimed to develop indica rice tissue culture with highly somatic embryogenesis rate and the effectiveness of the regeneration process for Nang Thom Cho Dao as well as rice varieties in the Mekong Delta. The result showed that N6D (N6+2,4D) medium was suitable for callus induction (95-97%), while MS+NAA+kinetin and MS+B medium were used to induce 31.01% of somatic embryogenesis and regeneration, respectively. The results showed that the regeneration rate is still low, about 30.71% of the total induced callus. This result may be applicable for indica rice transgenic approach in the future.

TÓM TẮT

Trong công tác chọn tạo giống cây trồng, chuyển gene là một trong những cách tiếp cận hiệu quả nhất vì đưa trực tiếp gene mục tiêu vào giống cây nghiên cứu. Cách tiếp cận này cần phải thông qua hệ thống nuôi cấy mô hoàn thiện. Một trong những trở ngại lớn nhất của nuôi cấy mô ở các giống lúa thuộc nhóm indica là quá trình chuyển hóa các mô sẹo thành phôi vô tính và có tỷ lệ tái sinh rất thấp. Chính vì vậy, nghiên cứu được tiến hành nhằm xây dựng và đánh giá hiệu quả quy trình tái sinh cho giống lúa Nàng Thơm Chợ Đào (NTCD) cũng như mở rộng ứng dụng cho các giống lúa khác ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Trong nghiên cứu này, khả năng tạo mô sẹo trên môi trường N6D (N6+2,4D) với giống NTCD đạt hiệu quả từ 95 tới 97%. Môi trường phù hợp với giai đoạn phát sinh phôi soma và tái sinh chồi lần lượt là MS+NAA+kinetin và MS+B, với tỷ lệ tạo chồi đạt 31,01%. Tỷ lệ tạo cây hoàn chỉnh đạt 30,71%, cây tái sinh được chuyển thành công ra trồng và chăm sóc trong điều kiện vườn ươm. Kết quả này là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm hoàn thiện quy trình tái sinh và ứng dụng trong việc chuyển gene vào giống lúa NTCD.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản lượng lương thực cung cấp luôn có nhu cầu rất cao do tốc độ tăng dân số và đô thị hóa nhanh, chính vì vậy áp lực chọn tạo giống lúa cung cấp đủ sản lượng và dinh dưỡng cũng như tăng cường khả năng chống chịu stress sinh học và phi sinh học là cấp thiết. Với những nhu cầu trên, phương pháp nuôi cấy mô cùng với chuyển gene là cách tiếp cận tốt nhất bằng cách đưa gene mục tiêu vào giống muốn cải thiện thông qua nhiều phương cách khác nhau. Theo ước tính có khoảng 80% giống lúa hiện đang được canh tác trên thế giới thuộc loài phụ indica. Vì vậy, việc chuyển các gene mang đặc tính nông học mong muốn vào giống lúa này là một trong những chiến lược cần được quan tâm (Tara et al., 2017). Tuy nhiên, các giống lúa thuộc nhóm indica thường có hiệu quả tái sinh thấp (Chu & Croughan, 1990; Thao et al., 2021; Zuraida et al., 2010), điều này đã gây trở ngại cho việc ứng dụng phương pháp chuyển gene trong cải tạo các giống lúa indica quan tâm. Vì vậy, việc xây dựng quy trình nuôi cấy mô phù hợp, hiệu quả cho các giống lúa thuộc nhóm indica là rất cần thiết.

Trong quá trình nuôi cấy mô, việc kích thích chuyên hóa từ mô sẹo thành phôi vô tính (somatic embryogenesis) là một trong những bước quan trọng quyết định đến sự thành công của quy trình nuôi cấy mô. Ở cây lúa, giai đoạn chuyển từ mô sẹo sang phôi vô tính được thực hiện ở nhiều loại nguyên liệu khác nhau như từ phôi hạt chín (Wani et al., 2011), phôi non hay mô lá (Hiei & Komari, 2008; Ramesh et al., 2009), rễ (Abe & Futsuhara, 1985; Hoque & Mansfield, 2004), cụm hoa lúa (Ling et al., 1983)... Kể từ năm 1995, kỹ thuật nuôi cấy mô phát triển mạnh mẽ trên nhiều loài cây khác nhau, cụ thể đã có hơn 200 loài cây trồng được nghiên cứu và đã được công bố về quy trình chuyển hóa thành công phôi vô tính (Raemarkers et al., 1995) và tiếp tục phát triển cho những năm gần đây. Hầu hết các quy trình chuyển hóa phôi vô tính thường không trực tiếp từ mô mà phải qua giai đoạn từ mô sẹo. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ chuyển hóa thành công phôi vô tính trực tiếp từ 25 quy trình nuôi cấy mô giống lúa indica chỉ thành công 30%, trong khi chuyển hóa không trực tiếp chỉ thành công có 8% (Tara et al., 2017).

Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển từ tế bào phôi thành phôi vô tính trong đó bao gồm cả thành phần và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng, loại và giai đoạn của mô làm vật liệu nuôi cấy, môi

trường nuôi cấy, kiểu gene và than hoạt tính hay các hợp chất sinh hóa ảnh hưởng lên quá trình hình thành phôi vô tính và dẫn đến tiến trình tái sinh cây (Deo et al., 2010). Trong nghiên cứu này, quy trình cho việc tạo phôi vô tính và tái sinh tạo cây hoàn chỉnh ở giống lúa Nàng Thom Chợ Đào thuộc nhóm indica được xây dựng, kết quả này là cơ sở cho các nghiên cứu chuyển gene vào giống lúa này trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa Nàng Thom Chợ Đào có nguồn gốc từ xã Mỹ Lệ, huyện Cần Đước, tỉnh Long An. Gân đây được cán bộ Khoa Nông nghiệp thu thập và hiện đang tồn trữ ở Ngân hàng giống Khoa Nông nghiệp - Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xây dựng quy trình tái sinh

Các bước của quy trình tái sinh được thực hiện dựa trên công bố của Nishimura et al. (2006) với thành phần môi trường (Bảng 1) và các bước tóm tắt như sau:

Khử trùng và gieo hạt: Hạt lúa được bóc vỏ trấu và được khử trùng bằng ethanol (C_2H_5OH) 70% trong 1 phút, sau đó lãc 45 phút trong sodium hypochlorite ($NaClO$) 60% có thêm 1 - 2 giọt Tween 20. Rửa lại bằng nước thanh trùng khoảng 5 - 6 lần. Thâm khô hạt gạo và gieo trên môi trường tạo mô sẹo (N6D) trong điều kiện tối.

Nhân mô sẹo: Sau 2 tuần trên môi trường, N6D trong điều kiện tối và nhiệt độ từ 25 - 28 °C, mô sẹo phát sinh từ phôi sẽ tách ra và cấy chuyển sang môi trường N6D.

Cầm ứng tạo phôi soma: Mô sẹo trên môi trường N6D được chuyển sang môi trường MSNK và nuôi trong điều kiện tối ở 28°C trong 15 - 20 ngày.

Giai đoạn tái sinh: Sau 15 - 20 ngày trên môi trường MSNK, những mô sẹo rắn chắc được lựa chọn và cấy sang môi trường tái sinh (MS+B) và nuôi cấy trong phòng nuôi với thời gian chiếu sáng 12 giờ sáng/12 giờ tối, nhiệt độ phòng 26 - 28°C.

Tạo rễ và cây hoàn chỉnh: Sau 2 - 3 tuần trên môi trường tái sinh, chồi mới phát triển đạt khoảng 2 - 3 cm được chuyển sang môi trường tạo rễ (MS). Cây lúa hoàn chỉnh với bộ rễ tốt được chuyển ra chăm sóc trong nhà lưới.

Bảng 1. Thành phần của các loại môi trường được sử dụng trong nghiên cứu (Nishimura et al., 2006)

Giai đoạn	Môi trường	Thành phần
Tạo mô sẹo	N6D	N6 (Chu et al., 1975) + 2 mg/L 2,4-D + 100 mg/L myo-inositol + 300 mg/L casamino acid + 2,878 g/L L-proline + 30 g/L sucrose + 7 g/L agar, pH 5,8
Tiền tái sinh	MSNK	MS (Murashige & Skoog, 1962) + 0.2 mg/L NAA + 2 mg/L kinetin + 100 mg/L myo-inositol + 2 g/L casamino acid + 30 g/L sucrose + 30 g/L sorbitol + 7 g/L agar, pH 5,8
Tái sinh	MS+B	MS + 1 mg/L BAP + 30 g/L sucrose + 7 g/L agar, pH 5,8
Ra rễ	MS	MS + 30 g/L sucrose + 7 g/L agar, pH 5,8

2.2.2. Phương pháp phân tích số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại có 40 đĩa petri và mỗi đĩa có 10 - 12 mẫu. Trước khi cấy chuyển sang môi trường mới, sẽ đếm số mẫu chết và số mẫu cây chuyển sang môi trường mới. Số liệu được thu thập và phân tích bằng phần mềm Excel 2013.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Giai đoạn tạo mô sẹo

Chất lượng mô sẹo là yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng tái sinh và hiệu quả chuyển gene sau này. Hình 1 cho thấy khả năng tạo mô sẹo từ giai đoạn gieo hạt cho đến 14 ngày sau khi gieo trên môi trường N6D, mô sẹo phát sinh từ phôi có kích thước tương đối lớn (4 - 5 mm) thành khối chai cứng, tuy nhiên có 1 số mô sẹo bị mềm nhũn do hấp thu nhiều nước. Kết quả ghi nhận trên

môi trường N6D, tỷ lệ tạo mô sẹo từ phôi hạt chín đạt từ 95% đến 97%. Kết quả này tương đương so với nghiên cứu của Rahman et al. (2010) đã công bố trên giống MR232, một loài phụ indica (trên môi trường tối ưu M3 tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 91-97%). Ngoài ra, ở nghiên cứu của Phan Thị Hương và ctv. (2014), khả năng cảm ứng mô sẹo của các giống lúa khác nhau có độ biến động lớn và phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy. Cụ thể, tỷ lệ tạo mô sẹo của các giống BM9630, J02, NV1, NV3 và Hương cốm lần lượt là: 69%, 98%, 92%, 75% và 97% khi được nuôi cấy trên môi trường N2. Trong khi đó, giống NV2 và BC15 có tỷ lệ hạt tạo mô sẹo cao nhất trên môi trường M2 (83% và 72%). Qua đó nhận thấy môi trường N6D được sử dụng trong nghiên cứu này cho giống lúa Nàng Thơm Chợ Đào mang lại hiệu quả tạo mô sẹo tốt so với các công bố trước đây với giống lúa khác.



Hình 1. Phát sinh mô sẹo từ phôi hạt

(Ghi chú: A: bắt đầu gieo hạt; B: sau 2 tuần gieo hạt; C: sau khi cắt mô sẹo ra khỏi hạt)

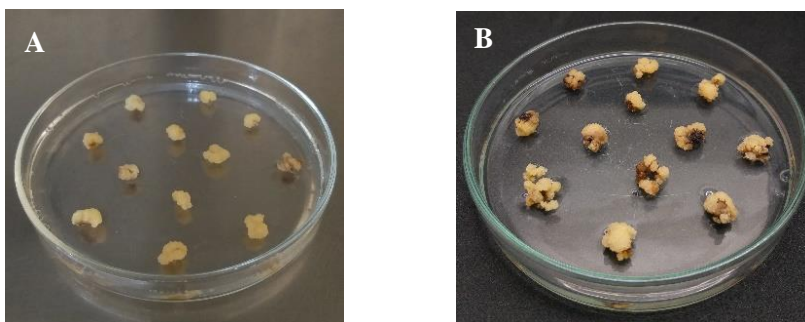
3.2. Giai đoạn cảm ứng tạo phôi soma

Giai đoạn tiền tái sinh được nuôi cấy trong điều kiện tối nhằm tăng cường khả năng phân hóa của tế bào, tạo mô sẹo trưởng thành. Kết quả sau 3 lần thí nghiệm cho thấy các mô sẹo phát triển rất tốt trên môi trường MSNK. Cụ thể, sau 15 - 20 ngày, 99,05

% mô sẹo tiếp tục phát triển lớn hơn và dạng mô sẹo xốp được hình thành. Tỷ lệ mô sẹo không phát triển và chết chỉ 0,95 %. Như vậy, môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L NAA và 2 mg/L Kinetin thích hợp và hiệu quả cao trong cảm ứng tạo phôi soma với giống Nàng Thơm Chợ Đào thuộc nhóm lúa indica.

Bảng 2. Kết quả đánh giá hiệu quả của quy trình giai đoạn tiền tái sinh thông qua mô sẹo

Lần thí nghiệm	Số mẫu	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ sống (%)
Lần 1	210	0	0,48	99,52
Lần 2	215	0	0,93	99,07
Lần 3	210	0	1,43	98,57
Trung bình		0	0,95	99,05



Hình 2. Mô sẹo phát triển trên môi trường tiền tái sinh sau 9 ngày nuôi cấy. (A: 0 ngày trên môi trường cảm ứng tạo phôi soma; B: 9 ngày trên môi trường cảm ứng tạo phôi soma)

3.3. Giai đoạn tái sinh và tạo cây hoàn chỉnh

Kết quả của giai đoạn tái sinh sau 1 tuần trên môi trường MS+B có 31,01% mô sẹo dạng toi xốp, xuất hiện các chồi xanh có kích thước nhỏ, sau đó các mô sẹo tiếp tục phát triển thành cây con sau hai tuần nuôi cấy. Còn lại các mô sẹo bị khô, teo lại và bắt đầu chết. Từ những cụm mô sẹo xuất hiện chồi cây con tiếp tục cấy chuyển sang môi trường MS ra rễ, sau 2 tuần nhận thấy 100% đều phát triển thành cây

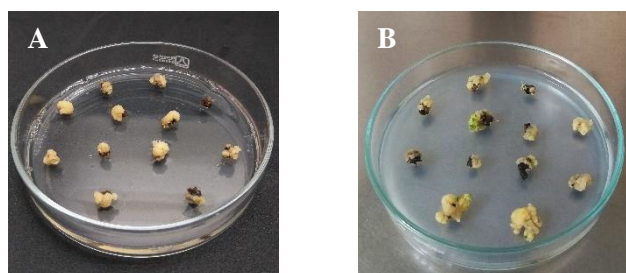
hoàn chỉnh. Như vậy, quy trình tái sinh cây từ mô sẹo phôi hóa đạt tỷ lệ khoảng 30,71% trên tổng số mẫu ban đầu đã làm (Bảng 3 và Bảng 4). So với một số nghiên cứu trước đây, tỷ lệ tái sinh của các giống lúa indica khoảng 30% đối với phương pháp tạo phôi vô tính trực tiếp và chỉ có 8% đối với gián tiếp thông qua mô sẹo (Tara et al., 2017). Như vậy, so với các quy trình trước, quy trình này cho thấy hiệu quả và phù hợp với giống lúa indica, cụ thể là giống lúa Nàng Thơm Chợ Đào.

Bảng 3. Kết quả đánh giá hiệu quả của quy trình giai đoạn tái sinh

Lần thí nghiệm	Số mẫu	Tỷ lệ nhiễm	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)
Lần 1	209	0	67,90	32,10
Lần 2	213	0	68,54	31,46
Lần 3	207	0	70,53	29,47
Trung bình		0	68,99	31,01

Bảng 4. Kết quả tái sinh của quy trình

Lần thí nghiệm	Tổng số mẫu ban đầu	Tổng số mẫu tái sinh	Tỷ lệ tái sinh (%)
Lần 1	210	67	31,90
Lần 2	215	67	31,16
Lần 3	210	61	29,05
Trung bình			30,71

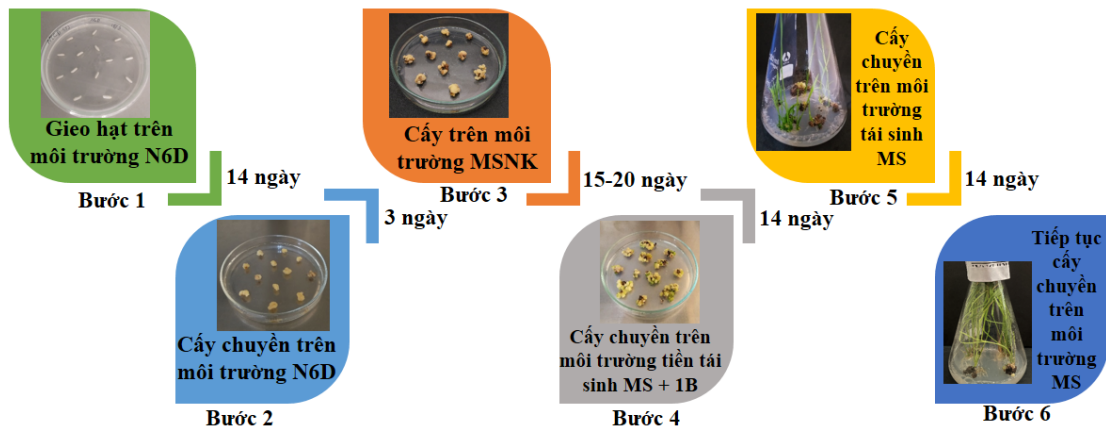


Hình 3. Mô sẹo phát triển trên môi trường tái sinh sau 14 ngày nuôi cấy

(Ghi chú: A: 0 ngày trên môi trường tái sinh; B: 14 ngày trên môi trường tái sinh)



Hình 4. Phôi vô tính phát triển thành cây hoàn chỉnh trên môi trường MS



Hình 5. Quy trình tái sinh cây in vitro của Giống lúa Nàng Thơm Chợ Đào

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã cho thấy bước đầu xây dựng thành công quy trình tái sinh thông qua phôi vô tính ở giống lúa Nàng Thơm Chợ Đào. Trong đó, mô sẹo được hình thành và phát triển tốt nhất trên môi trường N6D (N6+2,4D) với tỷ lệ đạt trên 95% từ phôi hạt. Tỷ lệ tạo phôi vô tính và tái sinh đạt 31,01% sau 2 tuần trên môi trường MS+1B (MS+BAP). Tỷ lệ tái sinh cây hoàn chỉnh của quy trình đạt 30,71%.

4.2. Đề xuất

Tiếp tục hoàn thiện và áp dụng quy trình nuôi cây mô này trong công tác chuyển gene mục tiêu vào

giống lúa NTCD cũng như các giống lúa khác thuộc nhóm indica.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 (vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản). Chân thành cảm ơn Thầy Võ Công Thành đã chia sẻ nguồn gene.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abe, T. & Futsuhara, Y. (1985). Efficient plant regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissue of rice in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 121(2), 111-118.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Msu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., & Bi, F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther cultures of rice

- through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci China Math*, 18(5), 659-668.
- Chu, Q.R., & Criughan, T.P. (1990). Genetics of plant regeneration in immature panicle culture of rice. *Crop Sciences*, 30, 1194-1390.
- Deo, P.C., Tyagi, A.P., Taylor, M., Harding, R. & Becker, D. (2010). Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific journal Nat. and Appl. Sci*, 28, 27-40.
- Hiei, Y. & Komari, T. (2008). Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature protocols*, 3(5), 824-834.
- Hoque, M.E. & Mansfield, J.W. (2004). Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of indica rice genotypes. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 78, 217-223.
- Ling, D.H., Chen, W.Y., Chen, M.F. & Ma, Z.R. (1983). Somatic embryogenesis and plant regeneration in interspecific hybrid of *Oryza*. *Plant Cell report*, 2, 169-171.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Nishimura, A., Aichi, I., & Matsuoka, M. (2006). A protocol for Agrobacterium-mediated transformation in rice. *Nature protocols*, 1(6), 2796-802.
- Phan Thị Hương, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Trùng Hiếu & Ninh Thị Thảo. (2014). Xây dựng hệ thống tái sinh in vitro trên cây lúa. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12(8), 1249-1257.
- Raemarkers, C.J., Jacobsen, E., Visser, R.G.F. (1995). Secondary somatic embryogenesis and application in plant breeding. *Euphytica*, 81, 93-107.
- 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. & Gupta, A.K. (2009). Efficient in vitro plant regeneration via leaf base segment of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Indian journal of Experiment Biology*, 47, 68-74.
- Tara, N., Sindhu, M. & Kaur, P. (2017). Review: Problem and Progress in Indica Rice Tissue Culture Techniques. *Annals of Biology*, 33, 191-198.
- Thao, B.P., Linh, N.T., Manh, N.V., Linh, L.K., Ha, C.H., Phat, D.T., & Ngoc, P.B. (2021). Optimization of Agrobacterium - mediated transformation procedure for an indica rice variety - Khangdan 18. *Journal of Biotechnology*, 19(2). (accepted)
- Wani, S.H., Sanghera, G.S. & Gosal, S.S. 2011. An efficient and reproducible method for regeneration of whole plants from mature seeds of a high yielding indica rice (*Oryza sativa* L.) var PAU 201. *New Biotechnology*, 28, 418-422.
- Zuraida, A.R., Suri, R., Zailiha, W.S., & Sreemanan, S. (2010). Regeneration of Malaysia indica rice (*Oryza sativa* L.) variety MR 323 via optimized somatic embryogenesis system. *Journal Phytoogy*, 2(3), 30-38.